

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Inducción y Caracterización de la
Embriogénesis Somática *in vitro* del chile
habanero (*Capsicum chinense* J.)**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:

Guadalupe López Puc

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2008



CONTENIDO

	Página
Agradecimientos	i
Dedicatorias	iii
Lista de cuadros	v
Lista de figuras	vii
Lista de abreviaturas	ix
Resumen	xi
Abstract	xiii
Introducción	1
Capítulo 1	3
1.1	3
	<i>Antecedentes</i>
	Origen, clasificación e importancia de <i>Capsicum chinense</i>
1.1.1	3
1.1.2	4
1.2	4
1.2.1	4
1.2.1.1	4
1.2.1.1.1	6
1.2.1.1.2	7
1.2.1.1.3	11
1.2.1.2	12
1.2.1.3	13
1.2.1.4	14
1.2.2	14
1.2.3	16
1.2.4	16
1.2.4.1	17
1.2.4.2	17
1.2.4.3	20
1.2.4.4	21
1.2.4.5	22
1.2.4.6	24
1.2.4.7	26
1.2.4.8	28
1.2.5	31
1.2.6	33
1.2.7	35
	49
	<i>Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for in Vitro regeneration of habanero pepper (Capsicum chinense Jacq).</i>

Capítulo 2		
2.1	Abstract	49
2.2	Introduction	50
2.3	Materials and methods	51
2.3.1	Induction of somatic embryogenesis	51
2.3.2	Development of somatic embryos	52
2.3.3	Pretreatment of somatic embryos with abscisic acid (ABA)	52
2.3.4	Germination of somatic embryos	52
2.4	Results	52
2.4.1	Induction and development of somatic embryogenesis	52
2.4.2	Maturing and germination of somatic embryos	58
2.5	Discussion	60
2.6	Literature cited	63
Capítulo 3	Caracterización morfo-histológica de la embriogénesis somática directa en diferentes tipos de explante de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	67
3.1	Resumen	67
3.2	Introducción	67
3.3	Materiales y métodos	69
3.3.1	Fuente de explante	69
3.3.2	Inducción de la embriogénesis somática	69
3.3.3	Análisis histológico	69
3.4	Resultados del análisis histológico de la embriogénesis somática en <i>C. chinense</i> J.	71
3.4.1	Hipocotilo (<i>HP</i>)	71
3.4.2	Embrión cigótico germinado (<i>ECG</i>)	71
3.4.3	Hoja cotiledonar (<i>HC</i>)	74
3.4.4	Estadios de desarrollo durante la embriogénesis somática de chile habanero	74
3.4.5	Geminación de los embriones somáticos	74
3.5	Discusión	78
3.6	Bibliografía	81
Capítulo 4	Discusión general	85
4.1	Protocolo propuesto	86
4.2	Bibliografía	91
Capítulo 5	Conclusiones y perspectivas	95
5.1	Conclusiones	95
5.2	Perspectivas	96

AGRADECIMIENTOS

A la directora de esta tesis, la Dra. Nancy Santana Buzzy por los consejos y apoyo otorgados.

A los miembros del comité tutorial y revisores de esta tesis: Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Felipe Barahona Pérez, Dra. Sara Nahuat Dzib y al Dr. Víctor Suárez Solís, por sus comentarios y recomendaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios otorgada con registro 185738.

Fundación Produce Yucatán y a SINAREFI por el financiamiento a esta investigación.

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP) del CICY por el apoyo prestado.

A la Unidad de Biotecnología (UBT) del CICY por el apoyo prestado.

A M en C Adriana Canto Flick, Felipe Barredo Pool y María Narváez Cab por su asesoría técnica.

A los compañeros de laboratorio: Guadalupe Dzib Amaro, Dra. María del Carmen Montalvo Peniche, M en C. Patricia Zapata Castillo, M en C. Anabel Solís Ruiz, M en C. Susana Áviles Viñas, M en C. Jericó Bello Bello, Daniela Solís Marroquín, Carlos Lecona Guzmán, Eunice Gómez Uc y M en C. Eduardo Balam Uc.

A la Dra. Hilda Lee Espinosa por su amistad y apoyo.

DEDICATORIAS

A mis padres: Rolando y María Estela por haberme dado la vida.

A mi esposo: Edgar por su amor y apoyo, que me ha permitido seguir adelante.

A mi pequeño hijo: Edgar por su cariño y paciencia.

A todos los buenas personas que Dios ha puesto en mi camino.

Lista de cuadros

Cuadro		Página
1.1	Clasificación taxonómica e importancia de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	3
1.2	Embriogénesis somática en otras especies de la familia Solanaceae	15
1.3	Embriogénesis somática en el género <i>Capsicum</i>	16
2.1	Effect of different culture media on explants of habanero pepper (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) in the formation of somatic embryos after 30d of culture	53

Lista de figuras

Figura		Página
1.1	Representación esquemática de embriogénesis somática secundaria en <i>Vitis rupestris</i>	6
1.2	Explantos utilizados con mayor frecuencia para inducir la formación de embriones somáticos (modificado Gaj, 2004).	7
1.3	Reguladores de crecimiento vegetal (RCVs) utilizados con mayor frecuencia para la inducción de la embriogénesis somática (modificado, Gaj, 2004).	9
1.4	Adquisición de competencia embriogénica en <i>Daucus carota</i>	18
1.5	Efecto del 2,4-D durante la inducción de la embriogénesis somática en <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
1.6	Cortes histológicos durante la ES de origen unicelular en <i>Coffea arabica</i>	20
1.7	Cortes histológicos durante la ES de origen multicelular en <i>Musa spp</i>	21
1.8	Patrones de división de las células embriogénicas	22
1.9	Corte histológico de embrión somático pre-cotiledonar de <i>Feijoa sellowiana</i>	23
1.10	Cortes histológicos de embriones somáticos de <i>Olea europæa</i>	24
1.11	Micrografía longitudinal del meristemo apical del brote de <i>Daucus carota</i>	25
1.12	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos de <i>Solanum tuberosum</i>	26
1.13	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos de <i>Nicotiana tabacum</i>	27
1.14	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos de <i>Lycopersicon esculentum</i>	27
1.15	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos de <i>Solanum melongena</i>	28
1.16	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos de <i>Capsicum annuum</i>	29
1.17	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos de <i>Capsicum annuum</i>	29
2.1	Direct somatic embryogenesis obtained from different explants of habanero pepper	54
2.2	Direct somatic embryogenesis of hypocotyl explants of habanero pepper	55
2.3	Different shapes of somatic embryos of habanero pepper	55
2.4	Response (percent) to somatic embryogenesis of different explants of habanero pepper	57
2.5	Effect of culture conditions, photoperiod and darkness on the frequency on formed embryos and on the developmental stages of the embryos	58
2.6	Plantlets developed from somatic embryos of <i>Capsicum</i>	59

	<i>chinense</i> J. in solid germination medium	
2.7	Fused somatic embryos	59
3.1	Análisis histológico	70
3.2	Cortes histológicos longitudinales de segmentos de <i>HP</i> de <i>C. chinense</i> durante la <i>ESD</i>	72
3.3	Cortes histológicos longitudinales a partir de <i>ECG</i> de <i>C. chinense</i> durante la <i>ESD</i>	73
3.4	Cortes histológicos longitudinales a partir de <i>HC</i> de <i>C. chinense</i> durante la <i>ESD</i>	75
3.5	Cortes histológicos longitudinales de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos de <i>C. chinense</i>	76
3.6	Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos germinados de <i>C. chinense</i>	77
4.1	Etapas del protocolo propuesto para la inducción de la embriogénesis somática en chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> J.)	87

Lista de abreviaturas

ABA	Ácido Abscísico
AG ₃	Ácido Giberélico
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indolbutírico
ANA	Ácido Naftalenacético
APA	Ácido Fenilacético
BA	Bencil Amino Purina
Br	Brasinosteroide
Cm	Centímetro
COT	Cotiledón
EBR	24-Epibrasinólido
EC	Embrión Cigótico
ECG	Embrión Cigótico Germinado
ES	Embriogénesis Somática
ESP	Embriogénesis Somática Primaria
ESS	Embriogénesis Somática Secundaria
ESD	Embriogénesis Somática Directa
ESI	Embriogénesis Somática Indirecta
FAA	Formaldehído
HP	Hipocotilo
HC	Hoja Cotiledonar
Kin	Kinetina
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micra
MS	Murashige y Skoog
PAs	Poliaminas
PEMs	Masas proembriogénicas

RCV	Regulador de crecimiento vegetal
TDZ	Tidiazurón
ZEA	Zeatina
2, 4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

RESUMEN

El chile habanero (*Capsicum chinense* J.) pertenece al género *Capsicum* y aunque se considera originario de Sudamérica, Yucatán está reconocido como centro de reserva genética de esta especie. Su cultivo se encuentra entre los principales productos agrícolas de la Península, y es altamente apreciado en el mundo por su aroma, sabor, olor y picor, atributos que lo diferencian de los demás chiles de la especie que se cultivan en otras regiones. En los últimos años, el chile habanero ha adquirido mayor demanda, tanto en el mercado nacional como en el internacional, debido a que constituye la materia prima para diferentes industrias, especialmente alimenticia, farmacéutica y militar, entre otras, además de su alto consumo en una amplia gama de platillos. A pesar de su importancia, aún no se cuenta con cultivares resistentes a numerosas plagas y enfermedades, las cuales ocasionan cada año, cuantiosas pérdidas de este preciado producto. Tomando en consideración este panorama, planteamos establecer un protocolo de regeneración del chile habanero vía embriogénesis somática, por constituir una herramienta indispensable para desarrollar técnicas de mejoramiento genético y multiplicación clonal en esta especie, por métodos biotecnológicos. Como resultado, actualmente contamos con el primer sistema de inducción de embriogénesis somática directa para *Capsicum chinense*, a partir de diferentes explantes, que se caracteriza por su alta eficiencia. Mediante estudios histológicos fue posible comprobar la naturaleza embriogénica de las estructuras formadas. Este sistema será de gran utilidad para desarrollar muchos estudios, tanto básicos como aplicados, relacionados con esta especie.

The first part of the book is devoted to a general introduction to the subject of the history of the world. The author discusses the various theories of the origin of life and the development of the human race. He also touches upon the different stages of civilization and the progress of science and art. The second part of the book is a detailed account of the history of the world from the beginning of time to the present day. It covers the various empires and nations that have risen and fallen, and the events that have shaped the course of human history. The author's style is clear and concise, and his treatment of the subject is both comprehensive and interesting. The book is a valuable addition to any library and is highly recommended to all who are interested in the history of the world.

ABSTRACT

The habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) it belongs to the *Capsicum* genus and although it is considered original South America, Yucatan is recognized as a center of genetic reserve of this species. It is one of the agricultural products of the Peninsula, and is highly appreciated in the world by its aroma, scent and pungency, attributes that make different of the other chili peppers cultivated in other regions.

In the last years, habanero pepper has acquired greater demand, as much in the national market as the international, because it constitutes the raw material for different industries, especially nutritional, pharmaceutical and military, among others, in addition to its high consumption in wide range of plates in the regional kitchen.

Nevertheless, its culture is affected by numerous plagues and diseases, which cause every year, numerous losses of this appraised product. Taking in consideration this panorama, we considered to establish a protocol of regeneration of *Capsicum chinense* J. via somatic embryogenesis, to constitute an indispensable tool to develop to techniques of genetic improvement and clonal multiplication of this species, by biotechnological methods. We developed the first system of regeneration by somatic embryogenesis for *Capsicum chinense* J., from different explants, which is highly efficient. This system will be of great utility to make different investigations in this species.



INTRODUCCIÓN

Los chiles pertenecen al género *Capsicum* de la familia Solanaceae, que representa un grupo diverso de plantas, cuya característica común es producir frutos de diversos tamaños, colores, sabores y pungencia. Estas incluyen desde los tipos de chiles dulces o morrones a los más picantes, conocidos como habaneros. El género *Capsicum* fue domesticado en diferentes partes de Sur y Centro América. Las cinco especies que han sido domesticadas son: *C. annum.*, *C. baccatum.*, *C. chinense.*, *C. frutescens* y *C. pubescens* (Dewitt y Bosland, 1993). Se considera que *C. chinense* es la más diversificada de todas las especies del género *Capsicum*, domesticadas en América. Se postula que el centro de origen de esta especie es la cuenca Amazónica (Dewitt y Bosland, 1993). Su distribución a través de diferentes islas de la Cuenca del Caribe se remonta a la época precolombina, y probablemente a partir de estas islas pasó a la Península de Yucatán.

La regeneración vía *ES* (embriogénesis somática) permite la propagación vegetativa a gran escala (Kintzios *et al.*, 2001), puede ser utilizada en la regeneración de plantas genéticamente transformadas (Cruz Hernández *et al.*, 1998). Los embriones somáticos también pueden ser criopreservados lo cual permite establecer bancos de genes (Pérez *et al.*, 1997). Por otra parte, es posible mantener y propagar híbridos, cuyas características se perderían por el método tradicional (Vicent y Martínez 1998). Además, la *ES in vitro* es un pre-requisito para el uso de muchas herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético. Se puede considerar, que los embriones somáticos son clave para los métodos de transformación genética. Aunque se han obtenido progresos en muchas especies de la familia Solanaceae, en Chile aun no se cuenta con un protocolo de regeneración eficiente y reproducible (Liu *et al.*, 1990). Por lo que *Capsicum* es considerado como un género recalcitrante a la morfogénesis *in vitro*. Aunado a ello, algunas especies del género *Capsicum* presentan problemas de incompatibilidad interespecifica e infertilidad en el híbrido F1, durante el mejoramiento convencional. Todo ello hace que se dificulten los trabajos de mejoramiento genético de los cultivares que lo requieren.

Actualmente existen reportes de regeneración de plantas *in vitro* del género *Capsicum*, particularmente en la especie *C. annum.* Sin embargo, la gran mayoría son vía organogénesis directa a partir de hojas cotiledonares e hipocotilos (Gunay y Rao, 1978; Fári y Csakó, 1981; Phillips y Hubstenberger, 1985; Agrawal *et al.*, 1989; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Hyde y Phillips, 1996). La *ES* en *C. annum.* ha sido inducida principalmente a partir de embrión cigótico inmaduro (Harini y Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996; Jo *et al.*, 1996) y embrión cigótico maduro (Büyükalaca y Mavituna, 1996). Únicamente Kintzios *et al.* (2001) indujeron *ES* a partir de hoja. Recientemente Khan *et al.* (2006) reportó la obtención de embriones somáticos utilizando yema apical y segmentos de tallo.

En *C. chinense*, a la fecha se han realizado dos reportes de proliferación de brotes, en los que se utilizaron nudos y segmentos de tallos como explante (Santana-Buzzy *et al.*, 2005, 2006). En *C. chinense* existen dos reportes de ES (López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007). El primer protocolo es el más eficiente no solo del género *Capsicum*, sino también de la familia Solanaceae, dado que la formación de embriones somáticos de manera directa puede ser inducida a partir de una amplia gama de explantes (López-Puc *et al.*, 2006).

En este trabajo, nuestro principal propósito fue desarrollar un sistema de regeneración *in vitro*, que sea reproducible y eficiente. Además, este sistema deberá permitir y facilitar la propagación de cultivares que resulten promisorios, producto del mejoramiento convencional o biotecnológico, o que se encuentren conservados *in vitro*.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Origen, clasificación e importancia de *Capsicum chinense*

1.1.1 Origen

La especie *Capsicum chinense* es originaria de América. Sin embargo, el Estado de Yucatán es considerado como el centro de reserva genética. Los frutos de esta especie son considerados muy picantes, siendo el red savina habanero, el chile conocido como el más picante del mundo. El chile habanero es el tipo más conocido de esta especie y se refiere principalmente a los tipos cultivados en la Península de Yucatán y en Belice (Torres y Franco, 2005). En el cuadro 1.1 se presenta la clasificación taxonómica del chile habanero descrita por Tun Dzul (2001).

Reino	Vegetal
Subreino	Embriofita
División	Angiospermeae
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Metachlamidae
Orden	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Género	Capsicum
Especie	chinense
Nombre científico	<i>Capsicum chinense</i> Jacquin.

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica del chile habanero

1.1.2 Importancia de *Capsicum chinense*

El chile habanero (*C. chinense*) es uno de los principales ingredientes en la gastronomía de la comida yucateca, y el gusto por su sabor característico se ha extendido a otras partes del mundo. En la actualidad se ocupa como materia prima para la elaboración de una extensa gama de productos industriales. En la industria alimenticia se utiliza para la preparación de salsas picantes, pastas, hamburguesas y botanas. Además, se extraen los pigmentos, los cuales son utilizados como colorantes para salsas, quesos, aderezos, gelatinas, entre otros. En la industria farmacéutica, la capsaicina extraída de los chiles es utilizada en la elaboración de cremas, parches para dolor muscular y artritis, así como para pastas dentales. En la industria militar, la capsaicina también es utilizada como componente básico del gas pimienta en los atomizadores de defensa.

1.2 Embriogénesis somática

La *ES* se define como el proceso por el cual las células somáticas forman estructuras bipolares y sin conexión vascular al tejido materno, pasando por una serie de etapas características a la embriogénesis cigótica, pero sin que ocurra fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986).

1.2.1 Fases de la embriogénesis somática

Las fases fundamentales de la *ES* son la inducción, histodiferenciación, maduración, germinación y conversión del embrión. Cada una de éstas fases es regulada por diversos factores (Rudús *et al.*, 2006).

1.2.1.1 Inducción de la embriogénesis somática

Durante la inducción, las células somáticas adquieren características embriogénicas mediante una completa reorganización del estado celular, incluyendo cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares (Fehér *et al.*, 2003). Lo anterior está basado en la teoría de la totipotencia celular propuesta por Haberlandt's en 1902 en la que plantea que todas las células somáticas de las plantas tienen la información genética necesaria para dar origen a una planta funcional y completa (Jiménez, 2001). La expresión de los genes se regula para permitir la diferenciación de los órganos de la planta. La inducción de la *ES* por lo tanto es, consecuencia de reemplazar el patrón de expresión genética de las células del tejido, por un patrón de expresión genética embriogénico (Von Arnold *et al.*, 2002).

Sharp y Evans (1982), utilizaron los términos, célula embriogénica inducida determinada (*IEDC*, por sus siglas en inglés) para describir una célula embriogénica que se ha originado de una célula no embriogénica y célula pre-embriogénica determinada (*PEDC*, por sus siglas en inglés), para describir a una célula proveniente de una célula de un embrión cigótico, la cual ya expresa un programa de expresión genética embriogénico. Para fines de regeneración, una vez obtenido ambos *IEDC* o

PEDC, se utiliza el término célula determinada embriogénicamente (*EDC*, por sus siglas en inglés) o célula embriogénica (*EC*).

Los tratamientos para obtener *ES* dependerán de que las células del explante estén o no determinadas embriogénicamente. En el caso de *PEDC* solo se necesita estimular la división celular, para inducir la formación de embriones somáticos en el tejido de un explante, lo que se le conoce como embriogénesis somática directa (*ESD*), ya que los embriones aparecen directamente de los tejidos del explante. En cambio, un tejido no embriogénico, tendrá que experimentar una serie de divisiones mitóticas durante la inducción del estado embriogénico, las células que resultan a partir de estas divisiones son manifestadas como callos y se utiliza el término de embriogénesis somática indirecta (*ESI*) para indicar que el callo es una fase que interviene entre el explante original y la aparición de embriones somáticos. La *ESI* ocurre con mayor frecuencia que la *ESD*, siendo pocos los cultivos en los que ocurren ambos procesos (Gaj, 2004). A la *ESD* y la *ESI* inducida del explante original, se le conoce como embriogénesis somática primaria (*ESP*).

La embriogénesis somática secundaria (*ESS*) es la formación de nuevos embriones somáticos a partir de otros embriones somáticos directamente o a través de callo (Gaj, 2004). En muchas especies, la *ESS* ha resultado ser más eficiente que la *ESP* (Akula *et al.*, 2000). Además, la *ESS* presenta mayor porcentaje de multiplicación, independencia del explante original y reproducibilidad, entre otras ventajas. Las especies que presentan *ESS* tienen la ventaja de que la embriogenecidad puede ser mantenida por períodos prolongados de tiempo (Raemarkers *et al.*, 1995; Martinelli *et al.*, 2001). El esquema por el cual se mantienen los ciclos de embriogenecidad es representado en la Fig 1.1.

Los embriones somáticos pueden formarse a partir de células somáticas, de callos o de células en suspensión. Las células somáticas sensibles a los factores de inducción que son capaces de experimentar *ES* son llamadas células competentes. Las células competentes muestran sensibilidad a estímulos físicos y químicos que desencadenan la ruta embriogénica. Durante el establecimiento de un sistema de *ES*, la elección apropiada del explante es un punto clave, ya que el explante es la fuente de las células competentes, así como también, es importante la determinación de los factores físicos y químicos, los cuales permitirán adquirir la capacidad embriogénica (Gaj, 2004).

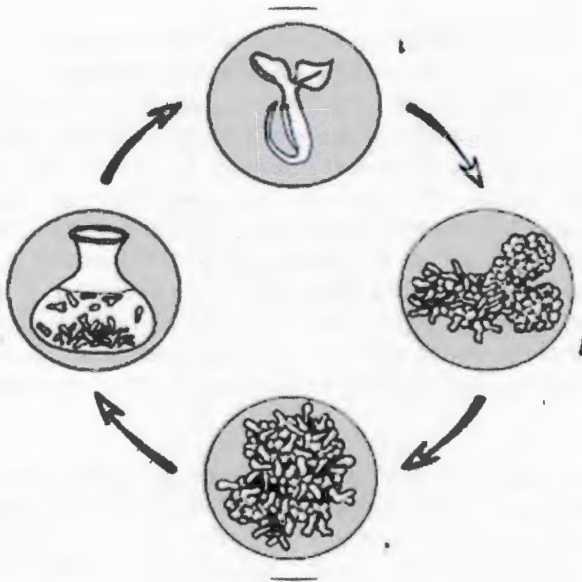


Figura 1.1 Representación esquemática de embriogénesis somática secundaria en *Vitis rupestris*. (Martinelli *et al.*, 2001)

1.2.1.1.1 Influencia del explante en la embriogénesis somática

El tipo de explante es un factor importante que determina la capacidad embriogénica del cultivo. La ES se ha inducido en diferentes tipos de explantes, de los cuales podemos mencionar: pecíolo, hoja, hipocotilo, raíz, brote meristemático, semilla, cotiledón y embrión cigótico maduro e inmaduro. Los embriones cigóticos inmaduros representan la fuente de células embriogénicas utilizadas con más frecuencia (Fig. 1.2).

La inducción de ES en especies recalcitrantes como *Picea abies* (Von Arnold *et al.*, 1996), *Arabidopsis thaliana* (Ikeda-Iwai *et al.*, 2002) y *Capsicum annuum* (Binzel *et al.*, 1996; Büyükalaca y Mavituna, 1996; Harini y Sita, 1993; Jo *et al.*, 1996; Steinitz *et al.*, 2003), se ha logrado principalmente mediante el uso de los embrión cigótico inmaduro como fuente de explante.

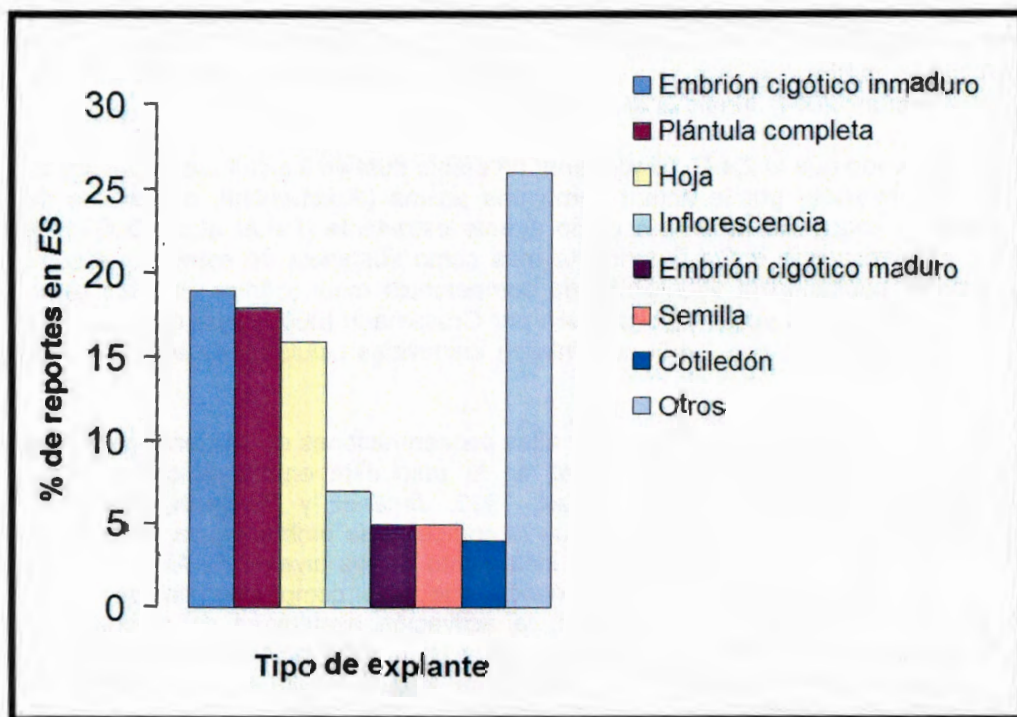


Figura 1.2 Explantes utilizados con mayor frecuencia para inducir la formación de embriones somáticos (modificado Gaj, 2004).

1.2.1.1.2 Los reguladores de crecimiento vegetal (RCVs) en la embriogénesis somática

La composición y la concentración de RCVs determinan la habilidad del explante cultivado para responder a la morfogénesis, así como también, el tipo de respuesta, ya que dependiendo de la composición de RCVs en el medio se podrá obtener ES, organogénesis o desarrollo de brotes axilares (Guzzo *et al.*, 1994). En algunas especies se ha observado que no es necesario la aplicación exógena de RCVs. Gaj (2004) reportó que alrededor del 7% de los sistemas de ES no requirieron de RCVs para la inducción (Fig. 1.3).

Las auxinas y las citocininas son los principales RCVs involucrados en la regulación de la división celular y la diferenciación (Pasternak *et al.*, 2002). Entre las auxinas aplicadas exógenamente se encuentran, el ácido indol acético (AIA), el ácido indol butírico (IBA), el ácido naftalenoacético (ANA) y el 2, 4 ácido diclorofenoxiacético (2, 4-D). Esta última se ha reportado en aproximadamente el 65% de los protocolos de ES (Fig. 1.3). Su eficiencia para la inducción de la respuesta embriogénica se ha

observado en diferentes sistemas *in vitro* y en diferentes especies indicando el carácter específico y único de este RCV. De hecho su uso para la inducción de los embriones somáticos se remonta a los trabajos de Halperin y Wetherell en 1964 (Raghavan *et al.*, 2004; Junaid *et al.*, 2006).

Se ha observado que el 2,4-D, puede tener un efecto dual en los cultivos dependiendo de la concentración: puede actuar como una auxina (directamente o a través del metabolismo endógeno de AIA) o como agente estresante (Fehér *et al.*, 2003). De hecho, se piensa que el 2,4-D funciona más como sustancia de estrés, que como fitohormona, causando la adquisición de competencia embriogénica (Kikuchi *et al.*, 2006). Lo anterior, es sustentado también por Grossmann (2000), que demostró que durante el tratamiento con 2,4-D aumentaron los niveles celulares de etileno y ABA (RCV del estrés).

En algunos estudios se han encontrado altas concentraciones de AIA endógeno, que se han relacionado con un incremento en la respuesta embriogénica en varias especies/explantos (Michalczuk y Druart, 1999; Jiménez y Bangerth, 2001a, c). Basándose en lo anterior, se supone que la competencia embriogénica presente en algunas especies está asociada con el incremento de los niveles de AIA endógeno debido a la presencia de 2,4-D, sugiriendo que este compuesto sintético actúa alterando el metabolismo. Por lo tanto, la activación simultánea de auxina y de respuestas a estrés podría ser un evento clave en la adaptación celular, causando reprogramación genética, metabólica y fisiológica, lo cual resulta en la adquisición de competencia embriogénica de las células somáticas de las plantas.

Por otra parte, el uso de las citocininas se ha reportado en aproximadamente 12% de los protocolos (Fig. 1.3). En algunos casos, la aplicación de citocininas impide el desarrollo de los embriones somáticos (Gaj, 2004). Sin embargo, en otros sistemas son más efectivas que las auxinas, por ejemplo, el uso de kinetina en *S. truncata* indujo ES, mientras que el uso de 2,4-D la inhibió, lo cual se atribuyó a que éste cactus tiene altos niveles endógenos de auxinas (Al-Dein *et al.*, 2006). El uso de zeatina en *Gossypium hirsutum* promovió la diferenciación, maduración y germinación de los embriones somáticos, por el contrario el 2,4-D inhibió la germinación y promovió la formación de callos (Zhang *et al.*, 2001). En *Helianthus annuus* se detectaron niveles endógenos altos de AIA, y solo fue necesaria la aplicación de BA (Bencil amino purina) para inducir la ES (Thomas *et al.*, 2002).

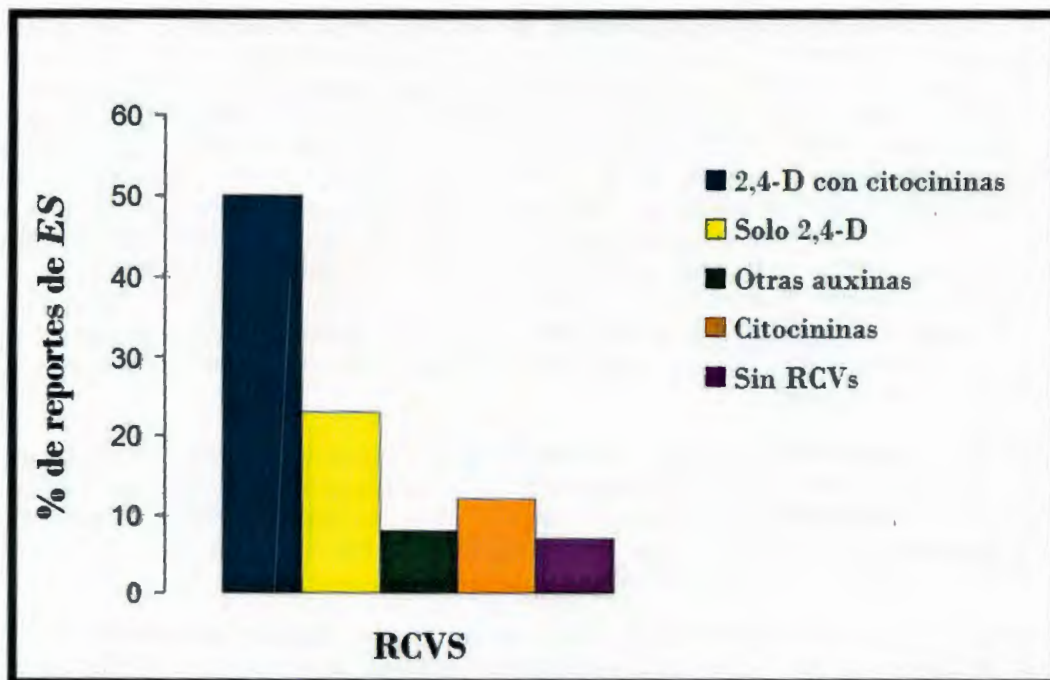


Figura 1.3 Reguladores de crecimiento vegetal (RVCs) utilizados con mayor frecuencia para la inducción de la embriogénesis somática (modificado Gaj, 2004).

El TDZ (tidiazurón) es un potente RCV, con actividad de citocinina. Se ha reportado su uso como el único RCV utilizado durante la inducción de *ES* (Gill y Saxena, 1993; Khan *et al.*, 2006). En otros trabajos se ha utilizado el TDZ combinado con 2,4-D (Rugkhla *et al.*, 1998) o con kinetina (Chen y Chang, 2001) para inducir la *ES*. Aunque aun no se conoce el modo de acción del TDZ, se ha propuesto que su acción está relacionada con el metabolismo de las auxinas y las citocininas endógenas (Visser *et al.*, 1992). En *Arachis hypogaea*, el TDZ estimuló la producción de aminoácidos, por lo que se sugiere que activa varias rutas bioquímicas para producir los metabolitos requeridos en el proceso de *ES* (Murch *et al.*, 1999).

Además del uso por separado tanto de las auxinas como de las citocininas, también se han realizado combinaciones de ambas para inducir la *ES* o incrementar la frecuencia de la inducción de callo embriogénico. Por ejemplo en *Gentiana cruciata* se utilizó BA con ANA (Mikula *et al.*, 2005), y en *Elymus sibiricus* se utilizó 2,4-D con kinetina (Li *et al.*, 2006).

En los últimos años, también se ha prestado especial atención al efecto de otros RCVs durante la *ES*, entre los que se encuentran, el ácido abscísico (ABA), los brasinosteroides (Br), las poliaminas (PAs) y el etileno.

El ABA se ha utilizado principalmente, en la fase de la maduración. Este actúa regulando la síntesis y deposición de compuestos de almacenamiento, induciendo tolerancia a la desecación y generando dormancia o quiescencia en los embriones somáticos (Von Arnold *et al.*, 2002). Sin embargo, su uso no está limitado a esta etapa, ya que ha sido utilizado para inducir la ES en coníferas (Stasolla *et al.*, 2002) y en angiospermas (Nishiwaki *et al.*, 2000; Rúdus *et al.*, 2006). También se ha relacionado el nivel endógeno de ABA con el efecto positivo de inducción de la ES (Kikuchi *et al.*, 2006). En *Daucus carota* la aplicación de ABA en el cultivo de plántulas completas, induce de manera eficiente la formación de embriones somáticos en la zona del hipocotilo (Nishiwaki *et al.*, 2000). Sin embargo, hay que tener en cuenta, que esta respuesta ocurre solo en presencia de las yemas apicales, la principal fuente de auxina en las plántulas, lo cual sugiere una interacción del ABA y las auxinas para la inducción del proceso.

Los brasinosteroides (Br) se han utilizado en pocos estudios de la ES. Sin embargo, su uso resultó muy útil en la formación de tejido embriogénico en coníferas y arroz. Cuando el brasinólido se combinó con las citocininas, la regeneración se incrementó. Al parecer esto se debió a que el brasinólido potenció el efecto de la citocinina (Pullman *et al.*, 2003; Aydin *et al.*, 2006).

Las PAs (putrescina, espermidina y espermina), se han utilizado ampliamente como inductores de la ES en diferentes especies de plantas. Montague *et al.* (1978, 1979) fueron los primeros en reportar el incremento endógeno de estos RCV durante la ES en cultivos de *Daucus carota*. En esta especie, se observó que el proceso se inhibió completamente cuando se bloqueó la biosíntesis de PAs (Montague *et al.*, 1979). En un estudio en *D. glomerata* se demostró que las PAs están relacionadas positivamente con la adquisición de competencia embriogénica (Li y Burrit, 2003). Se ha sugerido que las PAs median la acción de otros RCV y al parecer actúan tanto en el desarrollo de las plantas como en otros procesos morfogénicos (Kakkar y Sawhney, 2002). La aplicación exógena de putrescina aumentó la formación de embriones somáticos en *G. hirsutum* (Hamidou *et al.*, 2005), y en *S. melongena* (Yadav y Rajam, 1997). Las PAs (espermidina y espermina) y el etileno tienen un precursor común (SAM), por lo que se supone, que un aumento en la biosíntesis de PAs provoca la reducción de la biosíntesis de etileno, favoreciendo la inducción de la ES (Minocha *et al.*, 1991). El tratamiento de masas proembriogénicas (PEMs) con PAs favoreció la germinación de embriones somáticos (Nakagawa *et al.*, 2006). Además se han encontrado niveles más altos de PAs en cultivos embriogénicos que en cultivos no embriogénicos, específicamente en estudios de coníferas y *Daucus carota* (Kumar *et al.*, 1989). La aplicación de putrescina resultó benéfica durante las etapas tempranas de la ES en *Solanum melongena* (Yadav y Rajam, 1998; Kelley *et al.*, 2002).

En muchos sistemas de regeneración se postula que posiblemente el etileno actúa como un inhibidor en la inducción de la ES (Litz y Yurgalevitch, 1997). Se ha reportado que la aplicación de inhibidores de la biosíntesis de etileno como la aminoetoxivinilglicina (AVG) incrementó la inducción de la ES (Kong y Yeung, 1994; Santos *et al.*, 1997). El uso de bloqueadores de los receptores de etileno como el cobalto, el níquel

y el ácido salicílico (Roustan *et al.*, 1989, 1990a) favorecieron la inducción del proceso de ES. Sin embargo, no se puede generalizar esta respuesta, ya que en ciertas especies, el etileno tiene un efecto de inductor del proceso. Por ejemplo, en *Coffea canephora* se observó que el etileno estimuló la ES (Hatanaka *et al.*, 1995). Además, la adición de ácido aminociclopropano, un precursor de etileno, así como también de etefón, un compuesto que en plantas es convertido a etileno, promovieron la ES (Nissen, 1994). El genotipo es otro factor que influye también en la respuesta a los inhibidores de la biosíntesis y acción del etileno (Huang *et al.*, 2001).

1.2.1.1.3 Influencia de las condiciones de iluminación en la embriogénesis somática

La luz es una de los factores ambientales que más influyen en la respuesta de los cultivos *in vitro*. La intensidad, el espectro de la luz y la duración de la luz aplicada durante el cultivo de tejidos pueden influir en la respuesta morfogénica y en su eficiencia. El fotoperíodo ha sido reportado en el 49% de los casos y la oscuridad en el 44% como condiciones requeridas para inducir la ES (Gaj, 2004).

Gaj (2002) realizó una comparación de la eficiencia de la ESD, tomando como explante el embrión cigótico inmaduro de *A. thaliana*, bajo condiciones de fotoperíodo y oscuridad. Los resultados muestran mayor eficiencia bajo condiciones de oscuridad. Un efecto benéfico de la oscuridad en la inducción de la ES ha sido también reportada en diferentes especies: en *H. annuus* (Fiore *et al.*, 1997), en *C. reticulata* y *C. japonica* (San José y Vieitez, 1993) y en *M. domestica* (Paul *et al.*, 1994).

La longitud de onda también puede ser otro factor crítico para la inducción de la ES. La luz roja, produjo una mayor capacidad embriogénica en cultivos de *Cydonia oblonga*, comparado con la luz blanca (D'Onofrio *et al.*, 1998), *Begonia gracilis* (Castillo y Smith 1997) y *Araujia sericifera* (Torne *et al.*, 2001). En células en suspensión de *A. thaliana* se observó que el uso de la irradiación del cultivo con luz azul promovió el proceso de regeneración (Kaldenhoff *et al.*, 1994).

La influencia de la luz en la morfogénesis de las plantas puede estar relacionada con un efecto estimulador e inhibitorio sobre diferentes sustancias, incluyendo los RCVs (Zelena, 2000).

En cultivos de *Disanthus cercidifolius*, *Crataegus oxyacantha* y *Rhododendron*, la luz intensa provocó la fotólisis de los RCVs produciendo efectos detrimentales (Marks y Simpson, 1999).

1.2.1.2 Histodiferenciación de la embriogénesis somática

Por lo general, un embrión somático experimenta los mismos cambios de estadios que un embrión cigótico. Las dicotiledóneas atraviesan por las siguientes etapas: globular, acorazonada, torpedo y cotiledonar. Los embriones de las monocotiledóneas atraviesan por las etapas: globular, coleoptilar y escutelar (Thorpe, 1995). Al proceso de formación de órganos que ocurre cuando los embriones globulares se desarrollan hasta alcanzar la etapa cotiledonar, se le da el nombre de histodiferenciación (Thorpe, 1995). En las plantas dicotiledóneas, el embrión en etapa temprana tiene forma globular, mientras que el embrión maduro es simétricamente bilateral, a lo largo del eje apical-basal y tiene dos cotiledones. La adquisición de la simetría bilateral ocurre durante la transición de la etapa globular a la etapa acorazonada (Tykarska, 1979). Se ha observado que para el establecimiento de la polaridad y el crecimiento bipolar en la planta se requieren niveles bajos de auxina (Michalzuk *et al.*, 1992). Además, el transporte polar de la auxina es necesario para establecer la simetría bilateral en los embriones dicotiledonarios. Para fundamentar lo anterior, se encuentran las observaciones en embriones cigóticos de mutantes de *A. thaliana* que tienen reducida su capacidad de transporte de auxinas, estos mutantes desarrollan estructuras en forma de cono, en vez de dos cotiledones (Okada *et al.*, 1991). En este fenotipo se ha observado también que los embriones cigóticos de Nuez de la india que han sido cultivados *in vitro* no logran formar los dos cotiledones cuando se les expone a inhibidores del transporte de auxinas (Liu *et al.*, 1993). Los cotiledones fusionados son característicos de los embriones somáticos con forma de cuerno, comúnmente observados en cultivo de células y esto probablemente sea debido a que la auxina aplicada exógenamente no puede ser transportada hacia los embriones globulares, lo que evita el desarrollo normal. De todos los RCV conocidos, la auxina es el único que muestra transporte polar (Kaldewey, 1984). La dirección de su movimiento es predominantemente basipetal (hacia la parte inferior de la planta) en los brotes, aunque también es acropetal (hacia la parte superior de la planta) en la raíz. La polaridad que se observa en el transporte de la auxina se ha asociado con numerosos fenómenos de desarrollo y crecimiento de la planta, como fototropismo, dominancia apical y formación de raíces adventicias (Gälweiler *et al.*, 1998). La adición de inhibidores del transporte de auxina durante la ES de *Daucus carota* provoca la incapacidad de los embriones a experimentar la transición entre la etapa globular y acorazonada o entre la etapa acorazonada y torpedo (Schiavone y Cooke, 1987).

Hay datos que indican que la auxina es importante para la inducción del desarrollo del tejido vascular (Fosket y Roberts, 1964; Fukuda y Komamine, 1980; Klee *et al.*, 1987; Romano *et al.*, 1991; Aloni, 1995). Se ha demostrado que el transporte de auxinas ocurre en células que están dentro o adyacentes a los tejidos vasculares (Wangermann, 1974; Morris y Thomas, 1978). El incremento en la concentración de auxinas en el cambium vascular debido al transporte basipetal proporciona suficientes niveles de auxinas para activar, la mitosis en el cambium vascular (Ugglá *et al.*, 1996), para influir en el tamaño de las traqueidas (Sheldrake y Northcote, 1968), y además como señal para la determinación de diferentes tipos de células vasculares (Ugglá *et al.*, 1996).

En general, para que los proembriones y embriones somáticos globulares puedan avanzar en su desarrollo, se requiere que los RCVs involucrados en la inducción se remuevan del medio, o que se reduzca la concentración a un nivel que permita el desarrollo del embrión. Un ejemplo típico es el modelo de inducción de la ES de *Daucus carota*, en el cual el callo embriogénico y el mantenimiento de las suspensiones celulares obtenidas a partir de este callo ocurre en presencia de 2,4-D. Sin embargo, para que los embriones somáticos se formen y se desarrollen, se requiere transferir las PEMs a un medio libre de 2,4-D (Zimmerman *et al.*, 1993). Con lo cual se puede producir el desarrollo de los embriones. Hay casos en los que los embriones pueden continuar su desarrollo en el mismo medio de inducción (Conger *et al.*, 1989); sin embargo, los embriones somáticos obtenidos así tienen poca calidad. La transferencia de los embriones somáticos a un medio sin auxina exógena, posiblemente no garantiza un ambiente libre de auxinas para lograr la histodiferenciación apropiada, ya que los embriones somáticos tienen la capacidad de conjugar auxinas, las cuales son luego excretadas hacia el medio durante la histodiferenciación (Michalzuk *et al.*, 1992). Por lo tanto, se han aplicado tratamientos con carbón activado para absorber las auxinas segregadas por los tejidos al medio de cultivo; de esta forma los embriones somáticos han mostrado una morfología normal y han aumentado su capacidad de germinación (Ho y Vasil, 1983; Becwar *et al.*, 1989; Buchheim *et al.*, 1989).

1.2.1.3. Maduración de los embriones somáticos.

Durante la maduración, los embriones somáticos experimentan cambios morfológicos y bioquímicos. Estos se caracterizan por la deposición de sustancias de almacenamiento, represión de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación (Thorpe, 1995). Sin embargo, hay especies en las que los embriones somáticos no se desarrollan normalmente. En algunos casos germinan, pero no se convierten en plántulas normales. El desarrollo del embrión y la maduración pueden en ciertos casos interrumpirse por la germinación precoz, lo que provoca que las plántulas no se desarrollen normalmente (Jiménez, 2005).

Una de las estrategias para superar estos problemas ha sido el uso de RCVs, que permitan a los embriones somáticos alcanzar fases avanzadas de desarrollo, similares a las observadas en embriones cigóticos. Entre estos RCVs se encuentra el ABA, el cual se aplica en el medio de cultivo durante las fases finales para prevenir la germinación precoz. Esto ayuda a tolerar la desecación y mejorar la calidad de los embriones germinados (Mauri y Manzanera, 2004; García-Martín *et al.*, 2005). El uso de ABA simula en cierta forma, el incremento endógeno que ocurre de forma natural durante la maduración de los embriones cigóticos (Belefant- Miller *et al.*, 1994).

1.2.1.4 Germinación y conversión de los embriones somáticos

La germinación es el proceso fisiológico que puede definirse como los cambios metabólicos que empiezan con la hidratación de la semilla y terminan cuando la radícula se alarga y emerge de la cubierta seminal (Rojas-Aréchiga *et al.*, 1997). Mientras que la conversión es el desarrollo sincronizado de la raíz primaria y la formación del ápice caulinar con las hojas cotiledonares (Thorpe, 1995). La definición de germinación anteriormente mencionada no se puede aplicar a los embriones somáticos, ya que estos no poseen cubierta seminal. Por lo que quizá, la definición de germinación más apropiada en embriones somáticos, sería la emisión de radícula. En muchas especies de plantas, es difícil que ocurra la germinación de los embriones somáticos y su conversión a planta. Es precisamente en esta etapa en la que se han observado anomalías (Steintz *et al.*, 2003), que se han clasificado en tres categorías: (1) Embriones fusionados (Rodríguez y Wetzstein, 1994; Carraway y Merkle, 1997; Benelli *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001; Tomaz *et al.*, 2001); (2) Carencia de cotiledones, presencia de un solo cotiledón o cotiledones malformados (Carraway y Merkle, 1997; Jayasankar *et al.*, 2002); (3) Carencia de parte aérea o anomalías en la diferenciación del meristemo apical (Nickle y Yeung, 1993; Suhasini *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 1998; Stipp *et al.*, 2001; Jayasankar *et al.*, 2002). Las principales causas de estas anomalías, probablemente se deban a que los embriones somáticos presentan falta de maduración y falta de tolerancia a la desecación y la dormancia. Para lograr la conversión del embrión y mejorar la eficiencia de la regeneración a planta, se han evaluado diferentes estrategias, como la adición de agentes osmóticos, tales como: carbohidratos y azúcares alcohol. Los RCVs como el ácido giberélico (AG₃) se han empleado en el medio de cultivo durante la conversión de los embriones somáticos en plantas (Binzel *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2002; Junaid *et al.*, 2006). Es probable que el AG₃ sea necesario en los cultivos de embriones somáticos que experimentan dormancia (Choi *et al.*, 1999).

1.2.2 Embriogénesis somática en otras especies de la familia Solanaceae

Las especies *Nicotiana tabacum.*, *Lycopersicum esculentum* y *Solanum tuberosum* forman parte de la familia Solanaceae y son consideradas especies modelo, debido a su facilidad de regenerar órganos y eventualmente plantas completas *in vitro*. Por este motivo estas han sido ampliamente utilizadas para estudios de ingeniería genética. Sin embargo, los reportes de ES en estas especies son escasos, y se presentan limitaciones en la regeneración. *Solanum melongena* es la especie en la que hay mayor número de reportes de ES (Cuadro 1.2).

Autor	Especie	Exp.	Respuesta	RCV	Cond Inc.	Resultado
Stolarz <i>et al.</i> (1991)	<i>N. tabacum</i>	H	ESD	BA, ANA	FT. 25°C	2,900-6,900 ES/Explantos
Gill y Saxena (1993)	<i>N. tabacum</i>	H	ESD	TDZ	FT. 25°C	170 ES/Explantos
Gill <i>et al.</i> (1995)	<i>L. esculentum</i>	PI	ESD	BA	Luz cont. 25°C	20 ES/plántula
Newman <i>et al.</i> (1996)	<i>L. esculentum</i>	HP	ESD . ORG	BA	FT. 24°C	80% ES
Pretova y Dedicova (1992)	<i>S. tuberosum</i>	ECI	ESI, ESD	2,4-D	FT. 25°C	50% germinación
De García y Martínez (1995)	<i>S. tuberosum</i>	N	ES	2,4-D	FT. 23°C	-
JayaSree <i>et al.</i> (2001).	<i>S. tuberosum</i>	H	ESI	ZEA, BA	FT. 24°C	-
Seabrook y Douglas (2001)	<i>S. tuberosum</i>	N	ES	BA, TDZ	FT. 19°C	36 ES/Explantos
Kumar y Millam (2004)	<i>S. tuberosum</i>	I	ESI	2,4-D	FT. 20°C	-
Gledie <i>et al.</i> (1983)	<i>S. melongena</i>	H	ES	ANA	FT. 25°C	-
Gledie (1986)	<i>S. melongena</i>	H	ES	2,4-D	FT. 25°C	-
Gledie <i>et al.</i> (1986)	<i>S. melongena</i>	H	ES	2,4-D	FT. 25°C	-
Rotino <i>et al.</i> (1987)	<i>S. melongena</i>	H	ES	ANA	FT. 25°C	-
Fobert y Webb (1988)	<i>S. melongena</i>	H	ES	ANA	FT. 25°C	-
Ali <i>et al.</i> (1991)	<i>S. melongena</i>	HP	ES	2,4-D	FT. 25°C	-
Rao y Singh (1991)	<i>S. melongena</i>	H	ES	ANA, KIN	FT. 25°C	-
Saito y Nishimura (1994)	<i>S. melongena</i>	H	ESI	2,4-D	FT. 20°C	-
Tarré <i>et al.</i> (2004)	<i>S. melongena</i>	H	ESD	ANA	FT. 28°C	29% germinación

Cuadro 1.2 Embriogénesis somática en otras especies de la familia Solanaceae. Embriogénesis somática directa (ESD), Embriogénesis somática indirecta (ESI), Organogénesis (ORG), Embriogénesis somática y/o embriones somáticos (ES), Embrión cigótico inmaduro (ECI), Hoja (H), Plántula (PI), Nudo (N), Internudo (I), Explantos (Exp), Fotoperíodo (FT).

1.2.3 Embriogénesis somática en el género *Capsicum*

La regeneración de plantas en el género *Capsicum* por la vía de *ES* son escasos y no reproducibles (Khan *et al.*, 2006). En el Cuadro 1.3 se observa que la *ES* en *C. annum* se ha obtenido principalmente a partir de embrión cigótico maduro o inmaduro, siendo la eficiencia muy baja, de 6-19 embriones somáticos por explante (Harini y Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996 y Steinitz *et al.*, 2003).

Autor	Explante	Respuesta	RCV	Condiciones de incubación	Resultado
Harini <i>et al.</i> (1993)	EC	ESD	2,4-D	FT 24 ± 2°C	6-10 <i>ES</i> /explante
Binzel <i>et al.</i> (1996)	EC	ESD	2,4-D	FT 25 ± 2°C	5-6 <i>ES</i> /explante
Büyükalaca <i>et al.</i> (1996)	EC	ESI	2,4-D	FT 25°C ± 2°C	97% Conversión 48% Germinación
Kintzios <i>et al.</i> (2001)	H	ESI	2,4-D, BA	Oscuridad y FT. 25°C ± 2°C	72 <i>ES</i> /explante
Steinitz <i>et al.</i> (2003)	EC	ESD	Centrofenoquina, Quindlorac, 2,4-D	FT 25°C ± 1°C	6 <i>ES</i> /explante
Khan <i>et al.</i> (2006)	T y B	ESD	TDZ	FT 24 ± 2°C	16-22 <i>ES</i> /explante

Cuadro 1.3 Embriogénesis somática en el género *Capsicum*. Embriogénesis somática directa (ESD), Embriogénesis somática indirecta (ESI), Embriones somáticos (ES), Embrión cigótico (EC), Hoja (H), Tallo (T), Brote (B), Fotoperiodo (FT).

1.2.4 Estudios histológicos en la embriogénesis somática.

Las técnicas histológicas son ampliamente utilizadas en muchas áreas de investigación. El análisis estructural es importante para el estudio de la organización y cambios en el cuerpo de la planta; así como en el estudio de la morfogénesis. Los estudios histológicos han contribuido significativamente al entendimiento de los sistemas de cultivo *in vitro*, ya que dan información del proceso celular que permite proponer hipótesis de trabajo. Además la confirmación de la *ES* esta basada en la evidencia histológica. Por esta vía es posible corroborar que la estructura morfogénica es bipolar y no tiene conexión con el explante (Haccius, 1978).

La *ES* como sistema morfogénico permite investigar los procesos desde el inicio hasta el desarrollo de los embriones somáticos. Un error comúnmente observado en la literatura es reportar organogénesis como *ES*; de aquí la importancia de una observación cuidadosa de los estudios histológicos (Yeung, 1999).

1.2.4.1 Origen de la embriogénesis somática directa e indirecta

La *ES* puede ser directa o indirecta, como se mencionó anteriormente. La forma más significativa para definir directa o indirecta parece ser con referencia al estado epigenético de las células de los explantes. De esta manera, las células somáticas que son embriogénicas por sí mismas, tienden a experimentar la embriogénesis más fácilmente que las células vegetativas diferenciadas. Las células con más alto grado de diferenciación parecen requerir mayores cambios epigenéticos, haciendo que la iniciación de la embriogénesis sea menos directa. En estos términos, la ruta embriogénica es medida como la distancia epigenética de las células de los explantes a partir del estado embriogénico (Merkle *et al.*, 1990). Por lo que una de las distinciones importantes entre *ESD* e *ESI* depende del tiempo de diferenciación y adquisición de competencia. En la *ESD*, las células responden a tratamientos y comienzan a determinarse en un corto periodo de tiempo sin previa proliferación de las células. En cambio, la *ESI*, se requiere de un tiempo largo para adquirir el estado de competencia embriogénico. Este estado es a menudo precedido por la proliferación celular (Merkle *et al.*, 1990).

1.2.4.2 Adquisición de competencia embriogénica

En el cultivo de tejidos, las células competentes son reconocidas por sus respuestas a señales externas que activan rutas de desarrollo específicas (McDaniel, 1984). Se ha observado que un explante aislado, que no es intrínsecamente responsivo, adquiere competencia ante una señal inductiva (Finstad *et al.*, 1993). Esto sugiere que la competencia embriogénica puede ser adquirida a través de un proceso de desdiferenciación (Torrey, 1977), que puede estar asociado con la reiniciación del ciclo mitótico.

Las señales inductivas más importantes en la *ES* son los RCV, especialmente las auxinas, siendo el 2,4-D, la que más se ha utilizado. La respuesta específica de un tejido a la auxina y el tiempo necesario para la inducción del proceso, descrito por De Vries *et al.* (1988a), indica que la totipotencia no es una propiedad intrínseca de todas las células de la planta, pero puede ser adquirida por algunas células después de un tratamiento hormonal.

Guzzo *et al.* (1994), describieron la adquisición de competencia embriogénica de células de hipocotilo de *Daucus carota*, cultivadas *in vitro* en presencia de 2,4-D (Fig.1.4). Se observó que las diferentes capas celulares responden de forma diferente. Las células epidérmicas y parenquimáticas se alargaron o extendieron mostrando la típica respuesta a auxina, mientras que en los tejidos provasculares, las células se dividieron y expandieron, observándose un incremento en la masa citoplásmica y una

reducción del tamaño de la vacuola (Fig. 1.4b). Simultáneamente, se observaron divisiones a lo largo de los planos transversales y longitudinales, que originaron las masas. Posteriormente, estas proliferaron en células pequeñas isodiamétricas, emergiendo como una línea celular embriogénica a partir de la cual se formaron embriones somáticos.

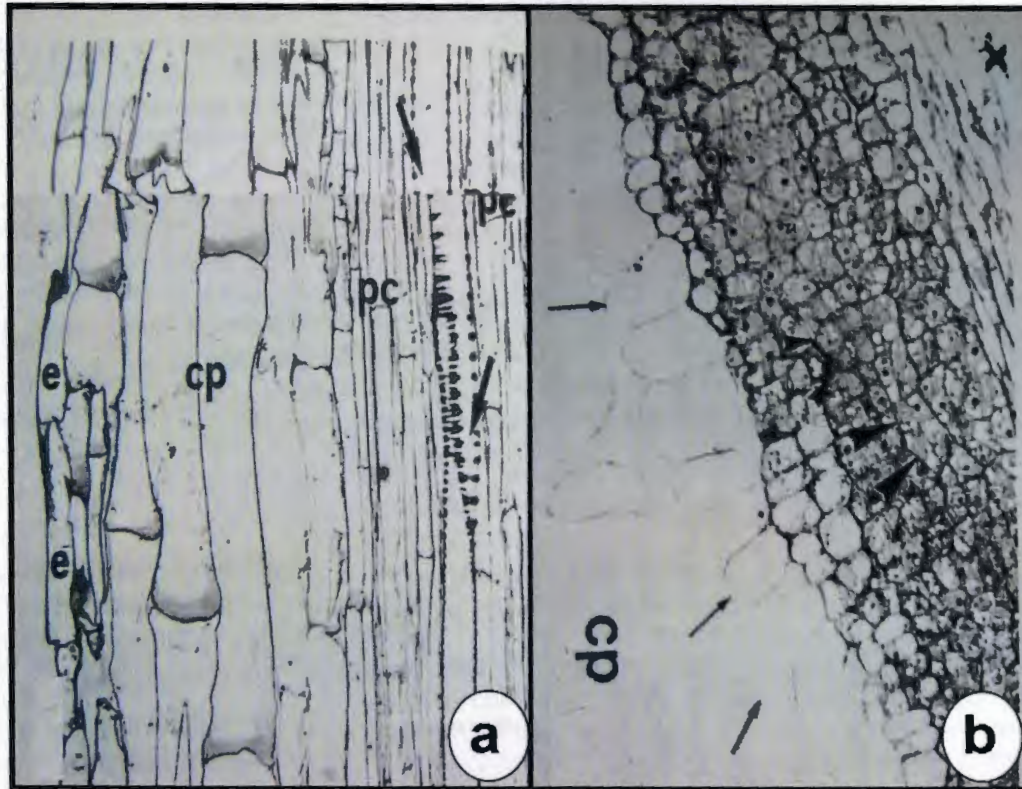


Figura 1.4 Adquisición de competencia embriogénica de células de hipocotilo de *Daucus carota*: (a) Sección longitudinal de hipocotilo obtenido de plántula de 7 días de edad, antes de la inducción, las flechas indican al tejido provascular, (b) Las células del parénquima cortical a los 7 días de cultivo en presencia de 2,4-D, presentan alargamiento (flechas largas) sin presentar proliferación, demostrando que éste tejido no contribuye a la formación de la línea celular embriogénica. En cambio las células provasculares presentan actividad mitótica (Puntas de flecha). Epidermis (e), Células parenquimáticas (cp), Células provasculares (pc), Xilema (xilema). Aumento: (a, b) 300X. Guzzo *et al.* (1994).

Raghavan (2004) describió a través de estudios histológicos los efectos que tiene el 2,4-D durante la inducción de la ES en embrión cigótico de *Arabidopsis* (Fig 1.5). En la Fig 1.5a se observa el aspecto del embrión cigótico en el día cero de inducción. En el cuarto día de cultivo, las células de la región meristemática apical y las que se

encuentran en los cotiledones del embrión cigótico comenzaron a dividirse dando lugar a la formación de capas de células adicionales (Fig. 1.5b). Al sexto día de cultivo se observó un mayor abultamiento en la zona meristemática apical debido a la división celular intensa (Fig. 1.5c), así como también un ensanchamiento en la zona cotiledonar (Fig 1.5d). En el octavo día se observó la formación temprana de los embriones somáticos indirectos a partir de callo formado en los cotiledones (Fig. 1.5e), los cuales posteriormente se desarrollaron hasta alcanzar los estadios globulares y acorazonados (Fig. 1.5f).

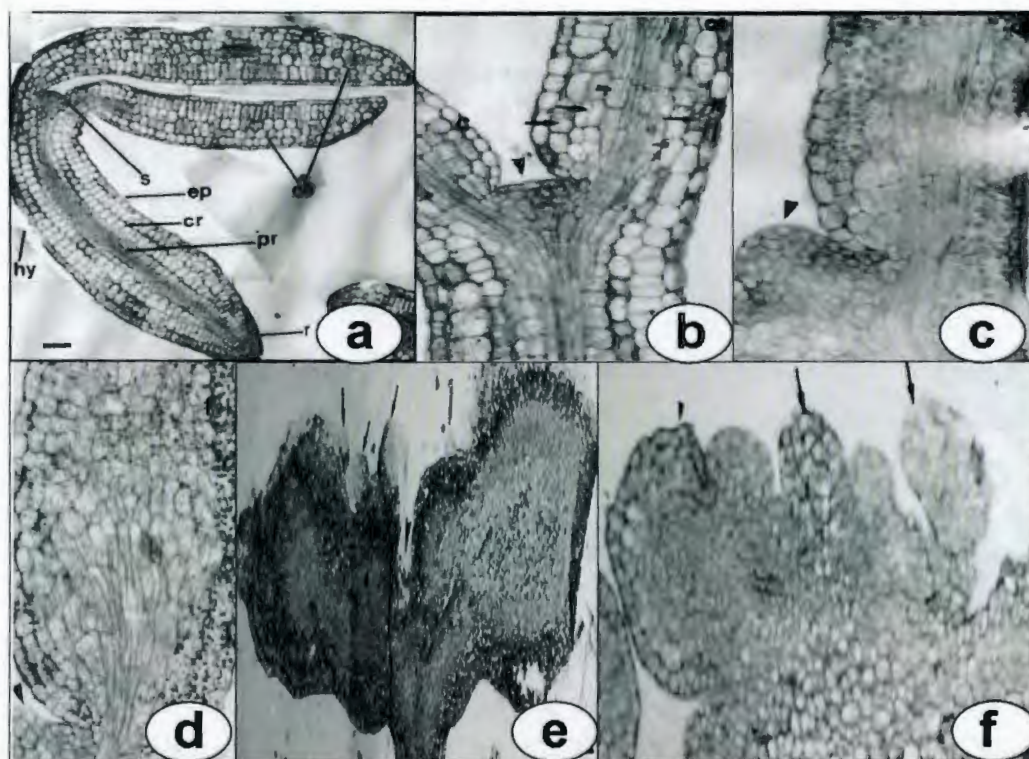


Figura 1.5 Efecto del 2,4-D durante la inducción de ES en embrión cigótico de *Arabidopsis thaliana*: (a) Embrión cigótico en el día cero de cultivo, (b) Células del meristemo apical (punta de flecha) y células de los cotiledones del embrión cigótico al cuarto día de cultivo, se observa que han comenzado a dividirse, (c) Abultamiento en la zona meristemática apical (punta de flecha), a los seis días de cultivo, (d) Cotiledón del embrión cigótico, presentando ensanchamiento, a los seis días de cultivo, (e) Formación temprana de los embriones somáticos (flechas) a los ocho días de cultivo, (f) Embriones globulares y acorazonados (flechas) a los diez días de cultivo. Epidermis (ep), Hipocotilo (hy); Procámbium (pr); Meristemo apical del brote (s), Capas corticales (cr). Barras: (a-f) 50 µm. Raghavan (2004).

1.2.4.3 Origen unicelular y/o multicelular de la embriogénesis somática

Los embriones somáticos pueden ser de origen unicelular. Quiroz *et al.* (2002), describió ES de origen unicelular obtenida en el cultivo de hojas de *Coffea arabica* (Fig 1.6). En este estudio se observó la primera célula embriogénica, la cual se identificó por mostrar un núcleo prominente (Fig. 1.6a). Posteriormente se observó la primera división celular que se caracterizó por su simetría, dando lugar a la formación de dos células (Fig. 1.6b), las cuales al dividirse formaron una tétrada de células (Fig. 1.6c). En el subsiguiente desarrollo se observó que las divisiones celulares dieron origen a un proembrión (Fig. 1.6d).

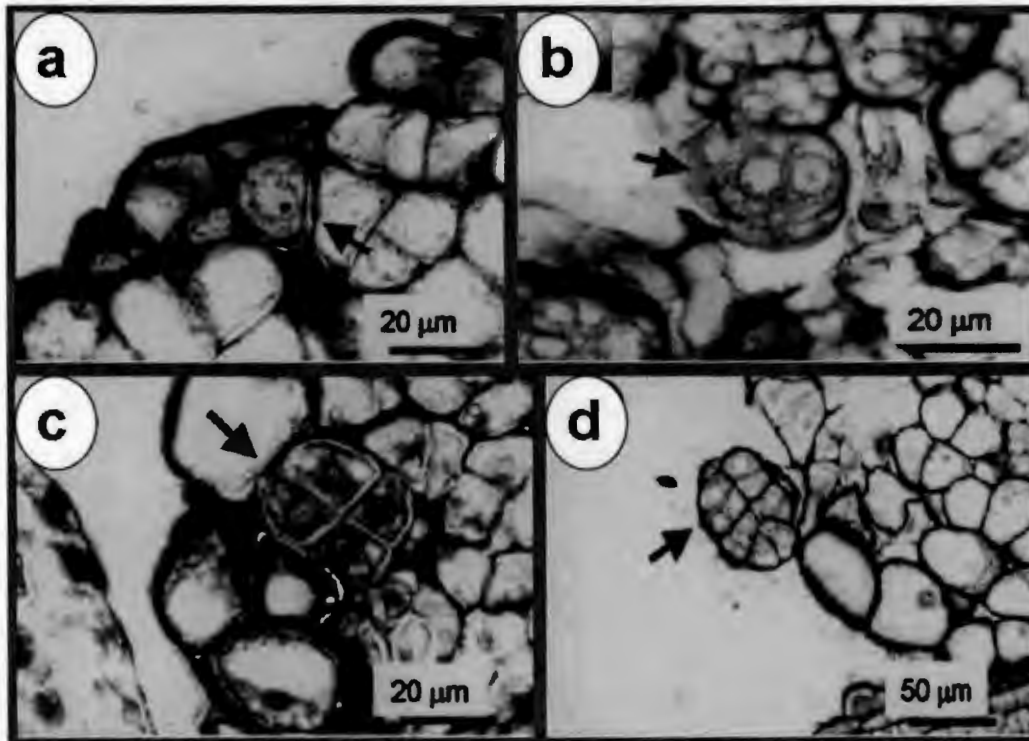


Figura 1.6 Cortes histológicos durante la ES de origen unicelular en *Coffea arabica*: (a) Célula embriogénica inicial, (b) Las dos primeras células del proembrión, (c) Las cuatro primeras células del proembrión, (d) Proembrión con ocho a doce células. Barras: (a-c) 20 μm , (d) 50 μm . Quiroz *et al.* (2002).

Los embriones somáticos también pueden tener origen multicelular (Lee *et al.*, 1997). En este trabajo se describió la formación de embriones somáticos a partir de cultivo de rizoma de *Musa spp.* Al octavo día de cultivo se observó que grupos de células adyacentes a los tejidos vasculares se desarrollaron formando masas celulares

embriogénicas (Fig 1.7a), que posteriormente formaron embriones globulares (Fig. 1.7b)

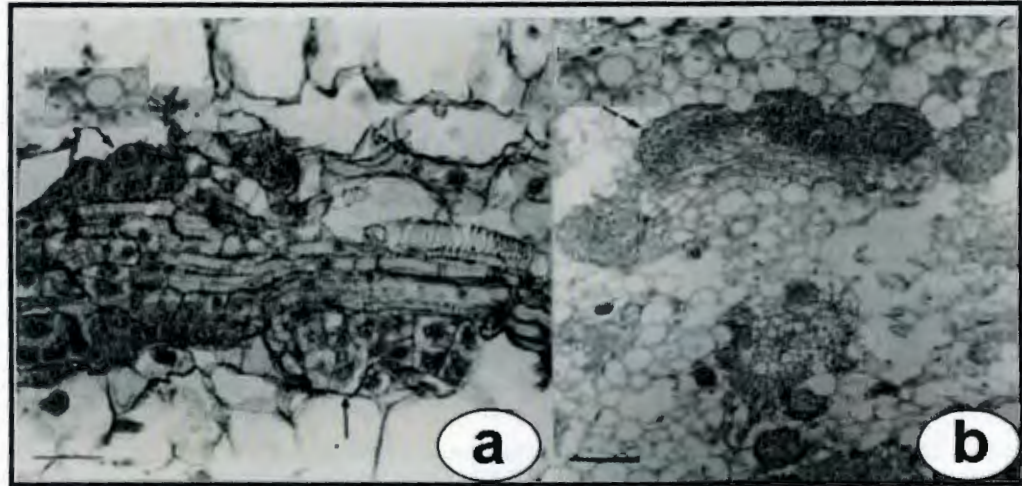


Figura 1.7 Cortes histológicos durante la ES de origen multicelular a partir de rizoma en *Musa spp.*: (a) Células proembriogénicas formándose en los haces vasculares del explante, (b) Embriones globulares. Barras: (a) 40 μm , (b) 150 μm . Lee *et al.* (1997).

1.2.4.4 Patrón de división celular

Las divisiones de las células que adquieren competencia embriogénica pueden ser de tipo anticlinal y/o periclinal. En algunos cultivos, como alfalfa se ha reportado diferentes patrones de formación de embriones somáticos en dependencia de la región del explante a partir de la cual se origina el embrión (Dos Santos *et al.*, 1983), esta variación en el patrón de división celular parece no tener influencia durante el desarrollo subsiguiente. Davidson (1991) sugiere que los embriones en desarrollo pueden integrar variaciones en el tamaño de la célula y en la orientación de la división, sin experimentar perturbaciones de desarrollo. Las diferencias observadas en la división celular pueden deberse a condiciones físicas impuestas a las células embriogénicas. Lintilhac y Vesecky (1984) postularon que las condiciones ambientales físicas pueden influir en la dirección de la división celular. Zegzouti *et al.* (2001) describieron división de tipo periclinal en células embriogénicas de hipocotilo de *Quercus robur* (Fig 1.8a), mientras que Mandal y Gupta (2003) observaron ES con división tipo anticlinal a partir de cultivo de cotiledones de *safflower* (Fig. 1.8b).

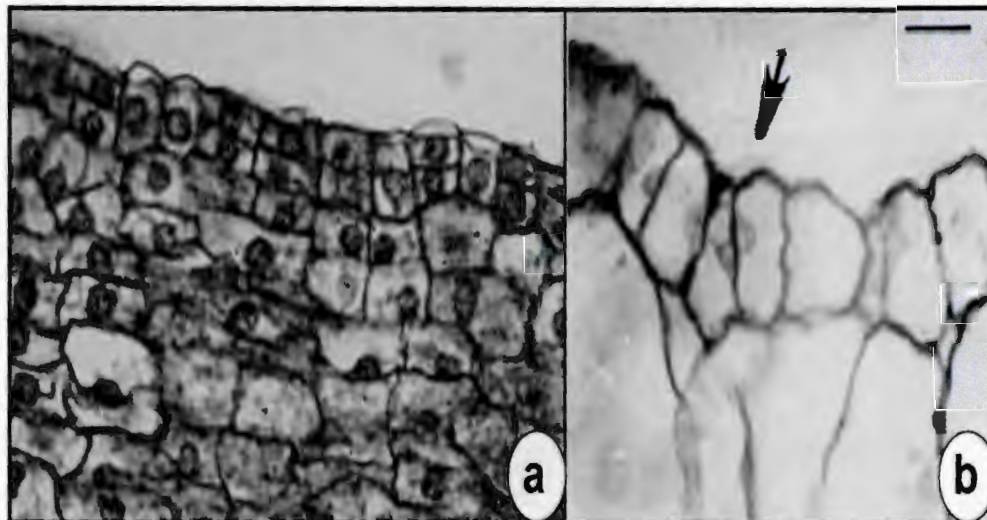


Figura 1.8 Patrones de división celular de las células embriónicas: (a) División celular periclinal en *Quercus robur*, Zegzouti *et al.* (2001), (b) División celular anticlinal en ES en *safflower*. Mandal y Gupta (2003).

1.2.4.5 Diferenciación de los embriones somáticos

El desarrollo del embrión es manifestado con cambios morfológicos, que van desde la forma globular, acorazonada, torpedo hasta alcanzar la cotiledonar. Además estos cambios se acompañan con el desarrollo de meristemas primarios como el protodermo, el tejido de crecimiento y el procámbium, así como los ápices de brote y raíz (Thorpe, 1995).

La forma globular marca el inicio de la diferenciación estructural. La histogénesis, comienza con la formación de un protodermo sobre el embrión globular. Se ha observado que la formación anormal del protodermo puede detener el desarrollo de los embriones somáticos (Thorpe, 1995).

En *Daucus carota*, McWilliam *et al.* (1974) observaron que las células del protodermo de los embriones somáticos globulares presentan mayores espacios entre ellas, a diferencia de las células del embrión cigótico que se observan más unidas. Por lo que el protodermo tiene tendencia de formar embriones secundarios en algunos casos. Por lo que el fenómeno de ESS posiblemente resulte de la ausencia de una completa diferenciación del protodermo (Dos santos *et al.*, 1983).

Schiavone y Cooke (1985) observaron que antes de la formación de la etapa acorazonada, la elongación axial de las células isodiamétricas internas del embrión globular controla la formación de la forma oblonga, sugiriendo que la formación de este embrión oblongo es la primera señal para la incipiente formación del procámbium.

Los embriones somáticos en la etapa pre-cotiledonar se caracterizan por tener regiones diferenciadas con protodermo y células procambiales, como describen Cangahuala-Inocente *et al.* (2004). Además estos embriones somáticos presentan los incipientes meristemos apical y radical. (Fig. 1.9)

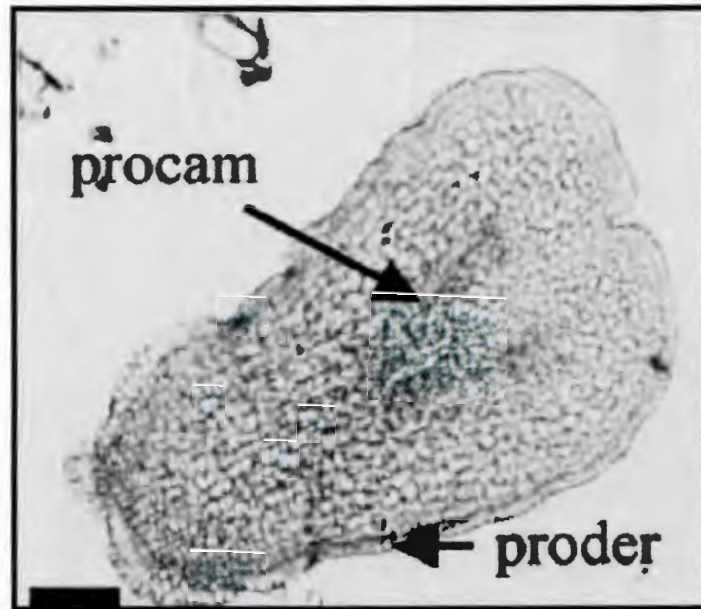


Figura 1.9 Corte histológico de embrión somático pre-cotiledonar obtenido de embrión cigótico de *Feijoa sellowiana*: Embrión somático con protodermo (proder) y zona procambial (procam). Barra 50 μm . Cangahuala-Inocente *et al.* (2004).

El siguiente evento morfogénico es la formación de los cotiledones y la clara definición del eje, usualmente observada en la etapa acorazonada. En las dicotiledóneas y las coníferas, los cotiledones emergen como pequeñas protuberancias provenientes de la región periférica de la parte terminal del embrión somático. En *ES* de *D carota* los primordios cotiledonares se componen de células densas isodiamétricas. En el progreso del desarrollo, los cotiledones crecen normalmente en tamaño, pero sin alcanzar al del embrión cigótico. En el desarrollo del embrión cigótico, el patrón de formación de los cotiledones es un evento predecible. Sin embargo, en la *ES* uno de los eventos que a menudo presenta mayores anomalías, involucra a la formación de los cotiledones, presentándose en algunos casos, un número variable de formas en el mismo cultivo Dos Santos *et al.* (1989) y Xu y Bewley (1992). En los embriones somáticos de soya se observaron problemas en la morfología de los cotiledones durante la germinación. En algunos casos los embriones somáticos muestran un solo cotiledón o cotiledones poli fusionados (Buchheim *et al.*, 1989). En *Olea europea*,

Benelli *et al.* (2001) observaron la formación de embriones somáticos con cotiledones poco desarrollados (Fig.1.10a) así como también embriones somáticos con una marcada degeneración en la base de los cotiledones (Fig 1.10b).

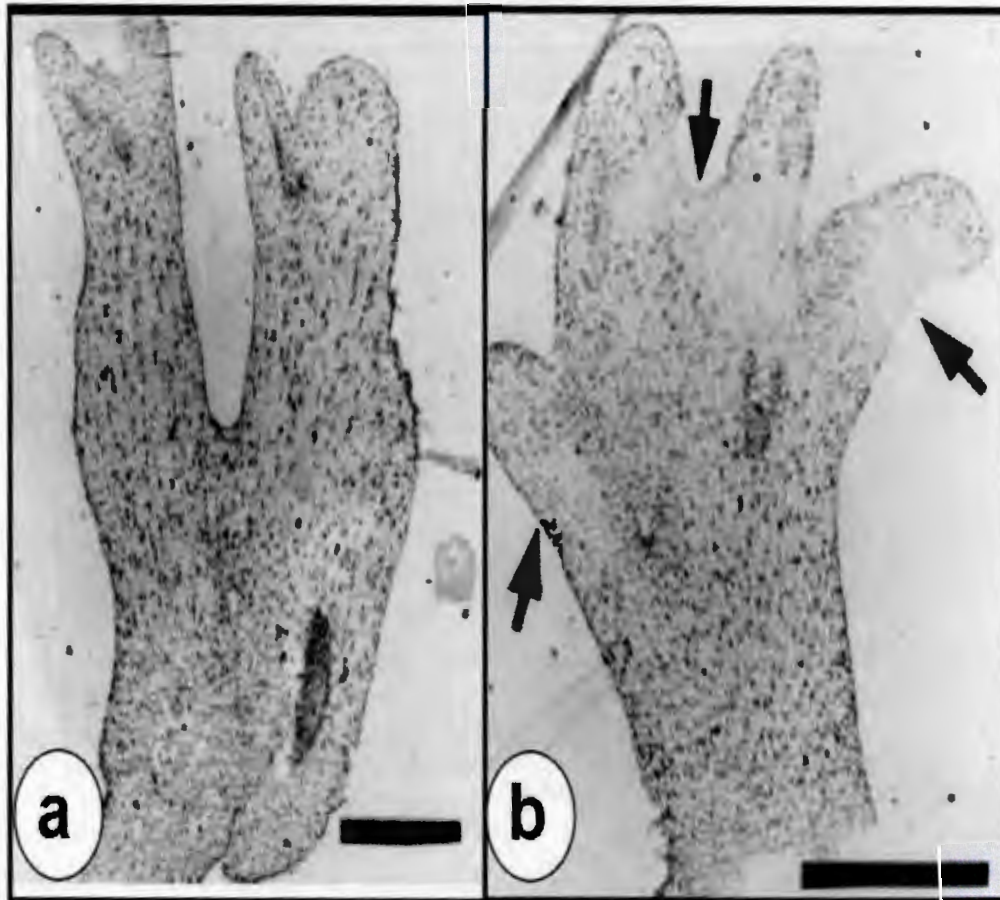


Figura 1.10 Cortes histológicos de embriones somáticos de *Olea europea*: (a, b) Embriones somáticos fusionados, las flechas indican la degeneración en la base de los cotiledones. Barras: (a, b) 1.1 μ m. Benelli *et al.* (2001).

1.2.4.6 Embriones somáticos germinados

La formación de los meristemos apicales es uno de los principales eventos en la ES. La calidad en los embriones somáticos y su capacidad para germinar con éxito depende del desarrollo apropiado de los meristemos. Se ha observado que los embriones que no logran convertirse a plantas, las células de sus ápices muestran

pronunciada vacuolación, estos embriones no son capaces de formar el meristemo y el primordio se torna necrótico, aunque las raíces se mantengan sanas (Fig. 1.11b). En cambio, los embriones que se convierten exitosamente se caracterizan por mantener en los ápices un núcleo y un citoplasma denso (Nickle y Yeung, 1993) (Fig. 1.11a).



Figura 1.11 Micrografía longitudinal del meristemo apical del brote de *Daucus carota*: (a) Meristemo apical de embrión cigótico maduro, con citoplasma denso y núcleo prominente, (b) Meristemo apical con grandes espacios intracelulares grandes, los embriones con este tipo de desarrollo mostraron poca germinación. Barras: (a, b) 40 μ m. Nickle y Yeung (1993).

1.2.4.7 Estudios histológicos de la embriogénesis somática en otras especies de la familia Solanaceae.

Entre los estudios histológicos de ES en algunas especies de la familia Solanaceae podemos citar en *Solanum tuberosum* a Pretova y Dedicova (1992), De García y Martínez, (1995) y Kumar y Millam (2004). De estos autores, únicamente Kumar y Millam (2004), demuestran la estructura propia de los embriones somáticos (Fig. 1.12). Por otra parte, Gill *et al* (1993, 1995) reportaron ES en *Nicotiana tabacum* (Fig 1.13) y en *Lycopersicum esculentum* (Fig. 1.14). Sin embargo, en ninguno de éstos reportes se logra observar la presencia de haces vasculares en el embrión somático y tampoco se demuestra la independencia de la estructura con el tejido materno. Por último, en *Solanum melongena*, Tarré *et al.* (2004) describen la formación de embriones somáticos directamente del tejido vascular del explante (Fig. 1.15).

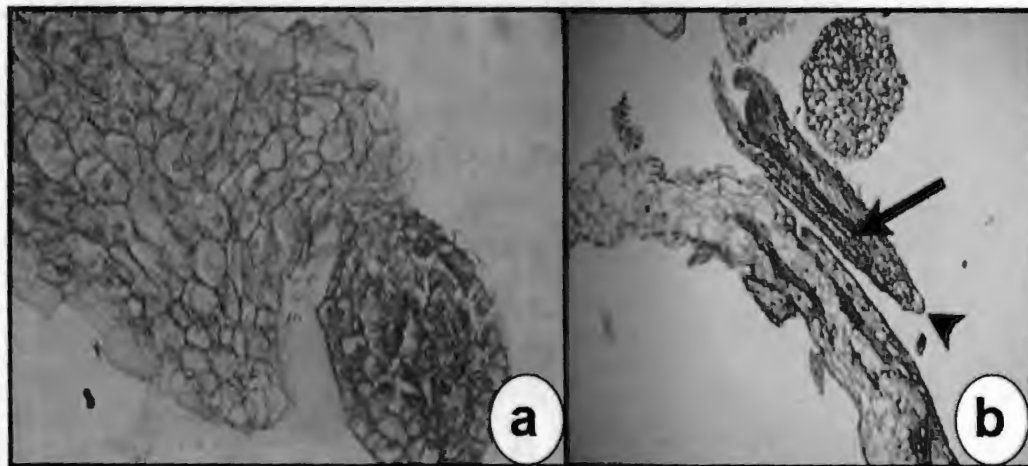


Figura 1.12 Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos en *Solanum tuberosum* a partir de nudo: (a) Embrión somático en etapa globular tardía, (b) Embrión somático con sistema vascular. Barras: (a) 60 μm , (b) 300 μm . Kumar y Millam (2004).

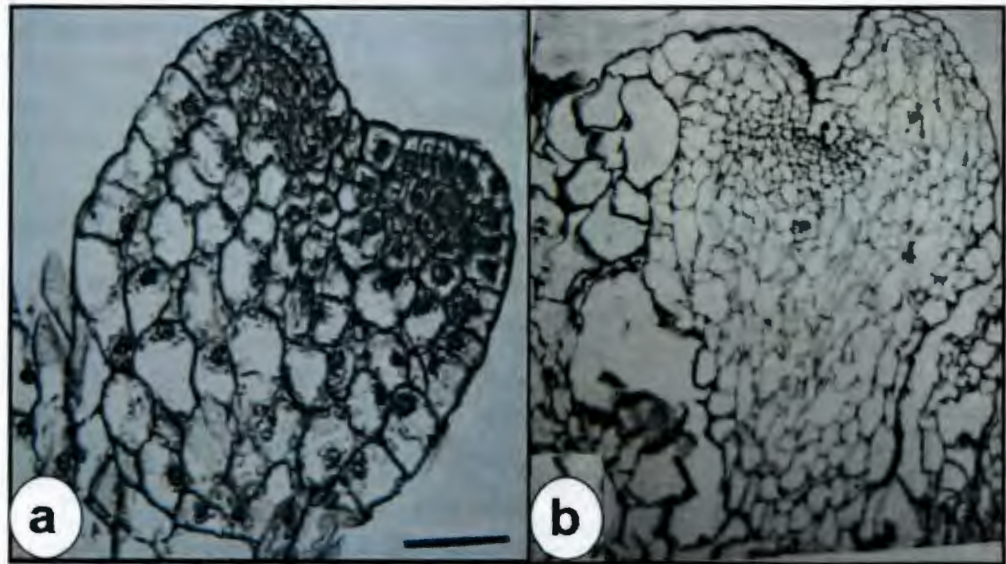


Figura 1.13 Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos formados de hoja de *Nicotiana tabacum*: (a) Estadio acorazonado, (b) Estadio cotiledonar tardío. Barras: (a, b) 100 μ m. Gill *et al.* (1993).

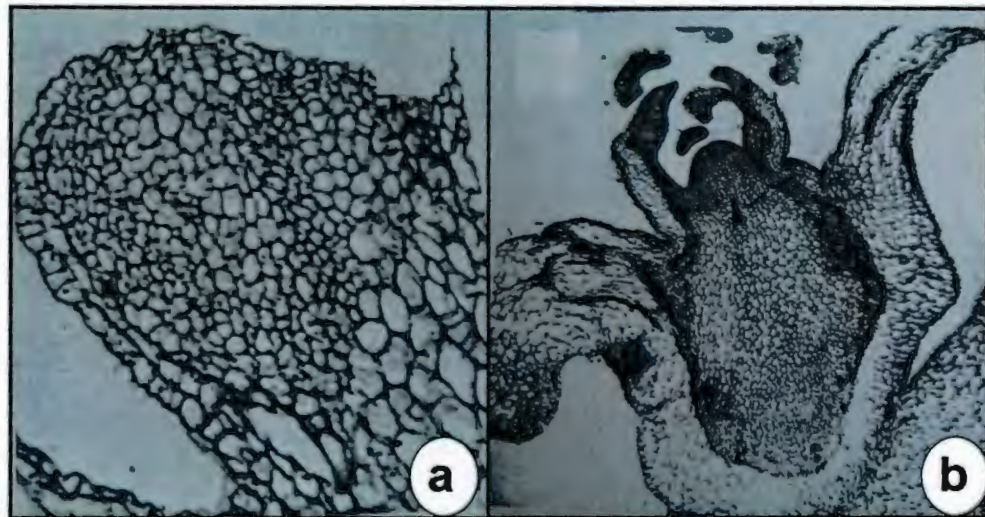


Figura 1.14 Cortes histológicos longitudinales en el proceso de ES a partir de hipocotilo de *Lycopersicon esculentum*: (a) Embrión somático globular originándose en la región subepidérmica, (b) Embrión somático maduro. Aumento: (a, b) 40X. Gill *et al.* (1995).

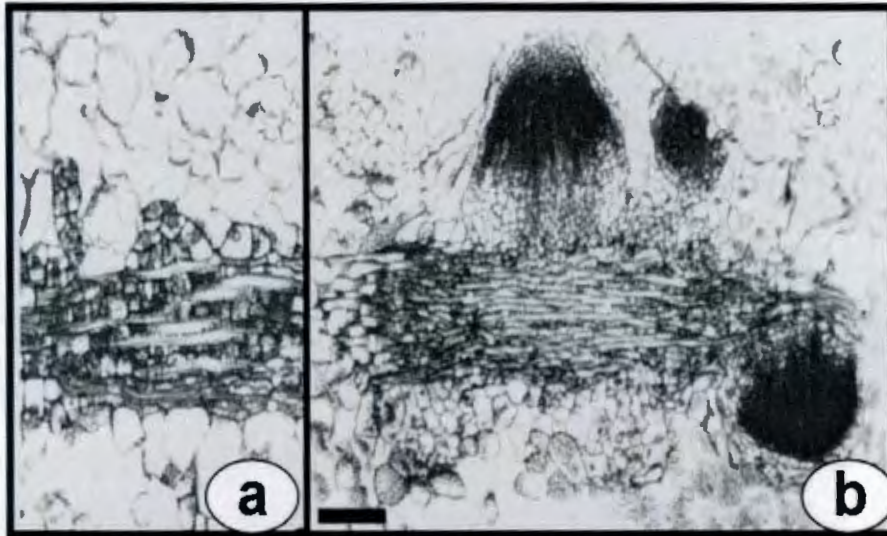


Figura 1.15 Cortes histológicos durante la diferenciación de embriones somáticos obtenidos de HC de *Solanum melongena*: (a) Proliferación celular a partir de los sacos vasculares a los 2 días de cultivo, (b) Proembriones originados directamente de los sacos vasculares a los 8 días de cultivo. Barras: (a) 82 μm ; (b) 139 μm ; (c) 94.73 μm . Tarré *et al.* (2004).

1.2.4.8 Estudios histológicos de la embriogénesis somática en *Capsicum annuum*

Los dos únicos reportes que incluyen análisis histológico durante la ES en *Capsicum annuum* Harini y Sita (1993) y Binzel *et al.* (1996), no realizaron una descripción detallada del proceso. Harini y Sita (1993), describen brevemente el proceso (Fig 1.16) y en ninguno de los trabajos se demuestra la independencia de las estructuras con respecto al tejido materno. Por otra parte Binzel *et al.* (1996), hacen una descripción un poco más detallada de los diferentes estadios de desarrollo de la ES (Fig. 1.17).

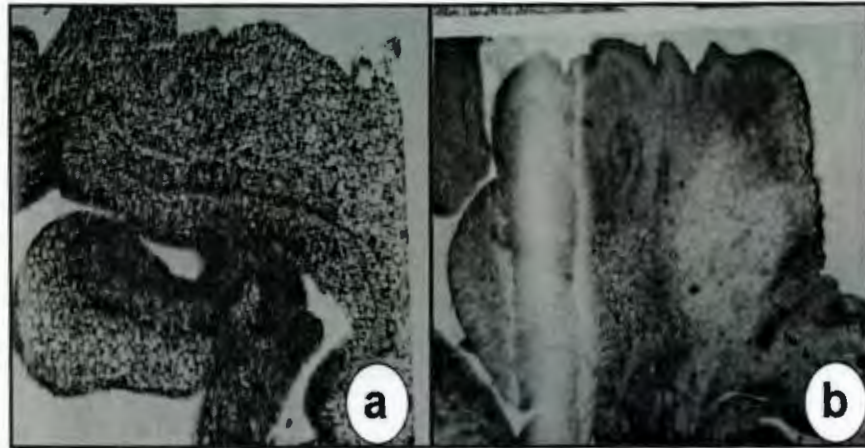


Figura 1.16 Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos a partir de embrión cigótico en *Capsicum annuum*: (a) Embrión somático globular a partir de EC, (b) Grupo de embriones formándose en el EC. Aumento: (a, b) 40X. Harini y Sita (1993).

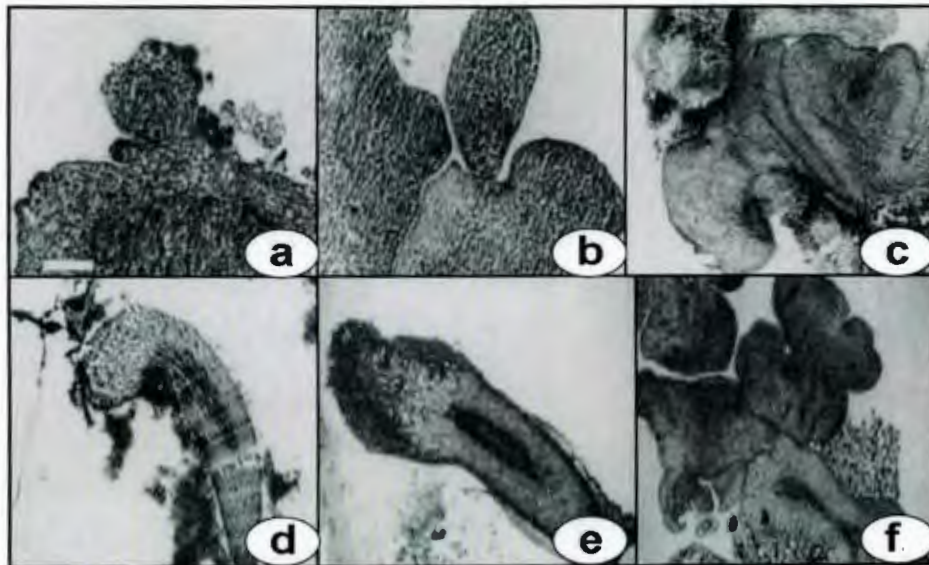


Figura 1.17 Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos a partir de embrión cigótico en *Capsicum annuum*: (a) Embrión somático globular en etapa temprana, (b) Embrión somático globular en etapa tardía, (c) Embrión somático acorazonado, (d, e) Embrión somático torpedo, (f) Embriogénesis somática secundaria. Barras: (a, b) 125 μm , (c, d) 250 μm , (e, f) 500 μm . Binzel *et al.* (1996).

1.2.5 Problemática

El chile habanero es un cultivo que ha adquirido importancia para el Estado de Yucatán. Sin embargo, aún no se cuenta con cultivares resistentes a numerosas plagas y enfermedades, las cuales ocasionan cada año, cuantiosas pérdidas de este preciado producto. Tomando en consideración este panorama, es necesario establecer un protocolo de regeneración vía *ES*, por constituir una herramienta indispensable para desarrollar técnicas de mejoramiento genético y multiplicación clonal de esta especie, por métodos biotecnológicos.

1.2.6 Objetivos

Objetivo general:

Estudiar el comportamiento de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante la embriogénesis somática *in vitro*, bajo diferentes condiciones de cultivo.

Objetivos específicos:

1. Determinar el explante más adecuado para la inducción de la embriogénesis somática de *Capsicum chinense* Jacq.
2. Definir la composición del medio de cultivo más adecuada para la inducción de la embriogénesis somática en *Capsicum chinense*.
3. Definir las condiciones de iluminación del cultivo:
 - Fotoperíodo
 - Oscuridad
4. Caracterizar, mediante las técnicas histológicas, el origen y desarrollo de los embriones somáticos de *Capsicum chinense*.

1.2.7 Bibliografia

- Agrawal S., Chandra N. and Kothari S. (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*C. annuum* L. var Mathania). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16: 47-55.
- Akula A., Becker D. and Bateson M. (2000). High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Rep.* 19: 1140–1145.
- Al-Dein E., Ramamneh A., Sridevy S. and Serek M. (2006). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *S. truncata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 333-342.
- Ali M., Okubo H. and Fujieda K. (1991). *In vitro* multiplication of intra and interspecific *Solanum* hybrids through somatic embryogenesis and adventitious organogenesis J. *Japan Soc. Hort. Sci.* 60: 601-612.
- Aloni R. (1995). The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. *In* PJ Davies, Ed. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam 531–546.
- Aydin Y., Talas T., Ipekç-Altas Z. and Gozukirmizi N. (2006). Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis. *Biologia Bratislava* 61 (3): 289-293.
- Becwar M., Noland T. and Wyckoff J. (1989). Maturation, germination and conversion of Norway spruce (*P. abies* L) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25, 275-281.
- Belefant-Miller H., Fong F. and Smith J. (1994). Abscisic acid biosynthesis during corn embryo development. *Planta* 195:17-21.
- Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. and Rugini E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*O. europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 76:112–119.
- Binzel M., Sankhla N., Joshi S. and Sankhla D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*C. annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15:536–540.
- Buchheim J. Colburn S. and Ranch J. (1989). Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89: 768-773.
- Büyükalaca S. and Mavituna F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:227–235.

- Cangahuala-Inocente G., Steiner N., Santos M. and Guerra M. (2004). Morphohistological and histochemistry *F. sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224:33-40.
- Carraway D. and Merkle S. (1997). Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. *Can. J. For. Res.* 27:1805–1812.
- Castillo B. and Smith M. (1997). Direct somatic embryogenesis from *B. gracilis* explants. *Plant Cell Rep.* 16: 385–388.
- Chen J. and Chang W. (2001). Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants on *Oncidium* 'Gower Ramsey'. *Plant Growth Regul.* 34:229-232.
- Choi Y., Yang D.C., Yoon E. and Choi K. (1999). High efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 18: 493–499.
- Choi M., Kim S. and Park Y. (2002). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Z. jujuba* var. *inermis* and *Z. jujuba* Miller. *Propagation of Ornamental Plants* 2 (1): 3-8.
- Conger B., Hovanesain J., Trigiano R. and Gray D. (1989). Somatic embryo ontogeny in suspension cultures of orchardgrass. *Crop Sci.* 29: 448-452.
- Cruz Hernández A., Witjaksono Litz R. and Lim M. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Rep.* 17 (6): 497-503.
- D'Onofrio C., Morini S. and Bellocchi G. (1998). Effect of light quality on somatic embryogenesis in quince leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53: 91–98.
- Davidson D. (1991). Cell division, in plant physiology a treatise. Growth and development. Ed. Academic press. San Diego 341.
- De García E. and Martínez S. (1995). Somatic Embryogenesis in *S. tuberosum* L. cv. Desirée from item nodal sections. *J. Plant Physiol.* 145:526-530.
- De Vries, S., Booij H., Meyerink P., Huisman G., Wilde D., Thomas T. and Van K. (1988a). A. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176:196-204.
- DeWitt D. and Bosland P. (1993). *The pepper garden*, Speed Press, Berkeley, CA. 240.

Dos Santos A., Cutter E. and Davey M. (1983). Origin and development of somatic embryos in *M. sativa* L. *Protoplasma*. 117: 107.

Dos Santos A. and Machado R. (1989). Scanning electron microscope study of *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 64: 293.

Fári M. and Czakó M. (1981). Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyls explants cultured in vitro. *Science Hort.* 15: 207-213.

Fehér A., Taras P. and Pasternak D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 201-228.

Finstad K. Brown D. and Joy K. (1993). Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34: 125-132.

Fiore C., Trabace T. and Sunseri F. (1997). High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 16: 295-298.

Fobert P. and Webb D. (1988). Effects of polyamines, polyamine precursors and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*S. melongena*) cotyledons. *Can J. Bot.* 66 (9): 1734-1742.

Fosket D. and Roberts L. (1964). Induction of wound-vessel differentiation in isolated coleus stem segments in vitro. *Am. J. Bot.* 51:19-25.

Fukuda H. and Komamine A. (1980). Establishment of an experimental system for the tracheary elements differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 65: 57-60.

Gaj M. (2002). Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *A. thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.* 37: 93-98.

Gaj M. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *A. thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.* 43: 27-47.

García-Martín G., Manzanera J. and González-Benito M. (2005). Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 171-177.

Gälweiler L., Guan G., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. and Palme K. (1998). Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* Vascular Tissue. *Science* 282 (5397):2226-2230.

Gill R., Malik K., Sanago H. and Saxena P. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*L. esculentum* Mill). *J. Plant Physiol.* 147: 273-276.

Gill R. and Saxena P. (1993). Somatic embryogenesis in *N. tabacum* L.: Induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultures leaf discs. *Plant Cell Rep.* 12: 154-159.

Gleddie S., Keller W. and Setterfield G. (1983). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *S. melongena* (eggplant). *Can J. Bot.* 61: 656-666.

Gleddie S. (1986). Plant regeneration and somatic hybridization in the genus *Solanum*. *Dissertation Abst. Int.B.* 47, 5: 1825.

Gleddie S., Keller W. and Setterfield G. (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspensions derived protoplasts of *S. melongena* (eggplant). *Can J. Bot.* 64:355-361.

Grossmann K. (2000). Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Sci.* 5: 506–508.

Gunay A. and Rao P. (1978). In vitro plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Sci. lett.* 11: 365-372.

Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Lo Schiavo F. and Terzi M. (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus Carota* L. *J. Exp. Bot.* 45 (279): 1427-1432.

Haccius B. (1978). Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphol.* 28, 74–81.

Hamidou F., May L. and Chee P. (2005). Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland Cotton. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81:91–95.

Harini I. and Sita L. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*C. annum* L). *Plant Sci.* 89:107–112.

Hatanaka T., Sawabe E. and Azuma T. (1995). The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *C. canefora*. *Plant Sci.* 107: 199-204.

Ho W. and Vasil I. (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*S. officinarum* L.) The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. *Protoplasma* 18: 169-175.

Huang X., Li X., Li Y. and Huang L. (2001). The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *M. sativa*. *Physiol. Plant.* 113: 424–429.

Hyde C. and Phillips G. (1996). Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chili pepper (*C. annuum*) via organogenesis. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 32: 72-80.

Ikeda-Iwai M., Satoh S. and Kamada H. (2002). Establishment of reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *J. Exp. Bot.* 53: 1575–1580.

Jayasankar S., Bondada B., Li Z. and Gray D. (2002). A unique morphotype of grapevine somatic embryos exhibits accelerated germination and early plant development. *Plant Cell Rep.* 20:907–911.

JayaSree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A., Reddy J. and Sadanandam A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64 (1): 13-17.

Jiménez V. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13 (2):196-223.

Jiménez V. and Bangerth F. (2001a). Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67: 37–46.

Jiménez V. and Bangerth F. (2001c). Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci.* 160: 247–257.

Jiménez V. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47:91–110.

Jo J., Choi E., Choi D. and Lee, K. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*C. annuum* L.). *J. Plant. Biol.* 39:127-135.

Junaid A., Mujib A., Bhat M. and Sharma M. (2006). Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *C. roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 325-332.

Kakkar R. and Sawhney V. (2002). Polyamines research in plants a changing perspective. *Physiol. Plant* 116: 281–292.

Kaldewey H. (1984). Transport and other modes of movement of hormones mainly auxins in *Hormonal Regulation of Development* Scott. Ed Heidelberg: Springer-Verlag 80-148.

- Kaldenhoff R., Henningsen U. and Richter G. (1994). Gene activation in suspension-cultured cells of *A. thaliana* during blue-light-dependent plantlet regeneration. *Planta* 195:182–187.
- Kelley R., Zipf A., Wesenberg D. and Sharma G. (2002). Putrescine-enhanced somatic embryos and plant numbers from elite oat (*A. spp.* L.) and reciprocal crosses. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 508–512.
- Khan H., Siddique I. and Anis M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *C. annuum*. *Biologia Plantarum* 50, 4: 789-792.
- Kikuchi A., Sanuki N., Higashi K., Koshiha T. and Kamada H. (2006). Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223: 637–645.
- Kintzios S., Drossopolous J. and Lympelopoulos C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67:55–62.
- Klee H., Horsch R., Hinchee M., Hein M. and Hoffmann N. (1987). The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev* 1: 86–96.
- Kong L. and Yeung E. (1994). Effects of ethylene and ethylene inhibitors on *White spruce* somatic embryo maturation. *Plant Sci.* 104: 71–80.
- Kumar P., Joy R. and Thorpe T. (1989). Ethylene and carbon dioxide accumulation and growth of cell suspension cultures of *P. glauca*. *J. Plant Physiol.* 135: 592–596.
- Kumar S. and Millam S. (2004). Somatic embryogenesis in *S. tuberosum* L.: A histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep.* 23:115-119.
- Lee K., Zapata K., Brunner H. and Afza R. (1997). Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 1-8.
- Li Z. and Burrit D. (2003). Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *D. glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regul.* 40: 65–74.
- Li D., Zhang J., Zhao J., Zhang Y., Chen F., Zhu J., Liu S. and Yang Z. (2006). Plant regeneration via somatic embryogenesis of *E. sibiricus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 285–292.
- Lintilhac P. and Vesecky T. (1984). Stress-induced alignment of division plane in plant tissues grown *in vitro*. *Nature* 307: 363.

Litz R. and Yurgalevitch C. (1997). Effects of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, aminoethoxyvinylglycine, methylglyoxal bis-(guanylhydrazone) and dicyclohexylammonium sulfate on induction of embryogenic competence of mango nucellar explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 171–176.

Liu W., Parrott W., Hildebrand D., Collins G. and Williams E. (1990). *Agrobacterium*-induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. *Plant Cell Rep.* 9:360-364.

Liu C., Xu Z. and Chua N. (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5: 621–630.

López-Puc G., Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P., Montalvo-Peniche M., Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2006). Direct Somatic Embryogenesis: A Highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*C. chinense* Jacq.). *HortScience* 41 (7): 1645-1650.

Mandal A. and Gupta D. (2003). Somatic embryogenesis of safflower: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 27-31.

Marks T. and Simpson S (1999). Effect of irradiance on shoot development *in vitro*. *Plant Growth Regul.* 28: 133–142.

Martinelli L., Candioli E., Costa V., Poletti D. and Rascio N. (2001). Morphogenic competence of *Vitis rupestris* S. secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Rep.* 20:279–284.

Mauri P. and Manzanera J. (2004). Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Q. ilex* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40: 495–498.

McDaniel C. (1984). Competence, determination and induction in plant development. Pattern formation. Macmillan. New York 393–412.

McWilliam A., Smith S. and Street H. (1974). The origin and development of embryos in suspensions cultures of carrot (*Daucus carota*). *Ann. Bot* 38: 243.

Merkle S., Parrot W. and Williams E. (1990). Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. *Plant tissue culture: Applications and limitations.* Amsterdam Ed. Elsevier. 67-101.

Michalczyk L., Ribnicky D., Cooke T. and Cohen D. (1992). Regulation of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Carrot Cell Cultures. *Plant Physiol.* 100:1346-1353.

Michalczuk L. and Druart P. (1999). Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of cherry rootstock (*P. incisaserrula* 'GM 9') and in hormone-dependent, non-embryogenic calli of *P. incisaserrula* and *P. domestica*. *Physiol. Plant* 107: 426–432.

Mikula A., Fiuk A. and Rybczyński J. (2005). Induction, Maintenance and Preservation of embryogenic competence of *G. Cruciata* L. cultures. *Acta Biologica Craciviensa Series Botánica* 47 (1): 227-236.

Minocha C., Papa N., Khan J. and Samuelsen A. (1991). Polyamines and somatic embryogenesis in carrot. III. Effects of Methylglyoxal bis (guanyhydrzone). *Plant Cell Physiol.* 32 (3): 395-402.

Montague M., Koppenbrink J. and Jaworski E. (1978). Polyamine Metabolism in Embryogenic Cells of *Daucus carota* I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.* 62: 430-433.

Montague M., Armstrong T. and Jaworski E. (1979). Polyamine Metabolism in Embryogenic Cells of *Daucus carota* II. Changes in arginine decarboxylase activity. *Plant Physiol.* 63: 341-345.

Morris D. and Thomas A. (1978). A micro autoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings. *J Exp Bot* 29: 148–157.

Murch S., Victor J. and Saxena P. (1999). The role of proline in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of *peanut*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 102-105.

Nakagawa R., Ogita S., Kubo T. and Funada R. (2006). Effect of polyamines and L - ornithine on the development of proembryogenic masses of *C. japonica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85 (2):229-234.

Nickle C. and Yeung E. (1993). Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *D.carota*. *Am. J. Bot.* 80:128–1291.

Nishiwaki M., Fujino K., Koda Y., Masuda K. and Kikuta Y. (2000). Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. *Planta* 211: 756–759.

Nissen P. (1994). Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiol. Plant* 92: 397–403.

Newman P., Krishnaraj S. and Saxena P. (1996). Regeneration of Tomato (*L. esculentum* Mill.): Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyls explants induced with 6-benziladenine. *Int. J. Plant Sci.* 157 (5): 554-560.

Ochoa-Alejo N. and Ireta-Moreno L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*C. annuum* L.) cultured *in vitro*. *Sci Hort.* 42: 21-28.

Okada K., Ueda J., Komaki M., Bell C. and Shimura Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* 3: 677-684.

Padmanabhan K., Cantliffe D., Harrell R. and McConnell D. (1998). A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato (*I. batatas*) using computer vision histological analysis. *Plant Cell Rep.* 17:685-692.

Pasternak T., Prinsen E., Aydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H., Dudits D. and Fehér A. (2002). The role of auxins, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiol.* 129: 1807-1819.

Paul H., Belaizi M. and Sangwan B. (1994). Somatic embryogenesis in apple. *J. Plant Physiol.* 143: 78-86.

Pérez R., Navarro L. and Durán N. (1997). Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several *Citrus* species and cultivars. *Plant Cell Rep.* 17 (1): 44-49.

Phillips G. and Hubstenberger J. (1985). Organogenesis in pepper tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4: 261-269.

Pretova A. and Dedicova B. (1992). Somatic embryogenesis in *S. tuberosum* L. cv. Derriere from unripe zygotic embryos. *J. Plant Physiol.* 139: 539-542.

Pullman G., Zhang Y. and Phan B. (2003). Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 22: 96-104.

Quiroz-Figueroa R., Fuentes-Cerda C., Rojas-Herrera R. and Loyola-Vargas V. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *C. arabica*. *Plant Cell Rep.* 20:1141-1149.

Raemarkers C., Jacobsen E. and Visser R. (1995). Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.

Raghavan V. (2004). Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *Amer.J. of Bot.* 91 (11): 1743-1756.

- Rao P. and Singh B. (1991). Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *S. melongena* L. *Plant Cell Rep.* 10: 7-11.
- Rodríguez A. and Wetzstein H. (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*C. illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion in plants. *Plant Cell Rep.* 13:607–611.
- Rojas-Aréchiga M., Orozco-Segovia, A. and Vázquez- Yanes, C. (1997). Effect of light on germination of seven species of cacti from Zapotitlán Valley in Puebla, México. *J. Arid Environments* 36: 571-578.
- Romano C., Hein M. and Klee H. (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. *Genes Dev* 5: 438–446.
- Rotino G., Falavigna A., Fiume F., Nervo G. and Restaino F. (1987). Possibility of eggplant (*S. melongena* L.) improvement through in vitro techniques. *Genet. Agraria* 41: 314-315.
- Roustan J., Latche A. and Fallot J. (1989). Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.* 8: 182–185.
- Roustan J., Latche A. and Fallot J. (1990a). Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. *Biol. Plant* 32: 273–275.
- Rudús I., Kepczynská E. and Kepczynski J. (2006). Comparative efficacy of abscisic acid and methyl jasmonate for indirect somatic embryogenesis in *M. sativa* L. *Plant Growth Regul.* 48:1–11.
- Rugkhla A. and Jones M. (1998). Somatic embryogenesis in plantlet formation in *S. album* and *S. spicatum*. *J. of Exp. Bot.* 49, (320): 563-571.
- Saito T. and Nishimura S. (1994). Improved culture conditions for somatic embryogenesis using an aseptic ventilate filter in eggplant (*S. melongena* L.). *Plant Sci.* 102: 205-211.
- San José M. and Vieitez A. (1993). Regeneration of Camellia plantlets from leaf explant culture by embryogenesis and caulogenesis. *Sci. Hort.* 54: 303–315.
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M., Zapata- Castillo P., Solís-Ruíz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O. and Miranda-Ham M. (2005). Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40:1829–1831.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias- Andreu L., Montalvo-Peniche., López-Puc G. and Barahona-Pérez G. (2006). Improvement of in vitro culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41:405–409.

Santos K., Mudstock E. and Bodanese-Zanettini M. (1997). Genotype-specific normalization of soybean somatic embryogenesis through the use of an ethylene inhibitor. *Plant Cell Rep.* 16: 859–864.

Schiavone F. and Cooke T. (1985). A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell cultures. *Can J. Bot* 63: 1573.

Schiavone F. and Cooke T. (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differ.* 21:53–62.

Seabrook J. and Douglass L. (2001). Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. *Plant Cell Rep.* 20:175–182.

Sharp W., Evans D. and Sondahl M. (1982). Application of somatic embryogenesis to crop improvement in plant tissue culture. Proceedings of the fifth international congress of plant tissue culture, Fujiwara A., Ed., Japanese Association for Plant Tissue Culture 759.

Sheldrake A. and Northcote D. (1968). The production of auxin by tobacco internode tissues. *New Phytol* 67: 1–13.

Stasolla C., Kong L., Yeung E. and Thorpe T. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38: 93–105.

Steinitz B., Küsek M., Tabib Y., Paran I. and Zelcer A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39:296–303.

Stipp L., Mendes B., Piedad S. and Rodríguez A. (2001). In vitro morphogenesis of *C. melon* var. inodorus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65:81–89.

Stolarz A., Macewicz J. and Lörz H. (1991). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *N. tabacum* L. *J. Plant Physiol.* 137: 347-357.

Suhasini K., Sagare A. and Krishnamurthy V. (1996). Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*C. arietinum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32:6–10.

Tarré E., Magioli C., Margis-Pinheiro M., Sachetto-Martins G., Mansur E. and Santiago-Fernandez L. (2004). *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root

initiation have a common origin in eggplant (*S. melongena* L.). *Revista Brasil. Bot.* 27 (1): 79-84.

Thomas C., Bronner R., Molinier J., Prinsen E., Van Onckelen H. and Hahne G. (2002). Immuno-cytochemical localization of indole-3- acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta* 215: 577–583.

Thorpe E. (1995). *In Vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academia Publishers. Netherlands.

Tomaz M., Mendes B., Filho F., Demetrio C., Jansakul N. and Rodriguez A. (2001). Somatic embryogenesis in *Citrus* spp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:446–452.

Torne J., Moysset L., Santos M. and Simon E. (2001). Effects of light quality on somatic embryogenesis in *A. sercifera*. *Physiol. Planta* 111: 405–411.

Torres H. and Franco C. (2005). Seminario de Chile Habanero Memoria INIFAP.

Torrey J. (1977). Cytodifferentiation in cultured cells and tissues. *HortScience* 12: 14–15.

Tun Dzul J. (2001) Chile habanero: características y tecnología de producción. INIFAP.

Tykarska T. (1979). Rape embryogenesis II: Development of embryo proper. *Acta Soc. Bot. Pol.* 48: 391-421.

Ugglä C., Moritz T., Sandberg G. and Sundberg B. (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Plant Biol.* 93: 9282-9286.

Vicent C. and Martínez, F. (1998). The potential uses of somatic embryogenesis in agroforestry are not limited to synthetic seed technology. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal* 10 (1): 1-12.

Visser C., Qureshi J., Gill R. and Saxena P. (1992). Morphoregulatory role of thidiazuron. *Plant Physiol.* 99: 1704-1707.

Von Arnold S., Clapham D., Egertsdotter U. and Mo L. (1996). Somatic embryogenesis in conifers a case study of induction and development of somatic embryos in *P. abies*. *Plant Growth Regul.* 20: 3–9.

Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J. and Filonovan L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233–249.

Wangermann (1974). The pathway of transport of applied IAA through internode segments. *New Phytol* 73: 623–636.

Williams E. and Maheswaran G. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany* 57:443–462.

Xu N. and Bewley J. (1992). Contrasting pattern of somatic and zygotic embryo development in alfalfa (*M. sativa*) as revealed by scanning electron microscopy. *Plant Cell Rep.* 11:279.

Yadav J. and Rajam M. (1997). Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *S. melongena* L. associated with differential morphogenetic capacity: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J. of Exp. Bot.* 48 (313): 1537-1545.

Yadav J. and Rajam M. (1998). Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.* 116: 617–625.

Yeung E. (1999). The use of histology in the study of plant tissue culture systems – some practical comments. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 35: 137-143.

Zapata-Castillo P., Canto Flick A., López-Puc G., Solís-Ruiz A., Barahona-Pérez F., Iglesias-Andreu L. and Santana-Buzzy N. (2007). Somatic Embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* J.) from Cell Suspensions. *HortScience* 42 (2):329–333.

Zegzouti R., Arnould M. and Favre J. (2001). Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Q. robur* L. *Ann. For. Sci.* 58 681–690.

Zelena E. (2000). The effect of light on metabolism of IAA in maize seedlings. *Plant Growth Regul.* 30: 23–29.

Zhang B., Feng R., Liu F. and Wang Q. (2001). High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite chinese cotton variety. *Bot. Bull. Acad. Sin* 42:9-16.

Zimmerman J. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411–1423.

Faint, illegible text at the top of the page.

Faint, illegible text in the second section.

Faint, illegible text in the third section.

Faint, illegible text in the fourth section.

Faint, illegible text in the fifth section.

Faint, illegible text in the sixth section.

Faint, illegible text in the seventh section.

Faint, illegible text in the eighth section.

Faint, illegible text in the ninth section.

Faint, illegible text in the tenth section.

Faint, illegible text in the eleventh section.

CAPÍTULO 2

DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS: A HIGHLY EFFICIENT PROTOCOL FOR *IN VITRO* REGENERATION OF HABANERO PEPPER (*Capsicum chinense* Jacq.).

Guadalupe López-Puc, Adriana Canto-Flick, Lourdes Iglesias-Andreu, Felipe Barredo-Pool, Patricia Zapata-Castillo, María del C. Montalvo-Peniche, Felipe Barahona-Pérez and Nancy Santana-Buzzy.

Este artículo fue publicado en HortScience 41, 7: 1645-1650.

Additional index words

Capsicum chinense Jacq., *Habanero pepper*, *direct somatic embryogenesis*, *histological analysis*.

2.1 Abstract

To induce somatic embryogenesis in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), the cultivar BVII-03, belonging to the red type, was used. Different explants were evaluated, as were different culture media, the composition of which varied in the content of plant growth regulators. Results showed the formation of somatic embryos from cotyledons, zygotic embryos, germinated zygotic embryos, hypocotyls, and cotyledonary leaves. Explants were cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with 2,4-D (9.05 μM). The somatic embryos always formed directly from the explant, without callus formation, and the greatest efficiency was obtained when segments of hypocotyls were cultured, obtaining 175 ± 20 somatic embryos per explant. Only the somatic embryos obtained on Murashige and Skoog medium containing 2,4-D (9.05 μM) and treated with abscisic acid (1.89 μM) before their transfer to the germination media (Murashige and Skoog + 1.1 μM GA₃) emitted their radicle and expanded their cotyledonary leaves (60%), whereas the remaining embryos did not achieve germination because of different causes (abnormalities, delayed development). Not only is this protocol of somatic embryogenesis the first to be reported for this species (*C. chinense* Jacq.), but it is also the most efficient reported so far, within the *Capsicum* genus.

2.2 Introduction

All chili peppers belong to the *Capsicum* genus of the Solanaceae family. There are 27 species of *Capsicum*, but only five of these have been domesticated and cultivated: *C. annum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* Linné, and *C. pubescens* Ruiz and Pavón. *C. chinense* or Habanero pepper, as it is known in México and other parts of the world, differs from the rest of the peppers in the higher level of pungency in the fruit, which is recognized as the hottest (the most spicy) known (DeWitt and Bosland, 1993). Although the point of origin of *C. chinense* is located in the Amazon (Greenleaf, 1986), the Yucatán Peninsula, in Mexico, is considered to be the center of genetic diversity for this species given the great variety of shapes, size, color, taste, aroma, and pungency of its cultivars. Besides being consumed fresh and processed, because of its high capsaicin content, it is also the raw material for the elaboration of medicines, spray repellent, anticorrosives, cosmetics, and shampoo. Although cell culture and plant regeneration have been achieved in many members of the Solanaceae family, *Capsicum* is still considered to be a genus recalcitrant to *in vitro* morphogenesis. Most of the regeneration methods reported for *C. annum* L. involve direct organogenesis from cotyledons and hypocotyls. The major problem in the process of *in vitro* regeneration is shoot elongation, which occurs more often in hot pepper and in *C. frutescens* than sweet pepper varieties (Franck–Duchenne *et al.*, 1998). There are very few reports of somatic embryogenesis in *C. annum* (Binzel *et al.*, 1996; Büyükalaca and Mavituna, 1996; Harini and Sita, 1993; Jo *et al.*, 1996; Steinitz *et al.*, 2003), in which somatic embryos have been obtained, and the majority of these have been from immature or mature zygotic embryos. The only report of somatic embryogenesis in the genus, using leaf explants, was carried out quite recently by Kintzios *et al.* (2001). To date, there are two reports of plant regeneration in Habanero pepper via organogenesis (Santana–Buzzy *et al.*, 2005, 2006), in which the inhibition of the effects of ethylene was also studied. Somatic embryogenesis has not previously been described in *C. chinense* Jacq. This is the first report of a protocol of regeneration via direct somatic embryogenesis from *Capsicum chinense* Jacq. It is convenient to obtain somatic embryos that develop directly from the explants, because there is a greater tendency for them to be genetically more uniform than the embryos generated from the callus (Maheswaran and Williams, 1984). Conventional breeding is a long process with problems of interspecific incompatibility on many occasions. Somatic embryogenesis can offer efficient solutions to these problems, particularly when there is a need to recover and propagate plants in large numbers from genetically transformed plant cells (Büyükalaca and Mavituna, 1996). Habanero pepper has much demand on an international scale, because it has multiple uses. Nevertheless, the diseases and the lack of efficient strategies to obtain improved cultivars have made it impossible to cover its demand from the different industries that require the product. The aim of this study was to establish a protocol of somatic embryogenesis, as a basic tool for the genetic transformation of plants, and to incorporate it in our strategy for the use and efficient management of a collection of this species (*C. chinense* Jacq.) that is being conserved and characterized in our laboratory.

2.3 Materials and methods

Preparation of plant material Seeds of Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) cultivar BVII-03 were surface sterilized with a solution of ethanol at 70% for 5 min, rinsed three times in sterile distilled water, soaked in a solution of commercial sodium hypochlorite at 30% for 15 min, and rinsed again three times in sterile distilled water. After disinfection, the seeds were submerged in sterile distilled water for 24 h. The zygotic embryos were extracted from the seeds by dissection and cotyledons were cut from the seeds immediately after the pretreatment in water, with the help of a stereomicroscope, tweezers, and a scalpel. To obtain the other types of explants, the sterile seeds were cultured in glass jars with 20 mL germination medium composed of mineral salts recommended by Murashige and Skoog (MS) (1962), supplemented with GA₃ 1.1 µM, sucrose 3%, and gelrite 0.2%. The pH was adjusted to 5.6 before sterilization in autoclave. The cultures were incubated in darkness for 7 d to accelerate germination

After the seeds had germinated, they were transferred to a photoperiod of 16 h light (40–50 mmol m²s⁻¹) at 25 ± 2 °C. The germinated zygotic embryos were extracted when the radicle became visible (7–8 d after planting in the germination medium), whereas the hypocotyls and cotyledonary leaves were extracted from the dissection of plantlets at 15 d of germination.

2.3.1 Induction of somatic embryogenesis

To induce somatic embryogenesis, different types of explants were cultured (cotyledons, zygotic embryos, germinated zygotic embryos, hypocotyls, and cotyledonary leaves) in different treatments.

All the media contained the salts recommended by Murashige and Skoog (1962) and were always supplemented with sucrose 3%, cysteine HCl 142.36 µM, myo-inositol 554.93 µM, and thiamine HCl 29.64 µM. The media were solidified with gelrite 0.2% and the pH was adjusted to 5.8 before they were sterilized in autoclave (121 °C for 15 min). The cultures were incubated at 25 ± 2 °C under photoperiod conditions (16 h light) and in darkness. Thirty explants per treatment were used and were evaluated over a period of 12 weeks.

2.3.2 Development of somatic embryos

Somatic embryos in globular and heartshaped stages, obtained after 4 weeks of induction in the MS medium containing 9.05 μM 2,4-D (T2), were transferred to different culture media (the same media that were evaluated during the induction step (Table 2.1) to evaluate the development of somatic embryos at more advanced stages (torpedo and cotyledonary). They were maintained in these media for 8 weeks, and changes were evaluated and recorded.

2.3.3 Pretreatment of somatic embryos with abscisic acid (ABA).

The somatic embryos in torpedo and cotyledonary stages were transferred to solid and liquid culture media containing ABA 1.89 μM . In both media, only the concentration of the salts (MS/2) was modified. The embryos cultured in liquid medium were incubated in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL medium at 80 rpm. The somatic embryos in both the solid and the liquid media were incubated in darkness at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 21 d.

2.3.4 Germination of somatic embryos

After pretreatment with ABA, the somatic embryos were transferred to two germination media (solid and liquid media) composed of MS salts, GA₃ 1.1 μM , and sucrose 3%. For the solid media, gelrite 0.2% was added (Santana–Buzzy *et al.*, 2005). The somatic embryos in liquid media were placed on a paper bridge. Both the solid and liquid media were incubated in photoperiod (16 h light) at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 15 d.

2.4 Results

2.4.1 Induction and development of somatic embryogenesis.

The results obtained (Table 2.1) show that, from the 21 culture media evaluated, only in two was it possible to induce the formation of somatic embryos: the T2 (MS + 9.05 μM 2,4- D) and in the T17 [MS + 9.05 μM 2,4-D +0.1 μM 2,4-epibrassinolide (EBR)] media.

Culture media (T)	Formation of SEs			
	ZE	GZE	CL	HYP
T0: Control MS	-	-	-	-
T1: MS + 2,4-D (4.5 µM)	-	-	-	-
T2: MS + 2,4-D (9.05 µM)	+	+	+	+
T3: MS + ZEA (4.5 µM)	-	-	-	-
T4: MS + ZEA (9.1 µM)	-	-	-	-
T5: MS + BAP (0.045 µM)	-	-	-	-
T6: MS + BAP (0.45 µM)	-	-	-	-
T7: MS + BAP (4.5 µM)	-	-	-	-
T8: MS + KIN (2.3 µM)	-	-	-	-
T9: MS + EBR (0.1 µM)	-	-	-	-
T10: MS + TDZ (2 µM)	-	-	-	-
T11: MS +2,4-D (9.05 µM)+ ZEA (4.5 µM)	-	-	-	-
T12: MS +2,4-D (9.05 µM)+ ZEA (9.1 µM)	-	-	-	-
T13: MS +BAP (0.045µM)+ 2,4-D (9.05 µM)	-	-	-	-
T14: MS +BAP (0.45µM)+ 2,4-D (9.05 µM)	-	-	-	-
T15: MS +BAP (4.5 µM)+ 2,4-D (9.05 µM)	-	-	-	-
T16: MS + KIN (2.3 µM)+ 2,4-D (9.05 µM)	-	-	-	-
T17: MS +2,4-D (9.05 µM)+ EBR (0.1µM)	+	+	+	+
T18: MS +2,4-D (9.05 µM)+ TDZ (2 µM)	-	-	-	-
T19: MS/2) +BAP (0.045µM)+ 2,4-D (9.05 µM)	-	-	-	-
T20: MS/2) +BAP (0.45µM)+ 2,4-D (9.05 µM)	-	-	-	-
T21: MS/2 +BAP (4.5 µM)+ 2,4-D (9.05 µM).	-	-	-	-

Table 2.1 Effect of different culture media on explants of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) in the formation of somatic embryos after 30d of culture. 2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; ABA, abscisic acid; BAP: 6-benzyladenine; CL, cotyledonary leaves; EBR: 2,4-epibrassinolide; GZE, germinated zygotic embryo; HYP, hypocotyls; KIN, kinetin; MS, Murashige and Skoog medium; TDZ, thiadiazuron; ZE, zygotic embryo; ZEA, zeatin.

The formation of somatic embryos always occurred directly from the explant, and they were clearly visible from 30 to 45 d of induction in the T2 medium. However, the origin of the embryos varied depending on the explant source. When germinated zygotic embryos were used, somatic embryos began to appear around the area of the cut, and at the ends of the explants where greater proliferation was observed, and then spread over the surface of the explants (Fig. 2.1a). In cotyledonary leaves (Fig. 2.1b, c), cotyledons (Fig. 2.1d), and zygotic embryos (Fig. 2.1e, f), the embryos formed directly on the surface of the explant. When cotyledons were used as explants, the somatic embryos formed only from the damaged embryogenic tissue that resulted from the dissection of the seeds, proving to be the least adequate explant as a result of the lack of available tissue and the low frequency of somatic embryos formed, compared with the rest of the explants evaluated. That is the reason that evaluation of this explant did not continue in this study. When hypocotyls were used, the somatic embryos originated in the interior of the explant, probably from vascular tissue, and were only visible after the dermis of the explant was eliminated (Fig. 2.2a–c). The pronounced enlargement of the explant indicated that the process was taking place and, after the dermis was removed, the embryos in the globular stage began to multiply adventitiously (Fig. 2.2 d, e).

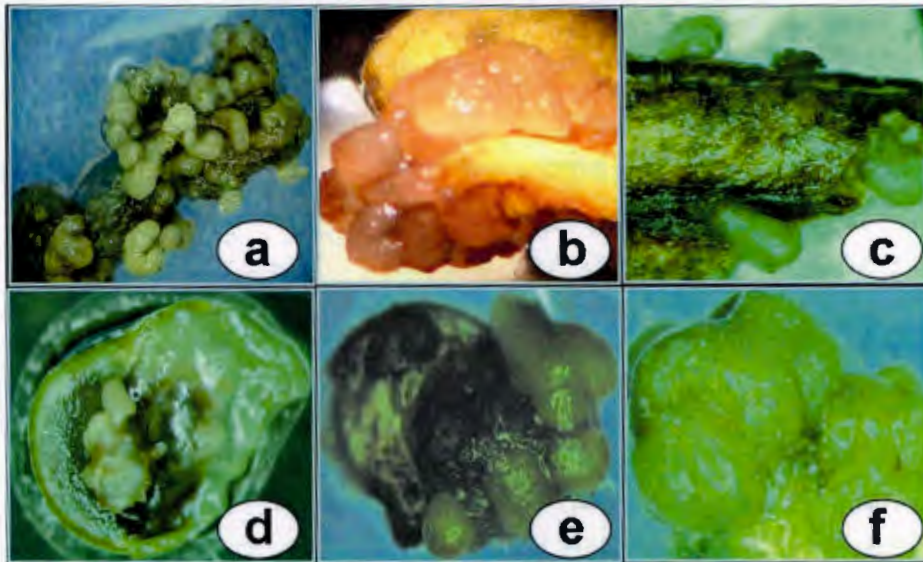


Fig. 2.1 Direct somatic embryogenesis obtained in the T2 medium (2,4-D 9.05 μM) from different explants of Habanero pepper: (a) Somatic embryos in torpedo and cotyledonary stages, formed from germinated zygotic embryos (60 d culture in photoperiod), (b, c) Somatic embryos formed from cotyledonary leaves (45-d culture in photoperiod), (d) Somatic embryos formed from embryonic tissue of the cotyledons halved longitudinally (30-d culture in darkness), (e, f) Somatic embryos formed from zygotic embryos (45-d culture in darkness and photoperiod respectively).

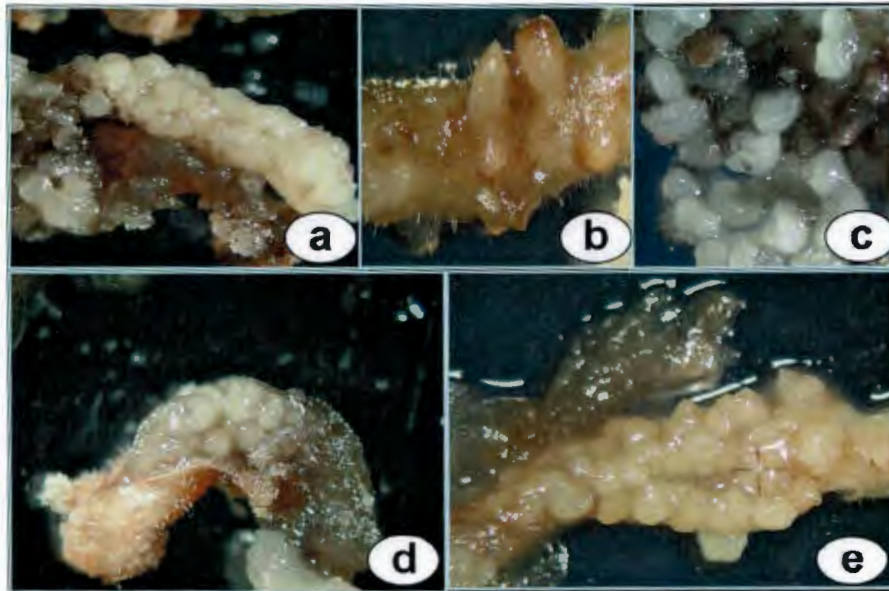


Fig. 2.2 Direct somatic embryogenesis of hypocotyl explants of the Habanero pepper obtained in the T2 medium (2,4-D 9.05 μM): (a) Somatic embryos in globular stage, (b) Somatic embryos in torpedo stage, (c) Somatic embryos without connection to original tissue, (d, e) Somatic embryos formed from the internal tissue of the explant. They became visible when the epidermis was eliminated.

All the explants (zygotic embryos, germinated zygotic embryos, cotyledonary leaves, hypocotyls, and cotyledons) formed embryos in the T2 media. They showed a normal development pattern and morphology in accordance with the stages through which a somatic embryo must pass in dicotyledonous species (Fig. 2.3a–e). In T17 medium, with the exception of cotyledonary leaves, in the rest of the explants evaluated deformed embryos were observed, which became pale brown and subsequently died.

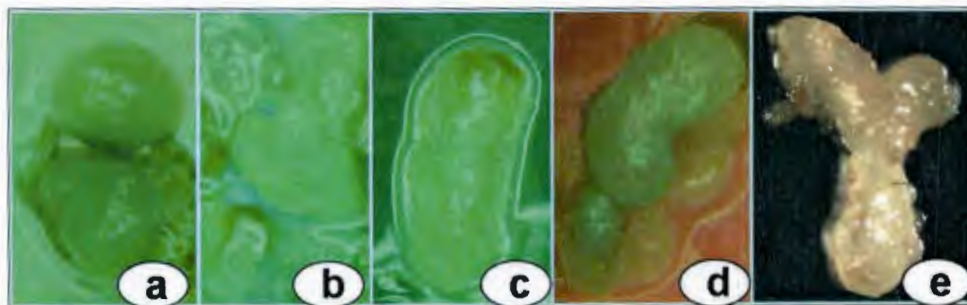


Fig. 2.3 Different shapes of somatic embryos of Habanero pepper. (a) Globular, (b) Heart shaped, (c) Torpedo, (d) Cotyledonary early stage, (e) Cotyledonary late stage.

These results allow us to state that the composition of the culture media appears to exert more influence on the induction of somatic embryogenesis in Habanero pepper than the type of explant, when the explants are taken from aseptic plantlets (15 d old). This behavior could probably vary considerably if the explants were from adult plants or were maintained in different culture conditions.

As can be observed in Fig. 2.4, during the induction of somatic embryogenesis, with the exception of zygotic embryos in which the response oscillated between 40% and 50% for both culture conditions (photoperiod and darkness respectively), the number of explants forming somatic embryos for the rest of the explants evaluated (germinated zygotic embryos, cotyledonary leaves, and hypocotyls) was superior to 80%, both in photoperiod and in darkness, with no evidence of significant differences between the two culture conditions, although cotyledonary leaves and hypocotyls did show a slightly higher response when cultured in darkness (100%). However, in an analysis of the number of somatic embryos formed (Fig. 2.4b), hypocotyls showed the greatest production (175 ± 20 somatic embryos per explant) in photoperiod conditions, whereas in darkness, although 100% of the hypocotyl segments formed embryos (Fig. 2.4a), the number of embryos per explant did not exceed 35 to 40 somatic embryos per explant (Fig. 2.4b).

Although germinated zygotic embryos showed an average behavior in relation to the capacity of the explant to form embryos (80 ± 10 somatic embryos per explant) and cotyledonary leaves formed ~45 to 55 somatic embryos per explant, both systems could also be appropriate options for use in the genetic transformation of this species, if they were the indicated explants.

The results demonstrate that hypocotyls, germinated zygotic embryos, and cotyledonary leaves showed a considerable embryogenic capacity, as well as a high reproducibility of the process. The remainder of the explants differed significantly, both in photoperiod conditions and in darkness, with zygotic embryos being the explant that produced the smallest number of embryos per explant (Fig. 2.4b). An analysis of the effect of photoperiod and darkness on the frequency of embryos formed per explant and the developmental stages of the embryos (globular, heart shaped, torpedo, and cotyledonary), at 45 d of induction in the T2 media (Fig. 2.5) demonstrated that culture under photoperiod conditions were the best for the induction and development of somatic embryogenesis, for all the explants evaluated, with hypocotyls being the explants with greater capacity of response.

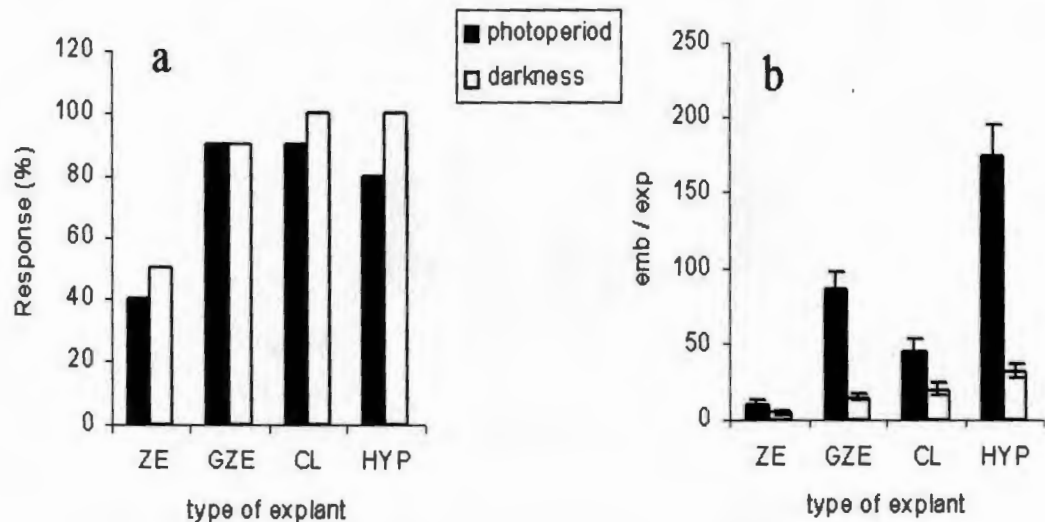


Fig. 2.4: (a) Response (percent) to somatic embryogenesis of the different explants of Habanero pepper evaluated, (b) Number of somatic embryos formed per explant. CL, cotyledonary leaves; GZE, germinated zygotic embryos; HYP, hypocotyl; ZE, zygotic embryo.

In relation to the development of somatic embryos, the stages observed most frequently were globular and torpedo, particularly in photoperiod conditions. In general, the heartshaped stage registered a very low frequency, both in the different explants and for the different incubation conditions. Steinitz *et al.* (2003), working with *C. annuum* and using centrophenoxine as plant growth regulator, observed similar behavior: After the embryos in the globular stage became visible, they advanced progressively until they reached an elongated bipolar shape and eventually root and shoot poles, without the appearance of heart-shaped or torpedo stages, typical in somatic embryogenesis. Among other possible interpretations, this behavior could be attributed to the possibility that after the globular stage is reached, the transition from one stage to another during the histodifferentiation occurs very quickly or is almost imperceptible. Zygotic embryos proved to be the explants with the least capacity to form somatic embryos (10 somatic embryos per explant); however, when germinated zygotic embryos were used as an explant, they not only showed more frequency of formed embryos (87 somatic embryos per explant), but also the majority reached the torpedo stage and only a few of them the reached the cotyledonary stage (Fig. 2.5).

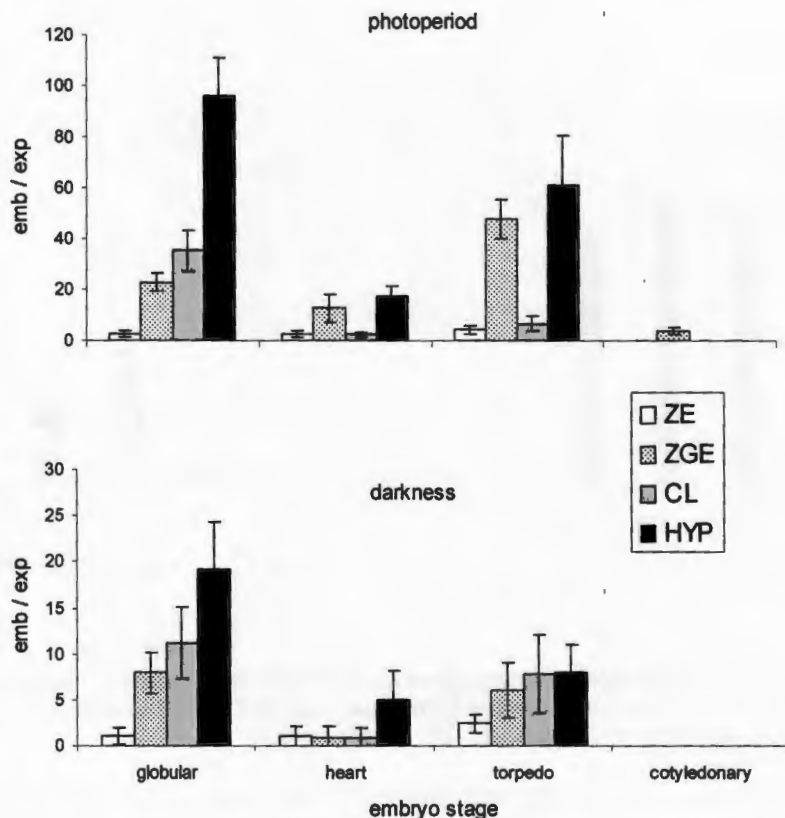


Fig. 2.5 Effect of culture conditions, photoperiod and darkness, on the frequency of formed embryos per explant and on the developmental stages of the embryos (globular, heart shaped, torpedo, and cotyledonary), at 45 d of induction in the T2 medium.

2.4.2 Maturing and germination of somatic embryos.

The somatic embryos induced and developed in the T2 medium MS + 2,4-D (9.05 μM), and subcultured afterward in a liquid medium with 1.89 μM ABA, showed a rapid elongation of the hypocotyl when transferred to the germination medium (1.1 μM GA₃; Fig. 2.6a). Their color changed to green and the majority (60%) progressed to germination, as can be seen in Fig. 6b. However, although the embryos induced in the T2 medium, developed in the T21 medium [MS/2 + 5 μM 6-benzyladenine (BAP) + 9.05 μM 2,4-D], and pretreated with ABA (liquid medium) did germinate, there was a high frequency of fused embryos (20%) (Fig. 2.7a). According to Steinitz *et al.* (2003), working with *C. annuum*, it was possible to observe a wide range of morphological abnormalities, such as the absence of cotyledons, development of a single deformed cotyledon, and a wine glass-shaped cotyledon, but the most critical defect was the absence of a normal and completely functional apical meristem in the embryo.

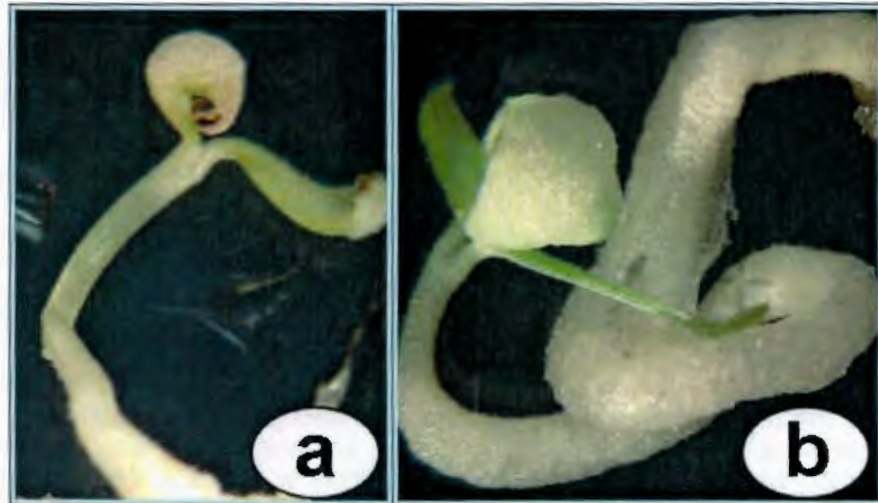


Fig. 2.6 Plantlets developed from somatic embryos of *Capsicum chinense* Jacq. in solid germination medium, Murashige and Skoog (MS + 1.1 μM GA₃) (a) From germinated zygotic embryo explant (showing cotyledonary leaves). (b) From cotyledonary leaves as explant (note the first pair of true leaves).

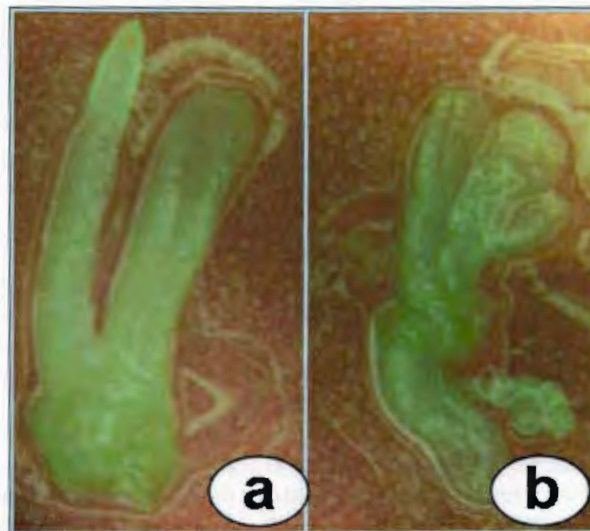


Fig. 2.7 Fused somatic embryos (FSE). Abnormality frequently observed when the somatic embryos of Habanero pepper previously treated with abscisic acid in liquid medium, were subcultured in the T21 medium (MS/2 + 5 μM 6-benzyladenine + 9.05 μM 2,4-D) for their development. (a) FSE with poor cotyledonary leaf development and wide degeneration of root area, (b) FSE with abnormal cotyledons.

2.5 Discussion

One of the most relevant conclusions reached in this study is the capacity of the Habanero pepper (*C. chinense* J.) to form somatic embryos contrary to the behavior reported for other species of the genus, particularly *C. annuum*, which to date has demonstrated and sustained the recalcitrance of the Capsicum genus to in vitro morphogenesis. The Habanero pepper showed great plasticity and capacity to produce somatic embryos, regardless of the explant used, and despite belonging to the *Capsicum* genus, which is known for its low capacity of in vitro plant regeneration. In our study, all the explants evaluated were capable of forming somatic embryos in the same culture media: zygotic embryos and germinated zygotic embryos; cotyledonary leaves, cotyledons, and hypocotyls. Germinated zygotic embryos and hypocotyls explants registered the greatest frequencies of somatic embryo formation (87 somatic embryos per explant and 175 somatic embryos per explant respectively), taking into account that it is direct somatic embryogenesis. Although cotyledonary leaves showed less frequency of formed embryos (45 somatic embryos per explant), compared with germinated zygotic embryos and hypocotyls, these were the embryos that reached germination in greater number. Zygotic embryos and cotyledons, with 10 and 5 somatic embryos per explant respectively, registered the smallest number of formed embryos. The somatic embryos formed from hypocotyls only emerged or became visible when the epidermis of the explant was removed; they never formed on the surface, probably because their embryogenic capacity is confined to the vascular cells of the plant. In this study, somatic embryogenesis was induced, exceptionally, in all the types of explants evaluated and in the same culture media (T2). These results are in marked contrast to some reports referring to *C. annuum* for two basic reasons. The first is that the majority of established protocols are limited to the use of the zygotic embryo, mature or immature, as the initial explant (Binzel *et al.*, 1996; Büyükalaca and Mavituna, 1996; Harini and Sita, 1993; Jo *et al.*, 1996; Steinitz *et al.*, 2003). Only Kintzios *et al.* (2001) reported the formation of somatic embryos from mature leaves of *C. annuum*, and, with the exception of Büyükalaca and Mavituna (1996), who obtained somatic embryos from cells in suspension, in all the other reports of indirect somatic embryogenesis (Jo *et al.*, 1996; Kintzios *et al.*, 2001), the somatic embryos were induced from callus in solid media. The second reason is that most reports agree that somatic embryogenesis was controlled by the 2,4-D combined with thidiazuron (Binzel *et al.*, 1996), coconut water (Harini and Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996), or BAP (Kintzios *et al.*, 2001). Our results showed that during the entire development of somatic embryogenesis of Habanero pepper, the presence of 2, 4-D was determinative. Similar results were reported by Büyükalaca and Mavituna (1996) and Jo *et al.* (1996), whereas Steinitz *et al.* (2003) managed to induce somatic embryos in 12 genotypes of *C. annuum* using either 2,4-D or centrophenoxine, with the greatest number of embryos per explant being obtained with the latter. Compared with other reports of direct somatic embryogenesis carried out in the Capsicum genus to date, Harini and Sita (1993) obtained 6 to 19 somatic embryos per explant; Binzel *et al.* (1996) obtained six somatic embryos per explant, both from immature zygotic embryos. Steinitz *et al.* (2003) obtained six somatic embryos per explant when mature somatic embryos were used. With our protocol, it was possible to achieve a greater number of formed somatic

embryos per explant (175 ± 20 from hypocotyls). However, in this study, after the cotyledonary stage was reached, germination and conversion to plants was not equally successful. Many of the embryos did not germinate, many others germinated but did not manage to convert to plants, and, on very few occasions, in some treatments, different abnormalities in the morphology of the somatic embryo were observed. In general, very frequently, after somatic embryogenesis is induced, many of the globular somatic embryos that are formed do not progress to more advanced stages, or many of the embryos that reach the torpedo and cotyledonary stages show a wide range of malformations. It was possible to observe that when 2, 4-D was combined with EBR or BAP, fused somatic embryos were frequently generated. The same phenomenon was reported by Rodríguez and Wetzstein (1994), Carraway and Merkle (1997), Benelli *et al.* (2001), Stipp *et al.* (2001), and Tomaz *et al.* (2001). Although the causes provoking these disorders in the normal development of the embryos are still imprecise and unpredictable, it is likely that the prolonged exposure of the somatic embryos to 2,4-D, particularly during histodifferentiation, could induce this type of behavior. Some reports have revealed that exogenous auxins stimulate the polarization of proembryogenic cells, but inhibit the subsequent development of the somatic embryo (Michalczuk *et al.*, 1992a, b; Schiavone and Cooke, 1987). Thus, for the transition of the somatic embryo from the globular stage to the more advanced stages, the exogenous auxins must be removed, so that the gene involved in the expression of the stages, during the development of the somatic embryos can be activated (Zimmerman, 1993). The presence of abnormalities observed in the somatic embryos of chili has also been described in other species (Ammirato, 1987; Merkle *et al.*, 1995), and the concurrence of normal and abnormal embryos in the same culture is very common. Besides fused embryos, other types of abnormalities have been reported, such as the absence of cotyledons, a single cotyledon or malformed cotyledons (Carraway and Merkle, 1997; Jayasankar *et al.*, 2002), lack of a shoot, or anomalies in apical meristem histodifferentiation (Jayasankar *et al.*, 2002; Stipp *et al.*, 2001; Suhasini *et al.*, 1996). Binzel *et al.* (1996) observed abnormal somatic embryos of chili that, together with normal embryos, also became plants. However, in this work, the fused embryos did not develop into a plant, which coincides with the report by Steinitz *et al.* (2003) on *C. annuum*. We have established the first and most promising system for direct somatic embryogenesis in a recalcitrant species, *C. chinense*, using hypocotyl explants. Fortunately, the advances we have made show that the production of somatic embryos in this species can be efficient and reproducible, at least up to the point when the somatic embryo reaches the torpedo and cotyledonary stages. This surpasses reports carried out for other species of the *Capsicum* genus. However, further research on the germination and conversion to plants will be necessary. It is evident that the use of ABA influenced the maturing of the embryos, because only those treated with this regulator before germination were able to develop their cotyledonary leaves. Nevertheless, this is one of the factors that must be considered to optimize the somatic embryogenesis of Habanero pepper. ABA has been used successfully in several studies of somatic embryogenesis. It is considered to be an inhibitor of early germination of the embryos and, for some species, it can be critical for the conversion of embryos to plants (Ammirato, 1983; Redenbaugh *et al.*, 1991). In *C. annuum*, it was used successfully by Büyükalaca and Mavituna (1996) and Jo *et al.* (1996). Genetic

improvement of Habanero pepper cultivars for disease and insect pest resistance, among other characters, can be achieved efficiently through genetic engineering. To date, difficulties in regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis, in particular shoot elongation from induced adventitious shoot buds, and non reproducibility of results in tissue cultures of the *Capsicum* genus, have restricted work on genetic transformation (Peddaboina *et al.*, 2003); however, the protocol we have established could prove to be attractive, not only for genetic transformation, but also for many other types of research relating to the different stresses affecting the cultivation of Habanero pepper.

2.6 Literature Cited

- Ammirato P. (1983). Embryogenesis, p. 82–113. In: D.A. Evans, and W.R. Sharp (eds.), P.V. Ammirato, and Y. Yamada (eds.). Handbook of plant cell culture. Vol. 1. MacMillan, New York.
- Ammirato P. (1987). Organizational events during somatic embryogenesis, p. 57–81. In: C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett, D.D. Biesboer (eds.). Plant Tiss. and Cell Cult. New York.
- Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. and Rugini E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*O. europaea* L.). J. Hort. Sci. Biotechnol. 76:112–119.
- Binzel M., Sankhla N., Joshi S. and Sankhla D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*C. annuum* L.). Plant Cell Rep. 15:536–540.
- Büyükalaca S. and Mavituna F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:227–235.
- Carraway D. and Merkle S., (1997). Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. Can. J. For. Res. 27:1805–1812.
- DeWitt D. and Bosland P. (1993). The pepper garden Ten, Speed Press, Berkeley, Calif.
- Franck–Duchenne M., Wang Y., Tahar B. and Beachy R. (1998). In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 2, 4-epibrassinolide. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53:79–84.
- Greenleaf W. (1986). Pepper breeding. In: M.J. Bassett (Ed.). Breeding vegetable crops AVI Publishing, Westport, Conn.
- Harini I. and Sita G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*C. annuum* L.). Plant Sci. 89:107–112.
- Jayasankar S., Bondada B., Li Z. and Gray D. (2002). A unique morphotype of grapevine somatic embryos exhibits accelerated germination and early plant development. Plant Cell Rep. 20:907–911.
- Jo J., Choi E., Choi D. and Lee K. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*C. annuum* L.). J. Plant. Biol. 39:127–135.

Kintzios S., Drossopolous J. and Lympelopoulos C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chili pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67:55–62.

Maheswaran G. and Williams E. (1984). Direct somatic embryoid formation on immature embryos of *Trifolium repens*, *T. pratense* and *M. sativa*, and rapid clonal propagation. *Ann. Bot.* 54:201–212.

Merkle S., Parrott W. and Flinn B. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis, p. 155–203. In: T.A. Thorpe (ed.). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.

Michalczuk L., Cooke T. and Cohen J. (1992a). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31:1097–1103.

Michalczuk L., Ribnicky D., Cooke T. and Cohen J. (1992b). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiol.* 100:1346–1353.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497.

Peddaboina V., Thamidala C. and Karampuri S. (2003). Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *C. annuum* L. *J Plant Biotech* 5: 245–250.

Raemarkers C., Jacobsen E. and Visser R. (1995). Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.

Redenbaug K., Fujii J., Slade D., Viss P. and Kossler M. (1991). Artificial seeds: Encapsulated somatic embryos, p. 395–416. In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 17 Springer-Verlag, Berlin.

Rodríguez A. and Wetzstein H. (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*C. illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. *Plant Cell Reports* 13:607–611.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M., Zapata-Castillo P., Solís-Ruiz A., Zaldivar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O. and Miranda-Ham M. (2005). Regeneration of Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40:1829–1831.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L., Montalvo-Peniche., López-Puc G. and Barahona-Pérez G. (2006). Improvement of in vitro culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41:405–409.

Schiavone F. and Cooke T. (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. *Cell Differ.* 21:53–62.

Steinitz B., Küsek M., Tabib Y. and Paran I., Zelcer A. (2003). Pepper (*C. annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39:296–303.

Stipp L., Mendes B., Piedad S. and Rodríguez A. (2001). In vitro morphogenesis of *C. melon* var. *inodorus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65:81–89.

Suhasini K., Sagare A. and Krishnamurthy K., (1996). Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*C. arietinum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32:6–10.

Tomaz M., Mendes B., Filho F., Demetrio C., Jansakul N. and Rodriguez A. (2001). Somatic embryogenesis in Citrus spp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:446–452.

Zimmerman J. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

CAPITULO 3

CARACTERIZACIÓN MORFO-HISTOLÓGICA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTE DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* J.)

3.1 Resumen

Se realizó el estudio histológico de la *ES* en diferentes tipos de explantes (hoja cotiledonar, embrión cigótico germinado e hipocotilo) de *C. chinense* tipo rojo, accesión BVII-03. Los explantes fueron cultivados en medio con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa (3%), cisteína-HCl (142.36 μM), mioinositol (554.93 μM) y tiamina-HCl (29.64 μM). El medio fue solidificado con gelrite (0.2%) y el pH fue ajustado a 5.8. Los tejidos fueron incubados a una temperatura de $25 \pm ^\circ\text{C}$ en condiciones de fotoperíodo (16 h luz, $40\text{--}50 \text{ mmol m}^2\text{s}^{-1}$) por 30 días. Los estudios histológicos confirmaron la naturaleza embriogénica de las estructuras formadas en los explantes. Los embriones fueron producidos directamente sin la intervención de callo, observándose las formas globulares, acorazonadas, torpedo y cotiledonar.

3.2 Introducción

La *ES* definida como el proceso mediante el cual se forma estructuras bipolares, las cuales se caracterizan por no tener conexión vascular con el tejido que les da origen. Los embriones de origen somático, durante su desarrollo, pasan por los mismos estadios que los embriones cigóticos (Thorpe, 1995).

El éxito de cualquier sistema de regeneración vía *ES* radica en la habilidad para discriminar aquellas estructuras celulares que son específicas para la embriogénesis y de las cuales emergen los embriones somáticos, a través de una ruta morfogénica. En la medida que aumenta el nivel de conocimiento sobre esta ruta en cada sistema de regeneración, disminuye el nivel de empirismo para su inducción, y aumenta la reproducibilidad del proceso, en el tiempo y el espacio.

A la fecha, la *ES* sólo se le atribuye a las plantas y los primeros reportes fueron realizados por Harry Waris en 1957 trabajando con *Oenanthë aquatica* (Krikorian y Simola, 1999), y posteriormente Reinert (1957) y Steward (1958), quienes trabajando independientemente con *Daucus carota* observaron la formación de los embriones somáticos.

La obtención de *ES* en diferentes especies de plantas, y a partir de diferentes tipos de explantes fue descrita gráficamente por Gaj (2004). Este autor indica que el embrión cigótico inmaduro, la plántula y la hoja son los explantes más utilizados para inducir este proceso, y en menor porcentaje el uso de inflorescencia, embrión cigótico maduro, semilla y cotiledón. El autor no menciona al hipocotilo como explante para la inducción de *ES*.

Hay muchos reportes en los que se ha descrito el proceso de inducción y desarrollo de la *ES* por técnicas histológicas: *T. cacao* (Alemanno *et al.*, 1996), *Q. robur* (Zegzouti *et al.*, 2001), *O. europea* (Benelli *et al.*, 2001), *Safflower* (Mandal y Gupta, 2003), *S. tuberosum* (Kumar y Millam, 2004), *F. sellowiana* (Cangahuala *et al.*, 2004), *S. truncata* (Al-Dein *et al.*, 2006), *P. amabilis* (Chen y Chang, 2006). Sin embargo, en *C. annuum* solo hay dos reportes (Harini y Sita, 1993 y Binzel *et al.*, 1996). La escasez de reportes de histología en *ES*, no es exclusiva del género *Capsicum*, sino también en otras especies de la familia Solanaceae. De ellos podemos citar: *N. tabacum* (Stolarz *et al.*, 1991; Gill y Saxena, 1993), *L. esculentum* (Gill *et al.*, 1995; Newman *et al.*, 1996), *S. tuberosum* (Pretova y Dedicova, 1992; De García y Martínez, 1995; Kumar y Millam, 2004) y en *S. melongena* (Tarré *et al.*, 2004). En *C. chinense* no existen reportes de análisis histológicos de *ES*.

En *C. annuum*, Harini y Sita. (1993), Binzel *et al.* (1996), Büyükalaca y Mavituna (1996), Jo *et al.* (1996) y Kintzios *et al.* (2001) no reportaron defectos en la inducción y el desarrollo de los embriones somáticos. Sin embargo ninguno de los reportes anteriormente citados incluye un estudio histológico claro y detallado. Por lo tanto debido a la poca información en *C. annuum* y a la nula información en *C. chinense*, éste trabajo tiene como objetivo describir ontogenia del proceso de *ES* en *C. chinense*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Fuente de explante

La hoja cotiledonar (*HC*) e hipocotilo (*HP*) se obtuvieron de plántulas de 15 días de edad, para lo cual se germinaron *in vitro* semillas del cultivar BVII-03, en un medio compuesto de sales MS, suplementado con sacarosa (3%), gelrite (0.2 %) y AG_3 (0.4 mg/l) (Santana-Buzzy *et al.*, 2005). Los recipientes de cultivo conteniendo las semillas fueron colocados en oscuridad a una temperatura de 25°C, por un período de 7 días. Posteriormente, se transfirieron a condiciones de fotoperíodo (16 horas luz y 8 horas de oscuridad), a 25° C, hasta su conversión en plántulas. En el caso particular del embrión cigótico germinado (*ECG*), las semillas se colocaron en el medio de germinación, y se incubaron a 25°C bajo condiciones de oscuridad. A los 7 días, cuando la radícula comenzó a emerger, se extrajo el *ECG* para ser utilizado como fuente de explante en la inducción de la *ES*.

3.3.2 Inducción de la embriogénesis somática

La *ES* fue inducida siguiendo la metodología descrita por López-Puc *et al.* (2006). Previamente, los explantes se cultivaron en un medio de inducción que consistió en el uso de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa (3%), cisteína HCl (142.36 μ M), mioinositol (554.93 μ M) y tiamina-HCl (29.64 μ M). El medio fue solidificado con gelrite (0.2%) y el pH fue ajustado a 5.8 antes de ser esterilizado a 121°C por 15 minutos. Los cultivos fueron mantenidos a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo condiciones de fotoperíodo (16 horas luz, 40–50 $\text{mmol m}^2\text{s}^{-1}$) por 30 días.

3.3.3 Análisis histológico

Los explantes incubados en medio de inducción, fueron removidos cada 24 horas, se tomaron tres explantes cada segundo día durante los 30 días de cultivo. Las muestras fueron fijadas siguiendo el protocolo de Berlín y Miksche (1976), en solución FAA por 24–48 horas, dependiendo del tiempo de inducción. Estas se mantienen a 10 °C durante el proceso. Después de fijadas, las muestras fueron deshidratadas en diferentes concentraciones de etanol (30, 50, 70, 85, 99 y 100%). Posteriormente se realizó la infiltración y embebido de las muestras en resinas plásticas (JB-4 Glycol Methacrylate, Polysciences). Posteriormente, se realizaron secciones seriadas de 5 μ m utilizando un micrótopo de rotación HM340E MICROM. Los cortes fueron fijados en portaobjetos y teñidos con azul de toluidina, utilizando el procedimiento de Sakai (1973), y posteriormente se montaron con una solución de Poly-mount de Polysciences. Las observaciones y los registros fotográficos fueron realizadas utilizando un microscopio Axioplan. En la Fig. 3.1 se presenta el procedimiento realizado para llevar a cabo el análisis histológico.

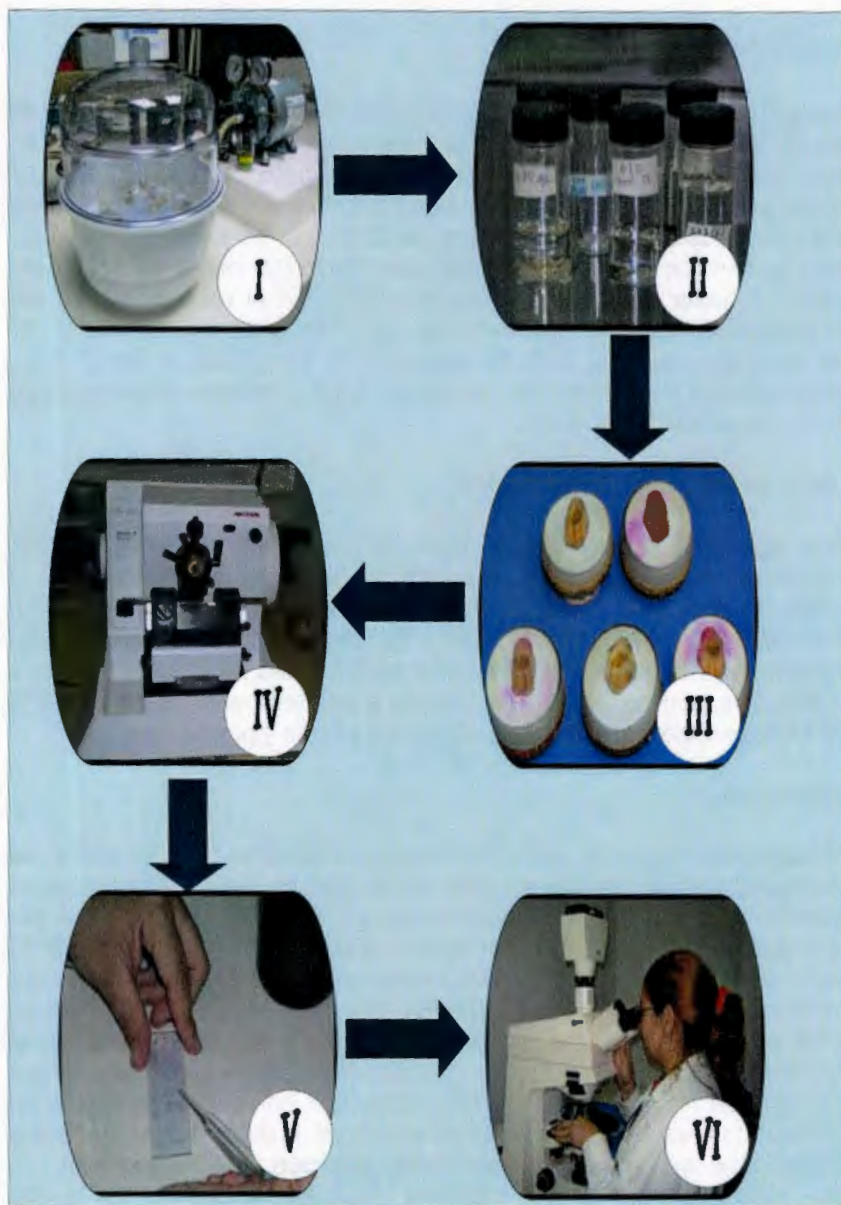


Figura 3.1 Análisis histológico. (I) Fijación con FAA, (II) Deshidratación con alcohol (30, 50, 70, 85, 96 y 100%), (III) Pre-infiltración e Inclusión en resinas plásticas, (IV) Seccionado en micrótopo, (V) Preparaciones permanentes, (VI) Análisis y registro fotográfico.

3.4 Resultados del análisis histológico de la embriogénesis somática en *C. chinense* J.

3.4.1 Hipocotilo (HP)

Los cambios en la morfología celular en los tejidos se detectaron al segundo día de cultivar los segmentos de *HP* de *C. chinense* en el medio de inducción. Estos cambios involucraron exclusivamente a las células adyacentes a los haces vasculares, aparentemente las células del tejido vascular no intervienen en el proceso de adquisición de competencia embriogénica. Se observó una sincronizada división periclinal de las células pro-vasculares a los dos días de inducción (Fig. 3.2a). Sin embargo, la división celular se hizo paulatinamente asincrónica y dejó de apreciarse la orientación periclinal para dar paso a una masa meristemática de células isodiamétricas con núcleos grandes (Fig. 3.2b). Estos constituyeron la formación directa de múltiples proembriones en las proximidades de los haces vasculares (Fig. 3.2c). El proceso de polarización de los embriones somáticos fue observado a los 15 días de inducción (Fig. 3.2d). Se observó un patrón de desarrollo asincrónico de los embriones a los 30 días de inducción (Fig. 3.2e). Los embriones alcanzaron el estadio cotiledonar a los 30-45 días de inducción, siendo posible observar la presencia de una capa delgada de células (protodermis) que rodea al embrión, la cual representa la futura epidermis (Fig. 3.2f).

3.4.2 Embrión cigótico germinado (ECG)

Los embriones somáticos formados a partir de *ECG*, se observaron a los 15 días de la inducción y se originaron directamente en las células epidérmicas a lo largo del explante, así como también, en el interior del explante en las zonas cercanas a los haces vasculares (Fig. 3.3a, b). El inicio de la formación de la protodermis se observó a partir de los 16 días de la inducción (Fig. 3.3b). Fue posible observar la separación de los embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo a partir del tejido materno, a los 30 días de inducción (Fig. 3.3c). También fue observada la presencia de la *ESS* a partir de la protodermis de un embrión somático torpedo (Fig. 3.3d).

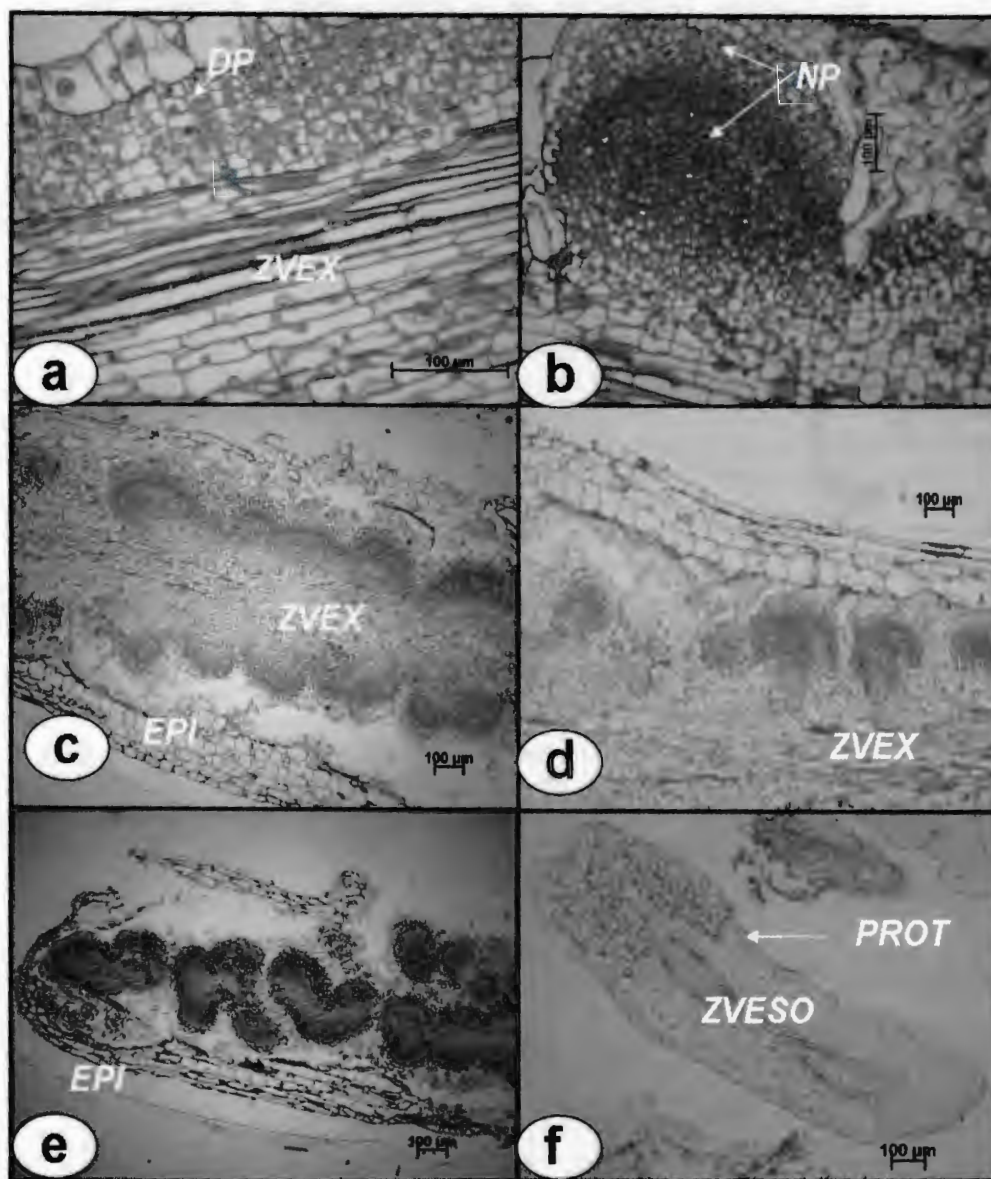


Figura 3.2 Cortes histológicos longitudinales de segmentos de *HP* de *C. chinense* durante la *ESD*: (a) Segmento de *HP* al segundo día de la inducción, las células adyacentes a los haces vasculares comienzan a presentar actividad mitótica, (b) Proembrión con células pequeñas isodiamétricas de núcleo prominente, (c) Segmento de *HP* mostrando la proliferación de proembriones múltiples alrededor de la zona vascular, obsérvese la epidermis del explante, (d) Polarización de los pro-embriónes en la zona pro-vascular del explante, (e) Asincronía en la población de los embriones somáticos formados en un segmento de *HP*, observándose

embriones acorazonado, torpedo y cotiledonar en el mismo explante, (f) Embrión somático cotiledonar, se observa el tejido vascular en formación y la protodermis. *DP* (división periclinal), *NP* (núcleo prominente), *ZVEX* (zona vascular del explante), *ZVESO* (zona vascular del embrión somático), *PROT* (protodermis), *EPI* (epidermis). Barras: (a-f) 100 μ m.

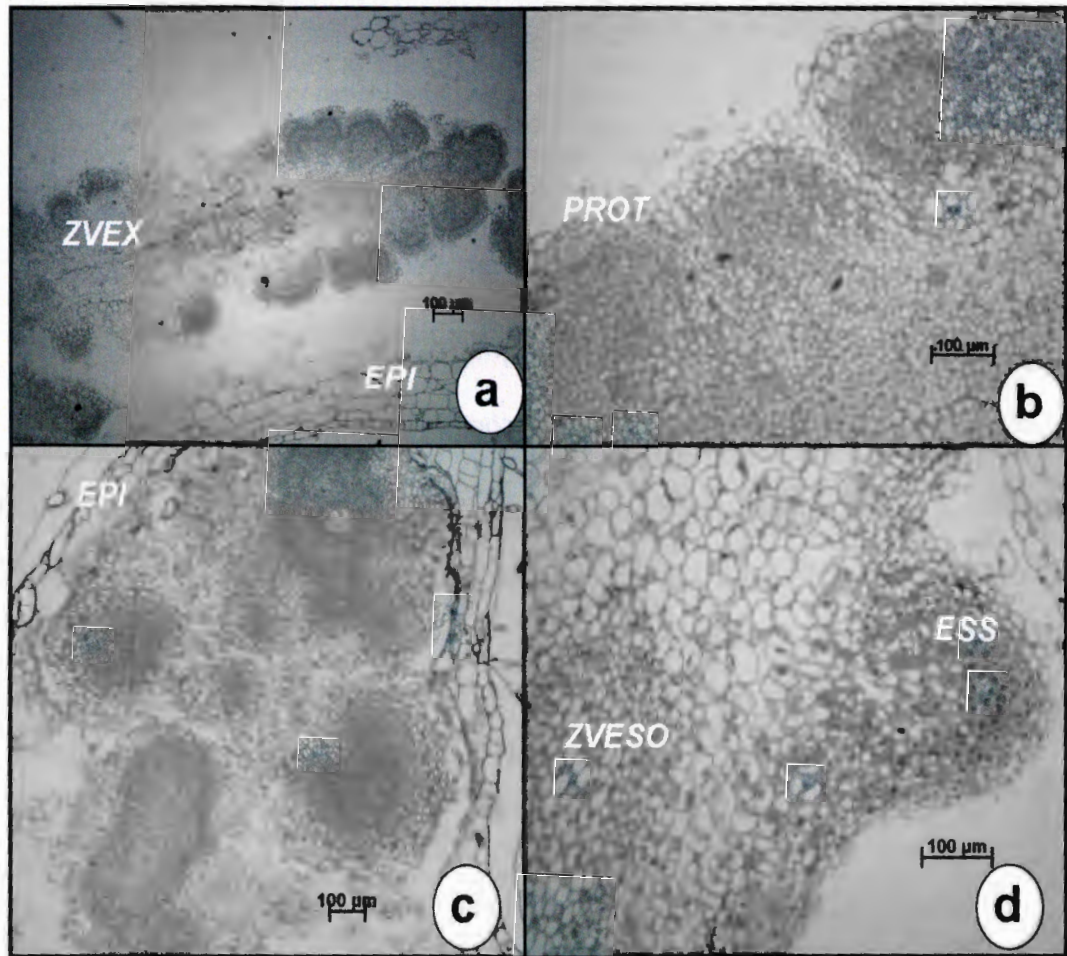


Figura 3.3 Cortes histológicos longitudinales a partir de ECG de *C. chinense* durante la ESD: (a) Embriones somáticos, formándose a partir de células pro-vasculares del explante; obsérvese la epidermis del explante, (b) La protodermis de los proembriones comienza a visualizarse, (c) Embriones somáticos globular, torpedo, acorazonado en un mismo explante, (d) ESS, obsérvese el área vascular del embrión somático que le dio origen al embrión somático secundario. *ZVEX* (zona vascular del explante), *ZVESO* (zona vascular del embrión somático) *EPI* (epidermis), *PROT* (protodermis), *ESS* (embriogénesis somática secundaria). Barras: (a-d) 100 μ m.

3.4.3 Hoja cotiledonar (HC)

Los embriones somáticos formados a partir de HC, se originaron directamente de las células de la epidermis, e indistintamente por el lado adaxial y abaxial del explante. Durante su desarrollo, se pudo observar los diferentes estadios del embrión somático. A los 8 días se observaron los primeros embriones pre-globulares, aún conectados vascularmente al tejido materno (Fig. 3.4a, b). La separación y polarización de los embriones se observó con mayor claridad a partir del día 16 de inducción. En este tiempo los embriones somáticos mostraron de manera incipiente, la formación de los tejidos del procámbium y del futuro tejido vascular de la planta (Fig. 3.4c, d). A los 21 días de inducción se observó que los embriones se separaron del explante materno (Fig. 3.4e). Posteriormente, estos alcanzaron la forma oblonga (etapa intermedia entre el estadio globular y torpedo). También se observó la protodermis formada en el embrión somático (Fig. 3.4f).

3.4.4 Estadios de desarrollo durante la embriogénesis somática de chile habanero.

Durante la inducción y el desarrollo de los embriones somáticos formados a partir de diferentes tipos de explantes, se pudo observar los estadios globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar. Estas estructuras muestran una morfología similar a la observada en los embriones cigóticos de las plantas dicotiledóneas (Fig. 3.5).

3.4.5 Germinación de los embriones somáticos

Los embriones somáticos germinados de *C. chinense* desarrollaron elementos vasculares. Esto sugiere que son estructuras independientes del tejido materno. Después de 30 días de cultivo en el medio de germinación, se observó el primordio foliar con hojas cotiledonares, la zona meristemática caulinar y los sacos vasculares (Fig. 3.6a). Los haces vasculares formados se organizaron centralmente (Fig. 3.6b, c); se formó la radícula con cofia, observándose el centro meristemático y células con gránulos que probablemente sean amiloestatolitos (Fig. 3.6 d).

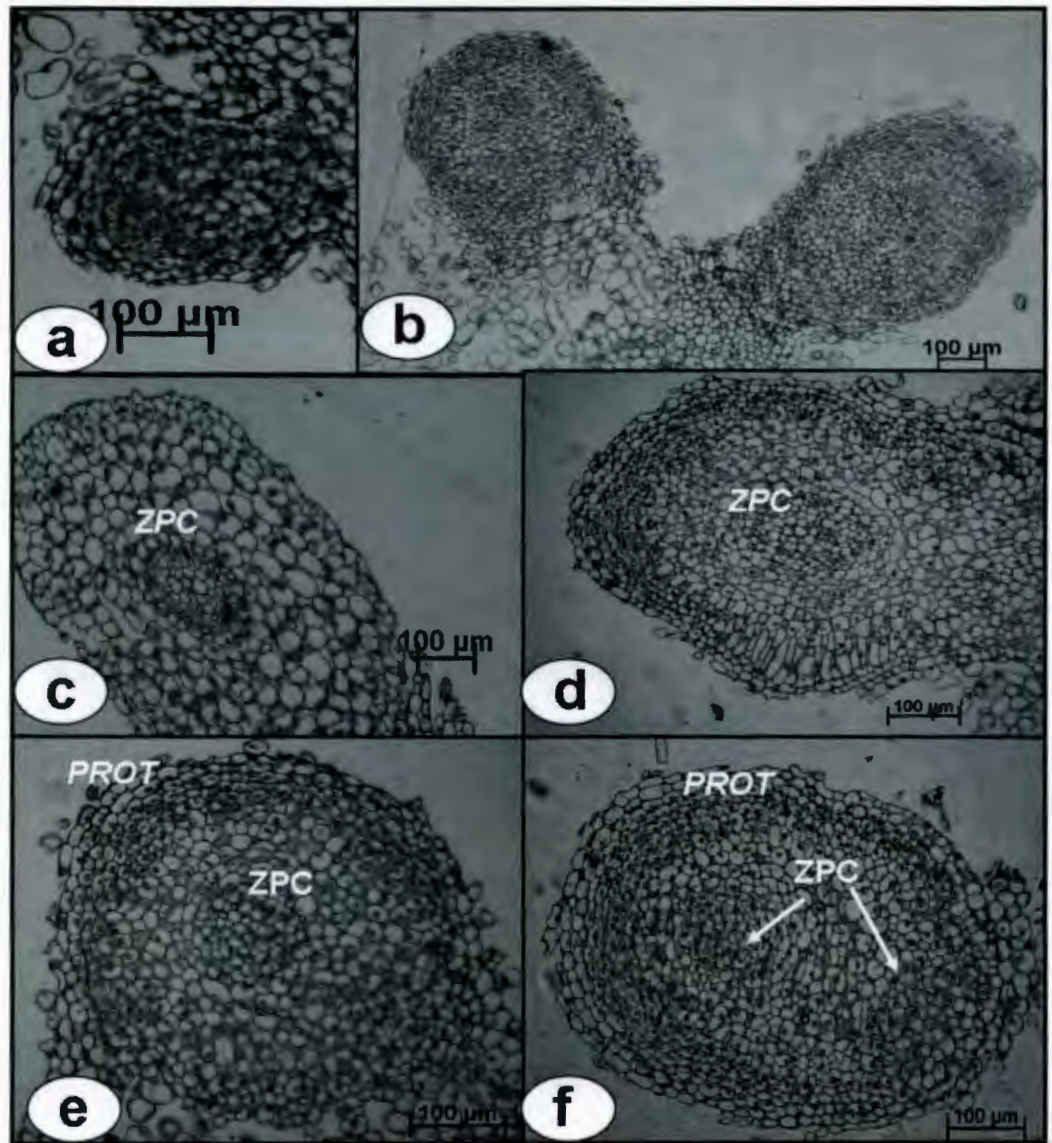


Figura 3.4 Cortes histológicos longitudinales a partir de HC de *C. chinense* durante la ESD: (a) Etapa temprana en la formación de un embrión somático globular; las células son pequeñas y con el citoplasma denso, (b, c, d) Inicio de la separación del embrión somático del tejido materno del explante, obsérvese la zona del procámbium, (e) Embrión globular con zona procambial, (f) Embrión oblongo. ZPC (zona del procámbium), PROT (protodermis). Barras: (a-f) 100 μm .

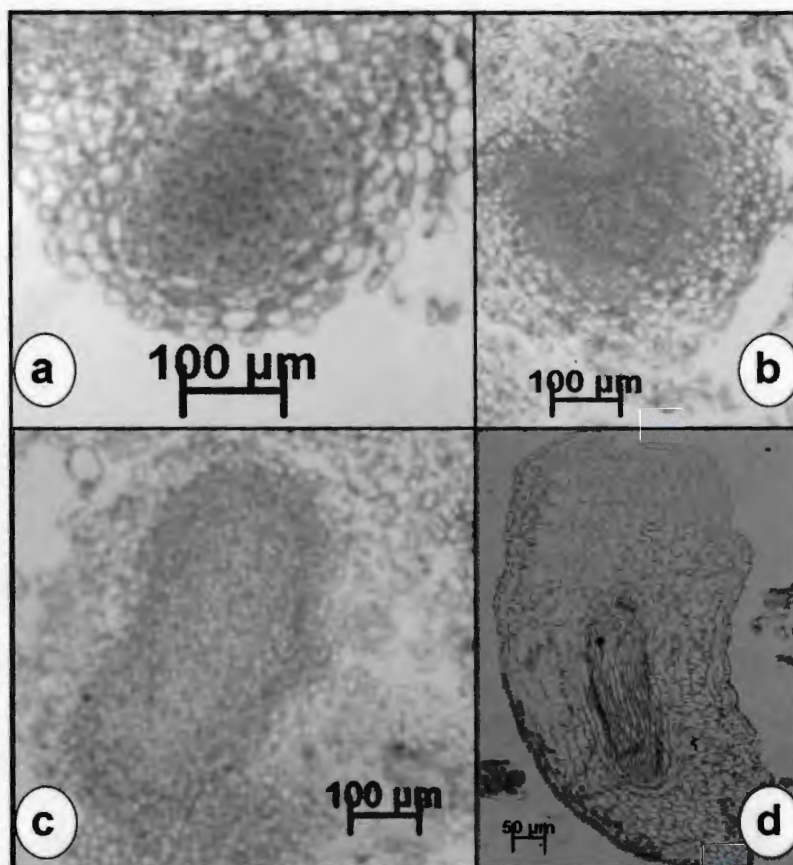


Figura 3.5 Cortes histológicos longitudinales de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos de *C. chinense*: (a) Globular, (b) Acorazonado, (c) Torpedo, (d) Cotiledonar. Barras: (a-c) 100 µm, (d) 50 µm.

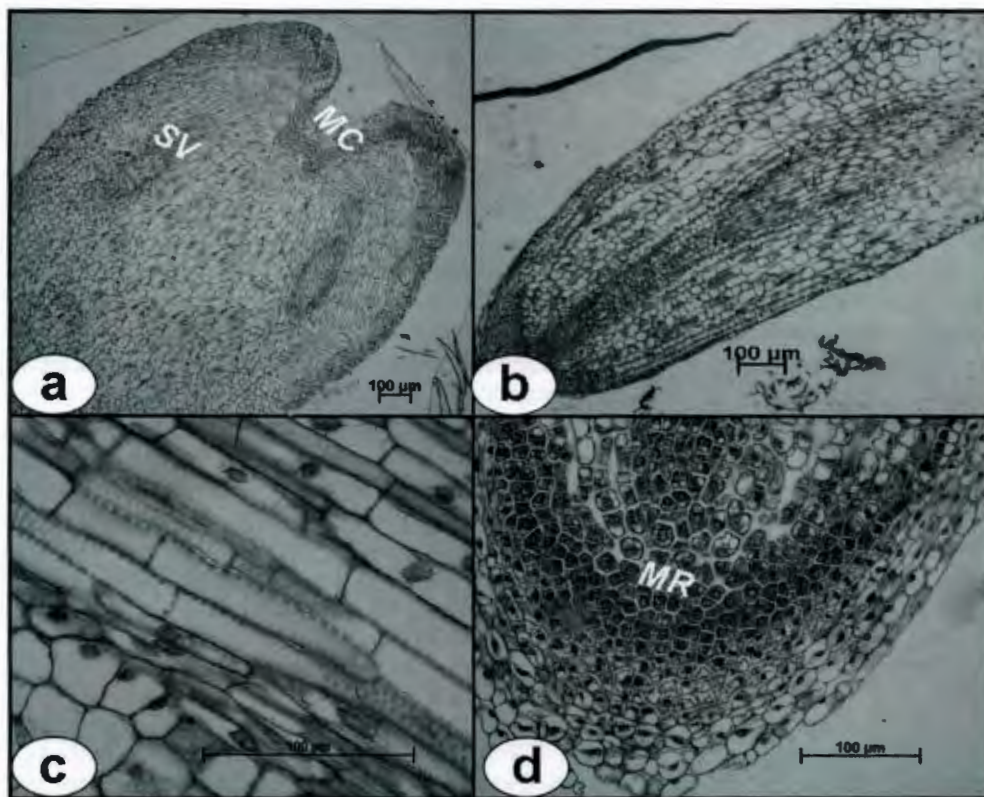


Figura 3.6 Cortes histológicos longitudinales de embriones somáticos germinados de *C. chinense* a los 30 días en medio de germinación: (a) Ápice caulinar del embrión somático germinado, se observan las hojas cotiledonares, el meristemo apical y los sacos vasculares, (b) Ápice radical del embrión somático germinado, (c) Acercamiento de (b), obsérvese la morfología de las células de los haces vasculares del embrión somático germinado, (d) Acercamiento de (b), se observa el centro meristemático radical con células densamente teñidas y células que conforman la cofia. SV (saco vascular), MC (meristemo caulinar), MR (meristemo radical). Barras: (a-d) 100 µm.

3.5 Discusión

El alto potencial morfogenético de *C. chinense*, se demostró por el alto número de embriones somáticos formados, sobre todo considerando que el proceso inducido es *ESD* y que esta especie pertenece a un género recalcitrante a la *ES* (López-Puc *et al.*, 2006). Además la *ES* se indujo a partir de diferentes tipos de explantes utilizando el mismo protocolo. En *C. chinense* los explantes *HP*, *HC* y *ECG* fueron los que mostraron una mayor capacidad de respuesta a la *ES*. A partir de estos, se logró la mayor formación de embriones somáticos por explante. El *EC* y el *COT* fueron los explantes que tuvieron una menor eficiencia. Los resultados obtenidos en estos dos últimos explantes son similares a lo reportado en *C. annuum* (Harini y Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996; Steintz *et al.*, 2003), quienes indujeron este proceso a partir de *EC*. En base a lo anterior, se decidió seleccionar al *HP*, *HC* y *ECG* como explantes para realizar los análisis histológicos.

El análisis histológico confirmó que el proceso morfogénico inducido es de naturaleza embriogénica, debido a que fue posible distinguir, que los embriones somáticos formados no tienen conexión vascular con el tejido maternal del explante, de igual forma se observó la bipolaridad de las estructuras formadas. Los resultados confirmaron asimismo que los embriones somáticos se forman directamente, sin la intervención de callo, en los tres tipos de explantes estudiados.

El *HP* y el *ECG* no se han reportado como fuente de explante en la inducción de *ES*, en el género *Capsicum* y en la familia Solanaceae. Tampoco se encuentran entre los explantes más utilizados para inducir la *ES* (Gaj, 2004). Los embriones somáticos formados a partir de *HP* y *ECG* aparentemente se originan de células adyacentes al tejido vascular. La formación de embriones somáticos en células provasculares se ha reportado en otras especies, pero no a partir de *HP* y *ECG*. Por ejemplo en rizoma de *Musa spp* (Lee *et al.*, 1997) y en *HC* de *S. melongena* (Tarré *et al.*, 2004). La respuesta observada en *HP* y *ECG* de *C. chinense* posiblemente se deba a la acción que tiene el 2,4-D, ya que se ha indicado que este RCV induce la formación y permite la proliferación de células embriogénicas a partir de células pro-vasculares (De Vries *et al.*, 1988; Guzzo *et al.*, 1994). Es muy probable, como indican algunos autores, que la formación de embriones somáticos en esta zona se deba a que las células que están adyacentes a los tejidos vasculares (Wangermann (1974; Morris y Thomas, 1978) transportan auxinas, lo cual activa la mitosis (Ugglá *et al.*, 1996). Además se debe considerar que el 2,4-D puede actuar como una auxina directamente o mediante la alteración del metabolismo endógeno de AIA (Fehér *et al.*, 2003).

Aunque la *ES* obtenida a partir de hoja se ha reportado en *C. annuum* (Kintzios *et al.*, 2001), no se cuenta con estudios histológicos en este tipo de explante. En otras especies de la familia Solanaceae, existen reportes de *ES* obtenida en hoja, aunque no especifican si es hoja verdadera o cotiledonar, (Stolarz *et al.*, 1991; Gill y Saxena, 1993; JayaSree *et al.*, 2001; Gledie *et al.*, 1983, 1986; Fobert y Webb, 1988; Tarré *et al.*, 2004). De estos autores, son pocos los que aportan evidencia histológica del proceso. Por ello los resultados obtenidos no son siempre muy claros y contundentes en la mayoría de los casos.

En *C. chinense*, la formación de embriones somáticos a partir de *HC*, aparentemente ocurre a partir de las células epidérmicas. Estas experimentaron la adquisición de competencia embriogénica y se caracterizaron por ser pequeñas, isodiamétricas, y tener núcleos grandes y densamente teñidos, similar a lo reportado por De Vries *et al.* (1988) y Guzzo *et al.* (1994). El cambio en la morfología de las células que adquieren competencia embriogénica se debe probablemente, al cambio de programación genética que experimentan durante la inducción (Fehér *et al.*, 2003).

El análisis histológico confirmó que los tejidos del procámbium comenzaron a formarse desde los estadios tempranos en los embriones somáticos de *HC* de *C. chinense*. Lo anterior tiene especial importancia, ya que el procámbium representa al tejido vascular de la futura planta.

La protodermis comenzó a formarse en los proembriones obtenidos de *HC*; *HP* y *ECG* similar a lo reportado por Cangahuala-Inocente *et al.* (2004). También se observó la formación adventiva de *ESS*. Se cree que los embriones somáticos primarios tienen zonas en las cuales no hay una completa diferenciación del protodermo (Yeung, 1999), por lo que las células epidérmicas y sub-epidérmicas que allí se encuentran, se multiplican originando la *ESS* (Alemanno *et al.*, 1996). La *ESS* no se ha descrito en *C. annuum*, ni en otras especies de la familia Solanaceae, siendo éste el primer antecedente.

En todos los tipos de explantes evaluados fue posible apreciar los diferentes estadios de desarrollo de la *ES* de *C. chinense*. La etapa globular de la *ES* marca el comienzo de la diferenciación estructural. La importancia de mostrar lo anterior, radica en que la transición de la etapa globular a la etapa acorazonada en la *ES* es un requisito para lograr la simetría bilateral que caracteriza a las plantas dicotiledóneas. Esto conlleva a la presencia de procesos que participan en el crecimiento, como el fototropismo, dominancia apical y formación de raíces adventicias (Gälweiler *et al.*, 1998).

En el estadio torpedo y cotiledonar, se logró apreciar que todos los tejidos meristemáticos observados en el inicio, conllevan a la formación del protodermo, el procámbium, el meristemo apical radical y meristemo apical caulinar. Los embriones somáticos germinados obtenidos en este estudio mostraron la formación del primordio foliar normal con un meristemo apical caulinar y la formación de la raíz con una cofia bien definida.

La calidad en los embriones somáticos y su capacidad de germinar dependen del desarrollo de sus meristemas. Se ha observado que los embriones somáticos que se convierten, se caracterizan porque las células del meristemo apical caulinar son pequeñas y mantienen un citoplasma denso en el ápice (Nickle y Yeung, 1993). Esta morfología fue observada en las células meristemáticas del ápice caulinar de *C. chinense* (Fig. 3.6a) Sin embargo la conversión fue baja, y los embriones que se convirtieron no elongaron.

Debido a que la *ES* obtenida es directa, presenta la ventaja de que los embriones formados son genéticamente más estables que aquéllos generados por la vía indirecta, por lo que podría ser la opción más idónea para el mejoramiento biotecnológico (Maheswaran y Williams, 1984).

La caracterización histológica de la *ES* que se realizó en este trabajo provee información importante para estudios posteriores que permitan el mejoramiento de este proceso morfogénico en la especie *C. chinense*.

3.6 Bibliografía

Alemanno L., Berthouly M. and Ferriere M. (1996). Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 187-194.

Al-Dein E., Ramamneh A., Sriskandarajah S. and Sere M. (2006). Plant regeneration via somatic embryogenesis in *S. truncata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 333-342.

Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. and Rugini E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*O. europaea* L.). *Journal of Hort. Sci. Biotech.* 76 (1): 112-119.

Berlín G. and Miksche J. (1976). *Botanical microtechnique and cytochemistry*. 3rd ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Binzel Marla L., Sankhla N., Joshi S. and Sankhla D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*C. annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15:536-540.

Cangahuala-Inocente G., Steiner N., Santos M. and Guerra M. (2004) Morphohistological analysis and histochemistry of *F. sellowiana* somatic Embryogenesis. *Protoplasma* 224: 33-40.

Chen J. and Chang W. (2006). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *P. amabilis*. *Biologia Plantarum* 50 (2): 169-173.

De García E. and Martínez S. (1995). Somatic Embryogenesis in *S. tuberosum* L. cv. Desirée from item nodal sections. *J. Plant Physiol.* 145:526-530.

De Vries S., Booij H., Meyerink H., Huisman G., Wilde D., Tomas T. and Van Kammen A. (1988). Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspensions cultures. *Planta* 176: 196-204.

Fehér A., Taras P. and Pasternak D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 201-228.

Fobert P. and Webb D. (1988). Effects of polyamines, polyamine precursors and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*S. melongena*) cotyledons. *Can J. Bot.* 66 (9): 1734-1742.

Fosket D. and Roberts L. (1964). Induction of wound-vessel differentiation in isolated coleus stem segments in vitro. *Am. J. Bot.* 51:19-25.

Gaj M. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *A. thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.* 43:27-47.

Gälweiler L., Guan G., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A. and Palme K. (1998). Regulation of Polar Auxin Transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* Vascular Tissue. *Science* 282 (5397):2226-2230.

Gill R. and Saxena P. (1993). Somatic embryogenesis in *N. tabacum* L.: induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultures leaf discs. *Plant Cell Rep.* 12: 154-159.

Gill R., Malik K., Sanago H. and Saxena P. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling cultures of tomato (*L. esculentum* Mill). *J. Plant Physiol.* 147: 273-276.

Gleddie S., Keller W. and Setterfield G. (1983). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *S. melongena* (eggplant). *Can J. Bot.* 61: 656-666.

Gleddie S., Keller W. and Setterfield G. (1986). Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspensions derived protoplasts of *S. melongena* (eggplant). *Can J. Bot.* 64:355-361.

Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Lo Schiavo F. and Terzi M. (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J. of Exp. Bot.* 45 (279): 1427-1432.

Harini I. and Sita L. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*C. annuum* L.). *Plant Sci.* 89:107-112.

JayaSree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A., Reddy J. and Sadanandam A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 64 (1): 13-17.

Jo J., Choi E., Choi D. and Lee, K. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*C. annuum* L.). *J. Plant. Biol.* 39:127-135.

Kintzios S., Drossopolous J. and Lympelopoulos C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chili pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67:55-62.

Krikorian A. and Simola L. (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1983-1973). *Physiol. Plantarum* 105:348-355.

Kumar S. and Millam S. (2004). Somatic embryogenesis in *S. tuberosum* L.: a histological examination of key developmental stages. *Plant Cell Rep.* 23:115-119.

Lee K., Zapata K., Brunner H. and Afza R. (1997). Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.* 51: 1-8.

López-Puc G., Canto-Flick A, Iglesias-Andreu L., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P., Montalvo-Peniche M., Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2006). Direct Somatic Embryogenesis: A Highly Efficient Protocol for In Vitro Regeneration of Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.). *HortScience* 41 (6):1-7.

Mandal A. and Gupta D. (2003). Somatic embryogenesis of *Safflower*: influence of auxin and ontogeny of somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 27-31.

Maheswaran G. and Williams E. (1984). Direct somatic embryoid formation on immature embryos of *T. repens*, *T. pratense* and *M. sativa*, and rapid clonal propagation. *Ann. Bot. (Lond.)* 54:201-212.

Morris D. and Thomas A. (1978). A micro autoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings. *J Exp Bot.* 29: 148-157.

Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Newman P., Krishnaraj S. and Saxena P. (1996). Regeneration of Tomato (*L. esculentum* Mill.): Somatic embryogenesis and shoot organogenesis from hypocotyl explants induced with 6-benziladine. *Int. J. Plant Sci.* 157, 5: 554-560.

Nickle T. and Yeung E. (1993). Failure to establish a functional shoot apical meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryogenesis. *Ann Bot.* 80: 1284.

Pretova A. and Dedicova B. (1992). Somatic embryogenesis in *S. tuberosum* L. cv. Dérirée from unripe zygotic embryos. *J. Plant Physiol.* 139: 539-542.

Reinert J.(1959). Morphogenese an Gewebekulturen. *Berichteder Deutschen Botanischen Gesellschaft* 71:15.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M., Zapata-Castillo P., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O. and Miranda-Ham M. (2005). Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40:1829-1831.

Sakai W. (1973). Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technol.* 48: 247:249.

Steinitz B., Küsek M., Tabib Y., Paran I. and Zelcer A. (2003). Pepper (*C annum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 39: 296-303.

Steward F., Mapes M. and Mears K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II: Organization in cultures grown from freely suspended cells. Amer. J. of Bot. 45:705-708.

Stolarz A., Macewicz J. and Lörz H. (1991). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *N. tabacum* L. J. Plant Physiol. 137: 347-357.

Tarré E., Magioli C., Margis-Pinheiro M., Sachetto-Martins G., Mansur E. and Santiago-Fernandes L. (2004). *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*S. melongena* L.). Revista Brasil. Bot. 27 (1): 79-84.

Thorpe T. (1995). In Vitro Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Ugla C., Moritz T., Sandberg G. and Sundberg B. (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. Plant Biol. 93: 9282-9286.

Wangermann (1974). The pathway of transport of applied IAA through internode segments. New Phytol 73: 623–636.

Yeung E. (1999). The use of histology in the study of plant tissue culture systems – some practical comments. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant 35: 137-143.

Zegzouti R., Arnould M. and Favre J. (2001). Histological investigation of the multiplication step in secondary somatic embryogenesis of *Q. robur* L. Ann. For. Sci. 58 681–690.

Zimmerman J. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell 5:1411–1423.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN GENERAL

Las características únicas de sabor, aroma y picor del chile habanero han provocado que aumente su consumo como producto fresco y procesado. Se utiliza también como materia prima para la elaboración de una amplia gama de productos de interés industrial. Por lo que la demanda ha aumentado en los últimos años tanto a nivel nacional como internacional. Debido a la competencia que se afronta actualmente en el ramo agrícola, no es de sorprender, que otros países mejoren la eficiencia del cultivo, haciendo que nuestro mercado sea menos competitivo. Por lo que la obtención del protocolo de *ES* reportado en este estudio resulta importante, ya que una vez optimizado, permitirá en un futuro el mejoramiento biotecnológico de esta especie.

El sistema de *ES* en *C. chinense* se distingue por permitir la inducción de la *ES* en una variedad de explantes y no se limita al *EC*, que consta de tejido juvenil y es usualmente utilizado por su mayor respuesta al cultivo de tejidos (Gaj 2004). También se caracteriza por ser de alta eficiencia, sobre todo si se considera que el proceso se induce directamente. La producción de embriones somáticos en explantes primarios (*HC*, *ECG* e *HP*) cultivados en agar (medio sólido), fue de 8, 15, 30 veces mayor respectivamente, que lo reportado en *C. annuum* a partir de *EC* (Harini y Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996; Jo *et al.*, 1996; Steinitz *et al.*, 2003). Se debe considerar que la diferencia en el número de embriones en estos casos, posiblemente sea producto del tamaño del explante utilizado.

En el protocolo de *ES* para *C. chinense*, los embriones somáticos cultivados en medio sólido que mostraron desarrollo normal, fueron transferidos a medio de cultivo con ABA, como tratamiento para la maduración. Lo anterior permitió obtener posteriormente, embriones germinados. Sin embargo, se observó recalcitrancia a la conversión. Este paso, representa la principal limitante en la aplicación y explotación de la *ES* como herramienta biotecnológica para el mejoramiento de cultivos, no solo en esta especie, sino también, en muchas otras. A pesar de que la recalcitrancia *in vitro* afecta la aplicación práctica de la biotecnología en muchas especies de plantas, no ha sido estudiada con detalle (Benson, 2000).

4.1 Protocolo Propuesto

Etapas del Protocolo propuesto para la inducción de la embriogénesis somática en *C. chinense* J. (Fig. 4.1)

- I. **Germinación *in vitro* de las semillas asépticas de *C. chinense*.** Para la germinación se utilizó un medio compuesto de sales MS, AG₃ (1.1 μM), cisteína-HCl (206.35 μM), sacarosa (3%), gelrite (0.2%). El pH del medio se ajustó a 5.6. (Santana-Buzzy *et al.*, 2005). (20 mL/frasco). Las semillas colocadas en el medio de cultivo antes descrito, se mantuvieron 7 días en oscuridad a una temperatura de 25 ± 2°C. Posteriormente, se transfirieron al fotoperíodo (16 h luz, 40–50 mmol m²s⁻¹), por 8 días a una temperatura de 25 ± 2°C.
- II. **Disección de los explantes asépticos.** El EC se obtuvo directamente de las semillas desinfectadas con ayuda de un estereoscopio. La testa de la semilla sobrante durante la disección del EC, se utilizó también como fuente de explante, a este explante se le dio el nombre de COT. El ECG se extrajo de semillas que se colocaron previamente en medio de germinación. La extracción del ECG se llevó a cabo después de 7 días de mantenerse las semillas en el medio de germinación bajo condiciones de oscuridad. Por otra parte, las plántulas de 15 días de edad, obtenidas a partir de las semillas germinadas se utilizaron como fuente de explante para obtener el HP y la HC.
- III. **Inducción de la embriogénesis somática directa.** La inducción se realizó en un medio que contiene las sales MS, 2,4-D (9.05 μM), sacarosa (3%), tiamina-HCl (29.64 μM), cisteína-HCl (142.36 μM), mioinositol (554.93 μM), gelrite (0.2%). El pH del medio se ajustó a 5.8. (20 mL/frasco). Posteriormente los explantes se mantuvieron en fotoperíodo (16 h luz, 40–50 mmol m²s⁻¹) a una temperatura de 25 ± 2°C por un período de 30-45 días.
- IV. **Maduración de los embriones somáticos.** La maduración se llevó a cabo en un medio líquido con sales MS a la mitad de su concentración, ABA (1.89 μM) sacarosa (3%). El pH se ajustó a 5.8. (50 mL/matraz). Los embriones somáticos se mantuvieron en oscuridad, a una temperatura de 25 ± 2°C, en agitación continua a 80 rpm, por un período de 21 días.
- V. **Germinación de los embriones somáticos.** La germinación se llevó a cabo en un medio con sales MS, AG₃ (1.1 μM), cisteína-HCl (206.35 μM), sacarosa (3%), gelrite (0.2%). El pH se ajustó a 5.6. (20 mL/frasco). Los embriones se mantuvieron en fotoperíodo (16 h luz, 40–50 mmol m²s⁻¹), a una temperatura de 25 ± 2°C, por 15 días.

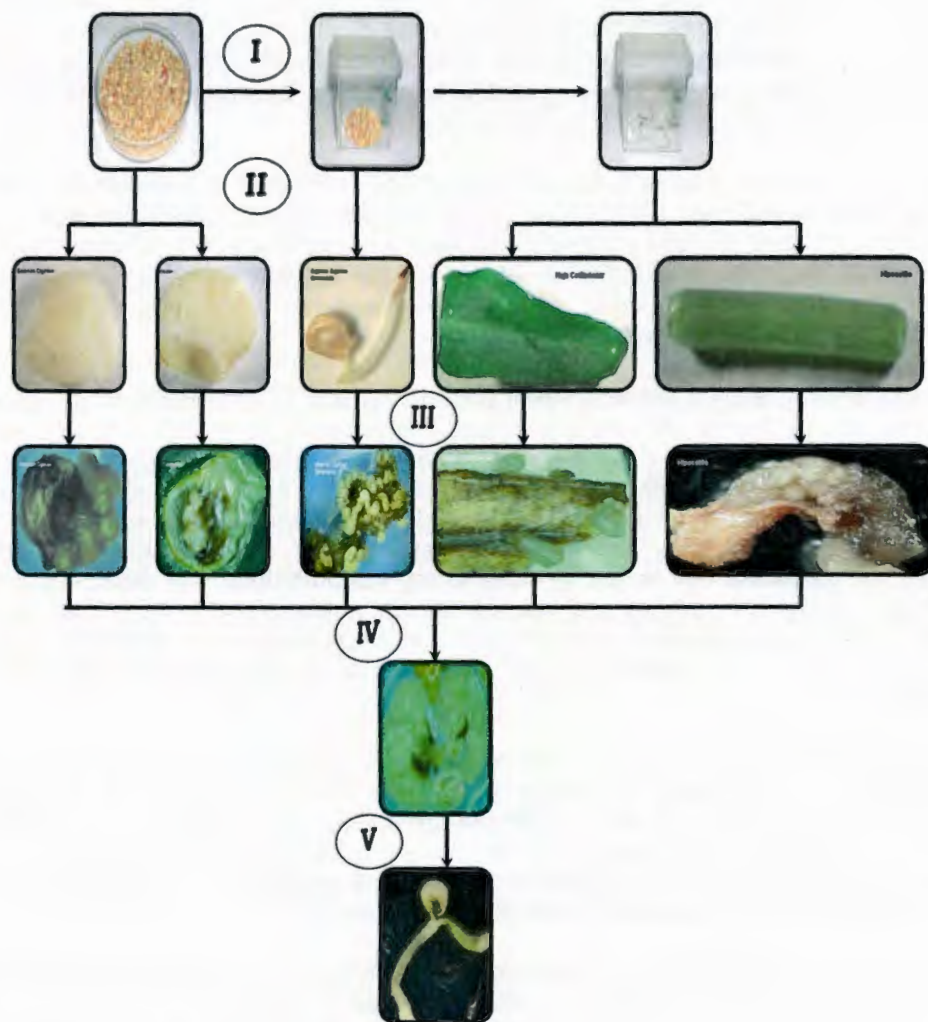


Figura 4.1 Protocolo de ESD en *C. chinense*. (I) Germinación *in vitro* de semillas. MS, AG₃ (1.1 μM), cisteína-HCl (206.35 μM), sacarosa (3%), gelrite (0.2%). pH 5.6. (Santana-Buzzy *et al.*, 2005). (20 mL/frasco). Oscuridad y fotoperíodo 25 ± 2°C, (II) Disección de explantes asépticos, (III) Inducción de la ESD. MS, 2,4-D (9.05 μM), sacarosa (3%), tiamina-HCl (29.64 μM), cisteína-HCl (142.36 μM), mioinositol (554.93 μM), gelrite (0.2%); pH 5.8. (20 mL/frasco). Fotoperíodo 25 ± 2°C, 30-45 días. (IV) Maduración de embriones somáticos. MS/2, ABA (1.89 μM) sacarosa (3%). pH 5.8. (50 mL/matraz). Oscuridad 25 ± 2°C, por 21 días, (V) Germinación de embriones somáticos en un medio con MS, AG₃ (1.1 μM), cisteína-HCl (206.35 μM), sacarosa (3%), gelrite (0.2%). pH 5.6. (20 mL/frasco). Fotoperíodo, a 25 ± 2°C, por 15 días.

Los problemas observados en la etapa de conversión pueden deberse a múltiples factores, los cuales pueden ser considerados como objeto de estudio para futuras investigaciones. Entre estos factores, se considera ideal conocer el balance hormonal de auxinas y citocininas. Sin embargo, también es importante medir los niveles endógenos y evaluar el efecto de la aplicación exógena de otros RCVs, de manera individual o combinada, por ejemplo PAs, etileno y ABA.

El estudio de las PAs durante la *ES* se ha reportado en diferentes especies de plantas (Kakkar y Sawhney, 2002; Kelley *et al.*, 2002; Hamidou *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2006). Por otra parte, debido a que el metabolismo de las PAs está relacionado con el metabolismo del etileno (Gaspar *et al.*, 2003), el estudio combinado de ambos reguladores, nos podría aportar información importante acerca de la respuesta morfogénica de *C. chinense* a la *ES*.

Hatanaka *et al.* (1995) y Nissen (1994) observaron que la concentración de etileno aumenta durante la *ES*. De manera similar Nishiwaki *et al.* (2000), Stasolla *et al.* (2002), Rúdus *et al.* (2006) y Kikuchi *et al.* (2006) reportaron que la concentración de ABA, al igual que la de etileno, incrementa sus niveles endógenos durante la *ES*. Estos autores reportaron el incremento de ABA fue observado tanto en la etapa de maduración como durante la inducción. Ambos RCV son considerados como reguladores del estrés. Por lo que su incremento, sea probablemente debido al estrés provocado por las condiciones artificiales a las que son sometidas las células de los tejidos durante el cultivo *in vitro*. Basándonos en estos trabajos se considera que es importante realizar más estudios sobre el etileno y el ABA durante la *ES* de *C. chinense*.

Se ha reportado que el efecto de la presencia o ausencia de ciertos minerales, especialmente el nitrógeno (Dalvesco y Guerra., 2001), así como la aplicación exógena de aminoácidos, prolina, glutamina, glutamato (Akula *et al.*, 2000) permiten inducir la *ES*. En algunas especies, en las que ya se tiene establecido el proceso de *ES*, el uso de estas sustancias permite mejorar los resultados. Por lo tanto deben considerarse en estudios posteriores de *ES* de *C. chinense*.

La edad y tipo de explante, los RCVs exógenos y endógenos y otros componentes del medio son algunos de los factores que intervienen en la respuesta a la *ES* durante el cultivo *in vitro*. Sin embargo, otros factores como la temperatura, la iluminación y el ambiente, podrían afectar la respuesta, por lo que es necesario continuar con la optimización de cada una de las etapas, para el establecimiento posterior de un protocolo integrado que ayude a solucionar la recalcitrancia a la conversión en esta especie. Entre los explantes evaluados, se recomienda al *HP* como explante adecuado para desarrollar diferentes tipos de estudios, tanto básicos como aplicados, no sólo por su eficiencia y reproducibilidad para formar embriones somáticos, sino por ser un modelo nunca antes reportado en el que los embriones somáticos se originan y multiplican en el interior del explante.

A pesar de que se requiere continuar estudiando los problemas que aún están por resolverse en el proceso de *ES* de *C. chinense*, indudablemente los resultados alcanzados en este estudio son relevantes, no sólo para la especie (*C. chinense*), sino para el género, reconocido dentro de una larga lista de especies vegetales recalcitrantes a la morfogénesis *in vitro*.

El protocolo aquí reportado no sólo ha permitido expresar la capacidad y versatilidad de los tejidos de esta planta para formar embriones somáticos, contrastando con otras especies reportadas dentro del género *Capsicum*, sino también por la eficiencia y reproducibilidad con que ocurre el proceso, por lo que quizá *C. chinense* pudiera ser considerada similar a las especies reportadas como modelos para la *ES*.

Por otro lado, estos resultados constituyen el punto de partida para iniciar muchas investigaciones que irán aportando el conocimiento necesario para comprender y solucionar el fenómeno de la recalcitrancia a la morfogénesis, no sólo para *C. chinense*, sino para muchas otras especies, que están limitadas para formar o desarrollar plantas *in vitro*.

Los antecedentes de estudios histológicos mostrados en el capítulo 1, permiten afirmar que los resultados de este trabajo son los más completos y claros que existen hasta el momento en el género y en la familia, ya que fue posible observar y describir a las células que adquirieron competencia embriogénica. Además, se apreciaron con claridad los diferentes estadios de desarrollo, así como también la polaridad y la independencia de los embriones somáticos.

Se realizaron estudios básicos para entender los procesos morfo-histológicos durante la *ESD* inducida a partir de *ECG*, *HP* y *HC* de *C. chinense*. En *HP* se observó que de manera similar a lo reportado por Guzzo *et al.* (1994), la adquisición de competencia embriogénica comenzó en las células provasculares y que las células epidérmicas solo experimentaron hinchazón y agrandamiento sin participar en el proceso de *ES*. Sin embargo, Guzzo *et al.* (1994), describen solo la formación de *PEMs* en esta zona, siendo necesario transferirlos a un medio sin 2,4-D para la formación de embriones somáticos, mientras que en *C. chinense*, los embriones somáticos se originan directamente de las zonas provasculares sin la intervención de callo, y sin tener que eliminar ni reducir el 2,4-D del medio de cultivo. En éste último punto, hay coincidencia con Masuda *et al.* (1995), que describió la formación directa de embriones somáticos a partir de hipocotilo de *Daucus carota*, que al igual a lo observado en *C. chinense*, es necesaria la presencia del 2,4-D en el medio de cultivo para que los embriones se formen. Sin embargo, en el sistema de Masuda *et al.* (1995) en *Daucus carota*, el origen de los embriones ocurre a partir de células epidérmicas sin tener participación las células de la corteza del explante, cabe señalar que no muestra ningún estudio histológico que aporte mayores detalles.

Entre las posibles interpretaciones sobre la formación de embriones somáticos en la zona provascular del hipocotilo en *C. chinense*, hay que considerar que la auxina se transporta basipetalmente a través de los haces vasculares, por lo que el incremento en la concentración de auxinas en el cámbium vascular debido al transporte basipetal podría proporcionar suficiente auxina para activar la mitosis en el cambium vascular (Uggla *et al.*, 1996), también se ha demostrado que el transporte de auxinas ocurre en células que están dentro o adyacentes a los tejidos vasculares (Wangermann, 1974; Morris y Thomas, 1978). Hay trabajos en los que para continuar la histodiferenciación la auxina se elimina (Zimmerman, 1993) quizá porque hay bastante auxina endógena o por otros factores genéticos. En otros reportes se reduce la concentración o como en *C. chinense* (López-Puc *et al.*, 2006) y en *Daucus Carota* (Masuda *et al.*, 1995) se mantiene a la misma concentración que la utilizada en el medio de inducción. Esto se puede explicar, considerando que hay datos que indican que la auxina es importante para la inducción del desarrollo del tejido vascular (Fosket y Roberts, 1964; Fukuda y Komamine, 1980; Klee *et al.*, 1987; Romano *et al.*, 1991; Aloni, 1995) y que influye en el tamaño de las traqueidas (Sheldrake y Northcote, 1968), y además sirve como señal para la especificación de diferentes tipos de células vasculares (Uggla *et al.*, 1996).

4.2 Bibliografia

Akula A., Becker D. and Bateson M. (2000). High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Rep.* 19: 1140–1145.

Aloni R. (1995). The induction of vascular tissues by auxin and cytokinin. In PJ Davies, Ed. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam 531–546.

Benson E. (2000). Special symposium: In vitro plant recalcitrance: An introduction. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 36:141-148.

Binzel M., Sankhla N., Joshi S. and Sankhla D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*C. annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15:536–540.

DalVesco L. and Guerra M. (2001). The effectiveness of nitrogen sources in *Feijoa* somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 64: 19–25.

Gaj M. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *A. thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul.* 43: 27–47.

Gaspar H., Kevers C., Faivre-Rampant O., Crèvecoeur M., Penel C., Greppin H. and Dommes J. (2003). Changing concepts in plant hormone action. *In vitro Dev. Biol. Plant* 39: 85-106.

Guzzo F., Baldan B., Mariani P., Lo Schiavo F. and Terzi M. (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J. of Exp. Bot.* 45 (279): 1427-1432.

Fukuda H. and Komamine A. (1980). Establishment of an experimental system for the tracheary elements differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 65: 57–60.

Harini I. and Sita L. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*C. annuum* L.). *Plant Sci.* 89:107–112.

Hamidou F. May L. and Chee P. (2005). Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland Cotton. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 81:91–95.

Hatanaka T., Sawabe E. and Azuma T. (1995). The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *C. canefora*. *Plant Sci.* 107: 199-204.

Jo J., Choi E., Choi D. and Lee, K. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*C. annuum* L.). J. Plant. Biol. 39:127-135.

Kakkar R. and Sawhney V. (2002). Polyamine research in plants a changing perspective. Physiol. Plant 116: 281–292.

Kelley R., Zipf A., Wesenberg D. and Sharma G., (2002). Putrescine-enhanced somatic embryos and plant numbers from elite oat (*Avena spp.* L.) and reciprocal crosses. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 38: 508–512.

Kikuchi A., Sanuki N., Higashi K., Koshiba T. and Kamada H. (2006). Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. Planta 223: 637–645.

Klee H., Horsch R., Hinchee M., Hein M. and Hoffmann N. (1987). The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. Genes Dev 1: 86–96.

López-Puc G., Canto-Flick A, Iglesias-Andreu L., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P., Montalvo-Peniche M., Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2006). Direct Somatic Embryogenesis: A Highly Efficient Protocol for In Vitro Regeneration of Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.). HortScience 41 (6):1–7.

Masuda H., Oohashi S., Tokujii Y., Mizue Y. (1995). Direct embryo formation from epidermal cells of carrot hypocotyls. J. Plant Physiol. 145 (4): 531-534.

Morris D. and Thomas A. (1978). A micro autoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings. J Exp Bot. 29: 148–157.

Nakagawa R., Ogita S., Kubo T. and Funada R. (2006). Effect of polyamines and L - ornithine on the development of proembryogenic masses of *C. japonica*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 85 (2):229-234.

Nishiwaki M., Fujino K., Koda Y., Masuda K. and Kikuta Y. (2000). Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. Planta 211: 756–759.

Nissen P. (1994). Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. Physiol. Plant. 92: 397–403.

Romano C., Hein M. and Klee H. (1991). Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. Genes Dev 5: 438–446.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M., Zapata-Castillo P., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O. and

Miranda–Ham M. (2005). Regeneration of Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40:1829–1831.

Sheldrake A. and Northcote D. (1968). The production of auxin by tobacco internode tissues. *New Phytol* 67: 1–13.

Steinitz B., Küsek M., Tabib Y., Paran I. and Zelcer A. (2003). Pepper (*C. annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 39:296–303.

Stasolla C., Kong L., Yeung E. and Thorpe T. (2002). Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 38: 93–105.

Rudús I., Kepczynská E. and Kepczynski J. (2006). Comparative efficacy of abscisic acid and methyl jasmonate for indirect somatic embryogenesis in *M. sativa* L. *Plant Growth Regul.* 48:1–11.

Ugglá C., Moritz T., Sandberg G. and Sundberg B. (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Plant Biol.* 93: 9282-9286.

Wangermann (1974). The pathway of transport of applied IAA through internode segments. *New Phytol* 73: 623–636.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.

5.1 Conclusiones

- Se estableció por primera vez, un protocolo de *ESD* para chile habanero (*C. chinense* Jacq.).
- La *ES* en *Capsicum chinense* J., fue posible inducirla en una amplia variedad de explantes (*HC*, *EC*, *ECG*, *HP* y *COT*), superando los resultados que se han reportado previamente en otras especies del género *Capsicum*.
- Se obtuvieron embriones somáticos que desarrollaron los estadios comúnmente observados en embriones cigóticos de plantas dicotiledóneas.
- En las poblaciones de embriones somáticos de *C. chinense* se cuantificaron en mayor frecuencia, embriones en estadio globular y torpedo, mientras que la frecuencia embriones acorazonados fue muy baja, lo que permite inferir que en esta fase de desarrollo los cambios de estadio ocurren muy rápido.
- El modelo de *ESD* obtenido a partir de *HC*, *ECG* e *HP*, es considerado Embriogénesis Somática Directa de Alta Frecuencia, por el elevado número de embriones somáticos obtenidos por explante.
- El *HP* resultó el explante más adecuado para la inducción de la *ES* en *C. chinense*, por mostrar mayor capacidad para formar embriones (175 ± 20), además de ser un explante con mayor tejido disponible y de fácil manipulación.
- Los embriones somáticos formados a partir de *HP* se originaron en el interior del explante, directamente de las zonas provasculares. Mientras que los embriones somáticos formados a partir de los otros tipos de explantes estudiados, se originaron siempre de las células epidérmicas y subepidérmicas
- Las evidencias histológicas obtenidas, representan una contribución al entendimiento del origen y evolución de la *ES* en el género *Capsicum* y en lo particular en la especie *C. chinense*.
- Se pudo constatar mediante el análisis histológico, que en todos los casos la *ES* fue inducida directamente de las células del explante y que la estructura de los embriones formados es perfectamente bipolar sin que exista conexión vascular con el tejido materno.
- En *HC*, los embriones somáticos se originaron siempre de las células de la epidermis; en *ECG* se forman en la superficie y en el interior del explante, mientras que en *HP*, los embriones somáticos sólo se originaron de las células provasculares.
- Este trabajo presenta la caracterización más completa de *ES*, no solo en el género *Capsicum*, sino también dentro de la familia Solanaceae.

5.2 Perspectivas

El chile habanero representa un cultivo de importancia para el Estado de Yucatán. Sin embargo, se reportan cuantiosas pérdidas de su producción generadas por enfermedades y plagas. La *ES* como herramienta biotecnológica podría ofrecer soluciones a estos problemas. Además, la regeneración *in vitro* es una de las pocas vías de recuperar y propagar plantas en grandes cantidades a partir de células transformadas genéticamente. Aunque se han logrado obtener plantas transgénicas a partir de muchas especies en la familia Solanaceae por la organogénesis, la ruta de *ES* no ha sido viable.

Este trabajo es relevante por ser el primero de *ESD* reportado para esta especie. La obtención de embriones somáticos por la vía directa es preferida sobre la indirecta, porque es menos probable obtener variación somaclonal. Sin embargo, se observaron diferentes anomalías en el desarrollo de los embriones, sobre todo durante la conversión. Por lo que el sistema aquí presentado, puede ser objeto de estudios bioquímicos y moleculares que conlleven en un futuro a resolver las limitaciones observadas, permitiendo que este método de propagación sirva como herramienta para realizar estudios de ingeniería genética para obtener plantas resistentes a plagas, bacterias, virus y hongos.