



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
PIN1, *PIN4* Y *PIN7* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS
DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

PEDRO MANUEL OSORIO MONTALVO

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2015

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *PIN1*, *PIN4* Y *PIN7* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Septiembre de 2015.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: IBQ. PEDRO MANUEL OSORIO MONTALVO

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Recalcitrancia del género *Capsicum*: estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile *in vitro* (Ciencia Básica CONACyT, CB60170)” bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios, por hacer que el Universo y las circunstancias conspiran a mi favor, por darme vida y salud, una gran familia, buenos amigos y mentores generosos que me apoyaron en el transcurso de este proceso formativo.
- ❖ A mis padres, José Albino y Elvira Margarita, por darme la vida, por creer siempre en mí, por apoyarme y amarme desde el día en que nací.
- ❖ A mis hermanos Orlando (+) y Víctor Hugo que siempre han estado, están y estarán a mi lado cuando los necesite.
- ❖ A Abril Escobedo por su amistad y su apoyo incondicional durante estos últimos años.
- ❖ A mi tía María del Carmen por todo su apoyo moral, afectivo y profesional, sin ella no hubiera llegado tan lejos.
- ❖ A toda mi familia: Abuelos, tíos y primos que de alguna manera me ayudaron a seguir adelante.
- ❖ A la Dra. Nancy Santana, por toda su ayuda tanto profesional como personal y ser el mayor apoyo que tuve en la realización de este proyecto.
- ❖ A la M.C. Adriana Canto por su amistad, por supervisarme y apoyarme tan amablemente en todo lo que necesité.
- ❖ Al Dr. Raúl Valle por ayudarme y enseñarme a solucionar múltiples problemas técnicos durante mi trabajo.
- ❖ A todos mis compañeros de laboratorio: Dra. Susana Avilés, Dra. Eunice Gómez, M.C. Eduardo Balam, M.C. Carlos Regla, M.C. Guadalupe Herrera, M.C. Jacobo Pérez, M.C. Mario Puc, M.C. Karime Zubieta, Lic. Liliana

Muñoz, L.B.E. Maximino Gómez, Eduardo Ballina, Ing. Yasmín Rodríguez.

- ❖ A mi comité de Titulación: Dr. Luis Sáenz, Dr. Rafael Rojas, Dr. Javier Mijangos y Dra. Sara Nahuat por su valiosa orientación para sacar adelante esta tesis.
- ❖ A la Dra. Teresa Hernández, Coordinadora de la Opción en Bioquímica y Biología Molecular, del Posgrado en Ciencias Biológicas, por su apoyo y amable disposición en los múltiples trámites y actividades propias del posgrado.
- ❖ Al Dr. Antonio Granell y a la Universidad Politécnica de Valencia (España), por acogerme en su grupo y en sus instalaciones, respectivamente, y permitirme enriquecer mi formación académica aprendiendo durante mi estancia la Tecnología de Transformación Genética de Plantas mediante el Sistema de Ensamblaje de DNA GoldenBraid®.
- ❖ A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y al Centro de Investigación Científica de Yucatán por brindar sus instalaciones y su personal para poder realizar el trabajo experimental.
- ❖ Al CONACyT por el apoyo otorgado por la beca No. 366292.

DEDICATORIA

A la memoria de Orlando Osorio Montalvo (+), gracias por dejarme ser tu hermano menor física y terrenalmente durante 17 años, espiritualmente serás mi hermano mayor para toda la eternidad.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. EL CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.)	3
1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CHILE HABANERO.....	3
1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	6
1.3. EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	8
1.4. CONTROL HORMONAL DEL DESARROLLO <i>IN VITRO</i>	10
1.5. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>CAPSICUM</i>	11
1.6. EL ROL DE LAS AUXINAS EN EL DESARROLLO VEGETAL.....	13
1.6.1. ACCIÓN DE LAS AUXINAS A NIVEL MOLECULAR.....	16
1.6.2. EL TRANSPORTE DE AUXINAS.....	17
1.6.3. LA HIPÓTESIS QUIMIOSMÓTICA.....	18
1.7. TRANSPORTADORES DE AUXINAS Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS PIN.....	19
1.7.1. FUNCIONES PRINCIPALES DE LAS PROTEÍNAS PIN.....	22
1.7.2. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS.....	23
1.7.3. EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS PIN EN EL TRANSPORTE DE AUXINAS DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	25
HIPÓTESIS	331
OBJETIVO GENERAL.	331

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	331
JUSTIFICACIÓN.....	32
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
CAPÍTULO II	47
EXPRESIÓN DE PIN1, PIN4 Y PIN7 EN EMBRIONES DE CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.)	47
2.1. INTRODUCCIÓN.....	47
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
2.2.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS E INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>C. CHINENSE</i>	48
2.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDOS DE <i>C. CHINENSE</i> EN DIFERENTES MOMENTOS DE LA INDUCCIÓN Y DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	49
2.2.3. SINTESIS DE ADNc A PARTIR DE DIFERENTES TEJIDOS.....	52
2.2.4. DISEÑO DE CEBADORES.....	53
2.2.5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA <i>PIN1</i> , <i>PIN4</i> Y <i>PIN7</i>	55
2.2.6. ELECTROFORESIS DE RNA.....	55
2.2.7. REAMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	56
2.2.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	56

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
2.3.1. AMPLIFICACIÓN, ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES <i>PIN1</i> , <i>PIN4</i> Y <i>PIN7</i> DE <i>C. CHINENSE</i>	57
2.3.1.1. <i>PIN1</i>	57
2.3.1.2. <i>PIN4</i>	60
2.3.1.3. <i>PIN7</i>	63
2.3.2. EXPRESIÓN DE <i>PIN1</i> , <i>PIN4</i> Y <i>PIN7</i> EN HIPOCOTILOS EN INDUCCIÓN, EMBRIONES CIGÓTICOS Y EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>C. CHINENSE</i>	67
2.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	76
2.4.1. CONCLUSIONES.....	76
2.4.2. PERSPECTIVAS.....	76
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	78

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Las cinco especies domesticadas del género <i>Capsicum</i>	3
Figura 1.2. Producción de chile habanero en México (SIAP, 2015).....	5
Figura 1.3. Los principios básicos de CTV y el comportamiento de los cultivos (Pérez-Molphe <i>et al.</i> , 1999).....	9
Figura 1.4. Control de la diferenciación ejercido por la interacción entre las auxinas y las citocininas en los cultivos <i>in vitro</i> (modificado de Pérez- Molphe <i>et al.</i> , 1999).....	11
Figura 1.5. Mecanismo de acción de las auxinas a nivel molecular (Modificado de Jenik y Barton, 2005).....	16
Figura 1.6. Movilización de IAA de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica (Modificado de Zazimalova <i>et al.</i> , 2010).....	19
Figura 1.7. Transporte celular de auxinas (Zazimalova <i>et al.</i> , 2010).....	20
Figura 1.8. Transporte de auxinas mediado por proteínas PIN durante el desarrollo embrionario de <i>A. thaliana</i> (Tanaka <i>et al.</i> , 2003).....	25
Figura 1.9. Concentración de auxinas en embriones de <i>A. thaliana</i> (Friml <i>et al.</i> , 2003)....	27
Figura 1.10. Embriones mutantes <i>pin7</i> de <i>A. thaliana</i> (Friml <i>et al.</i> , 2003).....	28
Figura 1.11. Embriones mutantes <i>pin1</i> de <i>A. thaliana</i> (Friml <i>et al.</i> , 2003).....	28
Figura 1.12. Embriones silvestres y mutantes <i>pin4</i> de <i>A. thaliana</i> (Friml <i>et al.</i> , 2002a)....	29
Figura 1.13 Embriones mutantes <i>pin1pin3pin4pin7</i> con el patrón apical-basal completamente comprometido (Friml <i>et al.</i> , 2003).....	30
Figura 1.14. Estrategia experimental.....	33
Figura 2.1. Protocolo de embriogénesis somática (Avilés-Viñas <i>et al.</i> , 2012)	49

Figura 2.2. Hipocotilos en inducción	50
Figura 2.3. Frutos de <i>C. chinense</i> en diferentes momentos de desarrollo.....	558
Figura 2.4. Geles de agarosa que comprueban la integridad del ARN total extraído	52
Figura 2.5. Geles de agarosa que comprueban la integridad del ADNc sintetizado	53
Figura 2.6. Gradientes para la amplificación de <i>PIN1</i> en ADNc de planta completa de <i>C. chinense</i>	58
Figura 2.7. Alineamiento de <i>PIN1</i> putativo en <i>C. chinense</i> con diferentes especies.	59
Figura 2.8. Reconstrucción filogenética de <i>PIN1</i> putativo	60
Figura 2.9. Gradientes para la amplificación de <i>PIN4</i> en ADNc de planta completa de <i>C. chinense</i>	658
Figura 2.10. Alineamiento de <i>PIN4</i> putativo en <i>C. chinense</i> con diferentes especies	62
Figura 2.11. Reconstrucción filogenética de <i>PIN4</i>	63
Figura 2.12. Gradientes para la amplificación de <i>PIN7</i> en ADNc de planta completa de <i>C. chinense</i>	64
Figura 2.13. Alineamiento de <i>PIN7</i> putativo en <i>C. chinense</i> con diferentes especies	65
Figura 2.14. Reconstrucción filogenética de <i>PIN7</i> putativo	66
Figura 2.15. Expresión del gen constitutivo 18S ribosomal para verificar la integridad del ADNc en diferentes tejidos de <i>C. chinense</i>	68
Figura 2.16. Expresión de los genes <i>CcPIN1</i> , <i>CcPIN4</i> y <i>CcPIN7</i>	69
Figura 2.17. Expresión de los genes <i>PIN1</i> , <i>PIN4</i> y <i>PIN7</i> en <i>C. chinense</i> y <i>A. thaliana</i> ...	758
Figura 2.18. Efecto de las auxinas en la expresión de genes <i>PIN</i>	72

Figura 2.19. Expresión de <i>PIN1</i> en <i>P. abis</i> y <i>C. chinense</i>	73
Figura 2.20. Expresión de los genes <i>PIN1</i> , <i>PIN4</i> y <i>PIN7</i> en <i>C. chinense</i> y <i>S. lycopersicum</i>	73
Figura 2.21. Expresión relativa de los genes relacionados con la embriogénesis somática	74

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Taxonomía del Chile habanero (ITIS, 2015).....	6
Cuadro 1.2. Artículos que reportan la recalcitrancia del género <i>Capsicum</i>	13
Cuadro 1.3. Protocolos para la Embriogénesis Somática	14
Cuadro 2.1. Cebadores de tomate empleados para amplificar el gen <i>PIN1</i>	54
Cuadro 2.2. Cebadores de tomate empleados para amplificar el gen <i>PIN4</i>	54
Cuadro 2.3. Cebadores de tomate empleados para amplificar el gen <i>PIN7</i>	55
Cuadro 2.4. Cebadores de <i>C. annuum</i> empleados para amplificar el gen <i>PIN1</i>	57
Cuadro 2.5. Alineamiento de <i>PIN1</i> putativo de <i>C. chinense</i> en diferentes especies mediante BLASTn.	58
Cuadro 2.6. Cebadores de <i>C. annuum</i> empleados para amplificar el gen <i>PIN7</i>	64
Cuadro 2.7. Alineamiento de <i>PIN7</i> putativo de <i>C. chinense</i> en diferentes especies mediante BLASTn	65

ABREVIATURAS

18S	Gen 18S ribosomal (Gen constitutivo)
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucléico
ADNc	Ácido desoxirribonucléico complementario
AIA	Ácido indolacético
ARN	Ácido ribonucléico
BS	Bootstrap
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
dNTPs	Nucleótidos trifosfatados
EC	Embriogénesis cigótica / Embrión cigótico
ECI	Embrión cigótico inicial
ECA	Embrión cigótico avanzado
ES	Embriogénesis somática / Embrión somático
ESA	Embrión somático avanzado
ESI	Embrión somático inicial
ML	Máxima verisimilitud

MS	Murashige y Skoog
PAT	Transporte polar de auxinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RCV	Regulador de crecimiento vegetal
RT-PCR	PCR con transcriptasa inversa

RESUMEN

El transporte polar de auxinas es responsable de direccionar y generar los gradientes locales de auxinas fundamentales para muchos procesos de desarrollo en las plantas, estos gradientes están generados por tres familias de proteínas transportadoras: Las proteínas AUX1/LAX, asociadas a la entrada de auxinas, mientras que las proteínas ABCB/PGPs y particularmente las proteínas PIN, son asociadas al transporte de salida. Se ha demostrado que en *A. thaliana* existen tres genes de la familia PIN que se expresan en diferentes lugares y en diferentes momentos durante el desarrollo embrionario: *PIN1*, *PIN4* y *PIN7*. El control temporal y espacial de la expresión de las proteínas PIN parece ser el responsable de la dinámica y el cambio del patrón de acumulación de auxinas en los embriones cigóticos, y por ende de la definición del eje apical-basal en éstos. *Capsicum chinense* Jacq. es una especie recalcitrante a la conversión de embriones somáticos en plantas, presentando deformidades en el ápice caulinar en los estadios tardíos de este proceso. Considerando los reportes antes mencionados, se realizó el análisis de la expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en *C. chinense* Jacq. durante la etapa de inducción al proceso de embriogénesis somática, en embriones somáticos y en embriones cigóticos por medio de RT-PCR. La baja expresión de los genes *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7* revelada durante la etapa de inducción de la embriogénesis somática y en los mismos embriones somáticos, indica que probablemente se esté afectando el transporte polar de auxina en los embriones somáticos de *C. chinense*, de manera tal que la inhibición o alteración en la acumulación de auxina durante la embriogénesis, puede estar interfiriendo en el programa de división celular y subsecuentemente, la adecuada diferenciación del meristemo apical. Los resultados en este trabajo servirán de base para la realización de futuras investigaciones orientadas a entender los mecanismos moleculares del transporte de auxinas en *C. chinense* Jacq., y particularmente asociadas con la recalcitrancia *in vitro* del género *Capsicum*.

ABSTRACT

Polar auxin transport is responsible for addressing and generate local gradients of fundamental auxins for many developmental processes in plants, these gradients are generated by three families of transport proteins: AUX1/LAX proteins, associated with the entry of auxins, while ABCB/PGPs and particularly PIN proteins are associated with the transport output. It has been shown that there are three *PIN* family genes expressed in different places and at different times during embryonic development in *A. thaliana*: *PIN1*, *PIN4* and *PIN7*. The temporal and spatial control of the expression of PIN proteins appears to be responsible for the dynamic and changing the pattern of auxin accumulation in zygotic embryos, and therefore the definition of the apical-basal axis thereof. *Capsicum chinense* Jacq. is a recalcitrant species conversion of somatic embryos into plants, presenting shoot apex deformities in the later stages of this process. Based on the above reports, the analysis was focused on the expression of *PIN1*, *PIN4* and *PIN7* genes in *C. chinense* Jacq. induction stage during the process of somatic embryogenesis, somatic embryos and zygotic embryos by RT-PCR. Low expression of *CcPIN1*, *CcPIN4* and *CcPIN7* genes were revealed during somatic embryogenesis induction process and in the same somatic embryos, which probably indicates the affecting of polar auxin transport in somatic embryos of *C. chinense*, that inhibition or altered auxin accumulation during embryogenesis, may be is interfering with the program of cell division and subsequently, proper differentiation of the apical meristem. The results presented in this paper will form the basis for future research aimed at understanding the molecular mechanisms of auxin transport in *C. chinense* Jacq., and particularly associated with *in vitro* of the genus *Capsicum* recalcitrance.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupa el segundo lugar después del cultivo de tomate. El alto nivel de pungencia de sus frutos es debido a su contenido de capsaicina, que es un alcaloide que se encuentra en las células de la placenta, éste define el uso comercial del fruto y lo hace ser muy codiciado en diferentes industrias. Yucatán (México), es reconocido como centro de reserva genética de esta especie por la gran diversidad que existe en la región (Tun-Dzul, 2001).

La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye en más del 90% del volumen de producción estatal, que en mayor parte se comercializa y se consume en fresco y solo una pequeña parte se utiliza en la industria como materia prima para la elaboración de salsas picantes (Tun-Dzul, 2001). Otro uso importante del chile es la aplicación de la capsaicina en el tratamiento de la salud, pasando por la obtención de materia prima con fines artesanales e industriales (Maggi, 1992 y Vergara *et al.*, 2006).

Debido a su creciente demanda, aunada a los problemas que afectan la productividad del cultivo, ha despertado recientemente el interés en desarrollar protocolos de regeneración más eficientes con el objetivo de propagar variedades criollas, cultivares, y particularmente para liberar accesiones que son conservadas en el banco de germoplasma *in vitro* registrado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, o bien para multiplicar híbridos y/o plantas transformadas genéticamente como parte del programa de mejoramiento genético en esta especie. Actualmente, la mayoría de los sistemas de mejoramiento genético de los cultivos utiliza como una parte fundamental del proceso el cultivo de tejidos embriogénicos regenerables (Barampuram y Zhang, 2011). Los cultivos

INTRODUCCIÓN

embriogénicos totipotentes también son deseables para una eficiente producción de embriones somáticos para otras aplicaciones biotecnológicas, tales como propagación clonal, la producción de semillas sintéticas (Gray y Purohit, 1991), y la utilización de los embriones somáticos para acortar los protocolos de mejoramiento genético (Murray *et al.*, 2013). Existen numerosos reportes que argumentan la recalcitrancia del género *Capsicum* a la morfogénesis in vitro. Este fenómeno en el género, se manifiesta a través de: 1) La baja eficiencia de los sistemas de regeneración, 2) La baja reproducibilidad de los protocolos de regeneración, 3) El alto índice de embriones somáticos deformados, y 4) La baja tasa de germinación y/o conversión de los embriones somáticos en plantas (Steinitz *et al.*, 2003).

A pesar de la importancia agronómica de *C. chinense* Jacq., han sido pocos los genes identificados que tengan una relación directa con la inducción de la embriogénesis somática, y su papel en la respuesta embriogénica aún no se entiende. El transporte polar de auxinas es el encargado de direccionar y generar los gradientes locales de auxinas y es fundamental para los procesos de desarrollo y diferenciación en las plantas. Evidencias experimentales indican que los gradientes locales de auxinas están generados por tres familias de proteínas transportadoras de auxinas que son esenciales para las acciones de éstas: Las AUXIN-RESISTANT1/AUX1-LIKEs (AUX/LAXs) para la entrada de auxinas, y las proteínas exportadoras PINFORMEDs (PINs) y varias ATP-binding cassette B/P-glicoproteínas (ABCB/PGP) (Grunewald y Friml, 2010).

Este estudio se realizó con el propósito de analizar la expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* por medio de RT-PCR y su posible relación con la incapacidad de los embriones somáticos de esta especie para convertirse en plantas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. EL CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* JACQ.)

1.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CHILE HABANERO

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae, es nativo de América y está formado por 27 especies, de las cuales 5 han sido domesticadas (Figura 1.1): *C. annuum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* Linné y *C. pubescens* Ruiz & Pavón (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001).

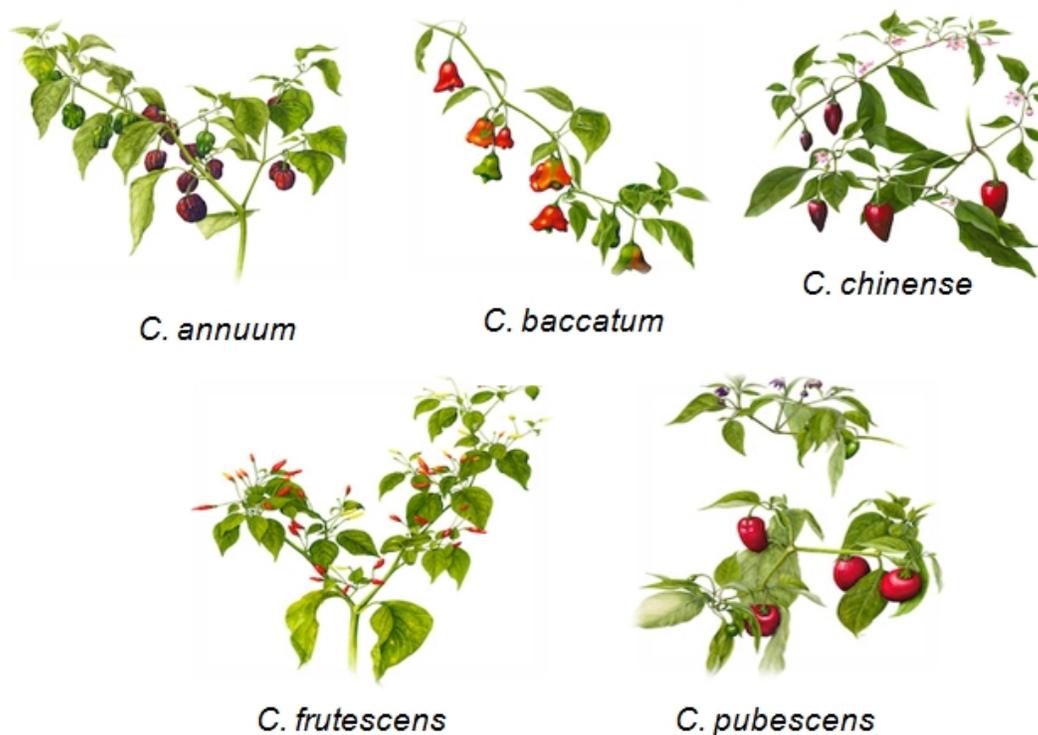


Figura 1.1. Especies domesticadas del género *Capsicum*.

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) proviene de las tierras bajas de la cuenca Amazónica y de ahí se dispersó a Perú durante la época prehispánica. La distribución también se dirigió hacia la cuenca del Orinoco (ubicada actualmente en territorios de Colombia y Venezuela) hacia Guyana, Surinam, la Guyana Francesa y las Antillas del Caribe (González-Estrada *et al.*, 2006).

Se ha sugerido que la introducción prehispánica del chile habanero en el Caribe se debió a migraciones indígenas de agricultores y alfareros procedentes de Sudamérica, pertenecientes a grupos arahuacos (originarios de Puerto Rico), quienes viajaron por las Antillas menores hasta llegar a Puerto Rico, La Española (República Dominicana y Haití), Jamaica y Cuba, entre los años 250 d.C. y 1000 d. C. (Andrews, 1984).

La llegada del *C. chinense* a la península de Yucatán antes de la conquista europea es poco probable (Long-Solís, 2004); sin embargo, investigaciones recientes reportan evidencia del contacto precolombino vía marítima, entre los tainos (aborígenes de Puerto Rico) y los mayas del periodo clásico.

Otra teoría de la incursión temprana del chile habanero a Yucatán señala que pudo haber sido por vía terrestre a través de nexos comerciales, pues a la llegada de Colón a las Antillas en 1492, los tainos (descendientes de los arahuacos) ya consumían ají (chile), según lo señala dicho personaje en las notas de su primer viaje a América (Andrews, 1999).

En el siglo XVI, Diego de Landa reporta el consumo del chile entre los mayas:

...Que también tuestan el maíz, lo muelen y deslíen en agua, que es muy fresca bebida, echándole un poco de pimienta de indias (chile) o cacao. Por la mañana toman la bebida caliente con pimienta (chile), como está dicho, y entre día, las otras (bebidas) frías, y a la noche los guisados; y que si no hay carne, hacen sus salsas de la pimienta (chile) y legumbres”.

Si bien el testimonio no especifica de qué variedad de chile se trata, deja claro su consumo tradicional. Pero a falta de una evidencia tangible sobre la introducción prehispánica del chile habanero a la península de Yucatán, se ha planteado otra hipótesis que apoya su llegada posterior a la conquista. Al respecto, se argumenta la prueba lingüística de que no existe un término en lengua maya para identificar el chile habanero, como los hay para otros chiles de la zona como el *xcat-ik*, *yaax-ik*, *chawa-ik*, *maax-ik* y otros. De aquí se desprende la creencia más extendida de que tanto el fruto como el nombre provengan de los comerciantes españoles que lo trajeron a la península desde Cuba en épocas más recientes (Long-Solís, 2004).

En México (Figura 1.2), las regiones que producen dicha variedad de chile son Baja California Sur, San Luis Potosí, Chiapas, Sonora, Tabasco y Veracruz, sin embargo, más del 30% de la producción destinada a los mercados nacional e internacional proviene de Yucatán, Campeche y Quintana Roo. El estado de Yucatán ocupa el primer lugar en producción a nivel nacional con una cantidad de 2,573.2 toneladas (SIAP, 2015).

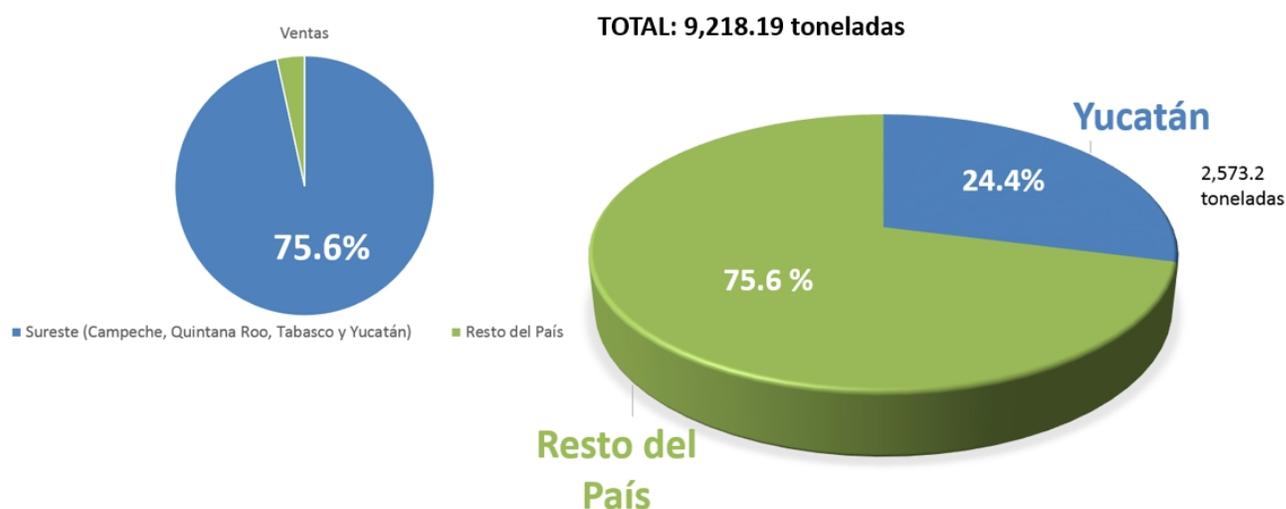


Figura 1.2. Producción de chile habanero en México (SIAP, 2015).

1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Las cinco especies domesticadas del género *Capsicum* tienen parientes silvestres cercanos, con los cuales se cruzan rápidamente, produciendo híbridos viables y fértiles. Dichos parientes aún no se han evaluado completamente, pero aparentemente contienen fuentes útiles de resistencia a enfermedades virales, bacterianas y fungosas. Además, existen alrededor de otras 20 especies silvestres de *Capsicum*, las cuales están menos relacionadas, pero de las que, al menos algunas, pueden cruzarse con ellas. Muchas de las especies silvestres tienen una distribución restringida y algunas pueden contener genes para la adaptación a condiciones ambientales adversas, así como la resistencia a enfermedades. La clasificación del cultivo de Chile puede establecerse fácilmente hasta el nivel de género, pero debido a su gran diversidad, la diferenciación a nivel de especie y variedad es muy complicada (Tun-Dzul, 2001).

El Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2015), clasifica al Chile habanero como se muestra en la siguiente tabla:

Cuadro 1.1. Taxonomía del Chile habanero (ITIS, 2015).

Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Infrareino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophyta
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.

Tun-Dzul (2001) asigna las siguientes características botánicas para chile habanero:

- El Chile habanero es una planta de ciclo anual, pudiendo alcanzar hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico. Su altura es variable pero en los cultivares comerciales puede oscilar entre 75 y 120 cm.
- Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas (2.5-3.5 mm), tienen testa de color café claro o café oscuro y su período de germinación varía entre 8 y 15 días. El sabor picante se debe a la presencia de capsaicina, sustancia muy irritante en estado puro y cuya mayor concentración se encuentra en la placenta de los frutos.
- Tiene raíz pivotante y un sistema radicular bien desarrollado, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, las características del suelo y las prácticas de manejo que se le proporcionen; pueden alcanzar longitudes mayores a los 2 m.
- Su tallo es grueso, erecto y robusto y generalmente tiende a formar tres tallos en la primera ramificación.
- Las hojas son simples, lisas, y de forma lanceolada, de tamaño variable lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonalidades dependiendo de la variedad.
- Las flores son de color blanco; su tamaño varía entre 1.5 y 2.5 cm. de diámetro de la corola; estos órganos se emiten en cada ramificación y pueden presentar racimos de hasta 6 flores, dando lugar a un promedio de tres frutos.
- Los frutos se clasifican como una baya poco carnosa; son huecos y tienen entre tres y cuatro lóbulos; la semilla se aloja en placentas blancuzcas y secas, que no están envueltas por mucosas, y las membranas de los lóculos generalmente no se prolongan hasta el centro. Suelen ser de forma y tamaño variables. El color a la maduración puede ser amarillo, rojo, naranja o café y su sabor siempre es picante, aunque el grado de pungencia depende de la variedad.

1.3. EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se define como el conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de células, brotes y/o embriones somáticos a partir de cualquier célula, tejido u órgano de una planta, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

El CTV se ha usado como una alternativa para la propagación de plantas, además, es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, por otro lado, tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

El CTV se basa en tres principios básicos (Figura 1.3), de cuya comprensión y manipulación depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos son los siguientes:

- Elección del explante: Se le llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va a ser utilizado para iniciar el cultivo. Éste puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores, entre otros.
- Elección del medio de cultivo y de condiciones de cultivo: El medio de cultivo junto con el tipo de explante determina la respuesta que se obtendrá del mismo, por lo cual su elección y adecuada formulación son los aspectos fundamentales para el éxito del CTV. El medio de cultivo consta de componentes esenciales, es decir, aquellos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejido, éstos incluyen a los nutrientes minerales, fuente de carbono y algunas vitaminas; y los compuestos llamados opcionales, que si bien en ocasiones no son

indispensables para mantener la vida del tejido cultivado, sí determinan en gran medida el tipo de respuesta que se obtendrá de éste, y por lo tanto influyen en el éxito o fracaso del establecimiento o respuesta de los cultivos *in vitro*. A este grupo pertenecen las fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal. Además de la formulación del medio, es importante considerar las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad), ya que éstas contribuyen también a la respuesta del explante.

- Condiciones asépticas: Para que el cultivo de cualquier tejido vegetal prospere de la manera deseada, debe excluirse del mismo a cualquier tipo de organismo contaminante; por eso, tanto el medio de cultivo, como el material vegetal deben esterilizarse para evitar cualquier tipo de contaminación (Pérez- Molphe *et al.*, 1999).

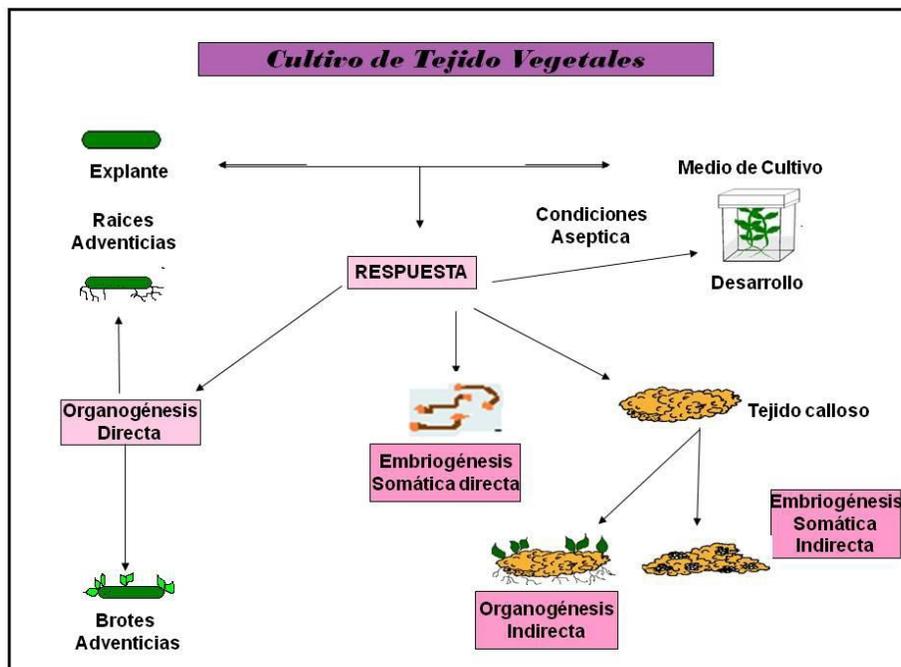


Figura 1.3. Los principios básicos de CTV y el comportamiento de los cultivos (modificado de Pérez- Molphe *et al.*, 1999).

1.4. CONTROL HORMONAL DEL DESARROLLO *IN VITRO*

A las primeras hormonas y reguladores sintéticos con efectos sobre el crecimiento de las plantas, fueron identificados como hormonas del crecimiento, reguladores del crecimiento, sustancias reguladoras del crecimiento o sustancias del crecimiento (Szweykowsky, 1993).

Los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) se clasifican en 5 grupos básicos, dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Actualmente se han aislado y estudiado otras sustancias fuera de estos grupos, que podrían ser también consideradas como RCV, por ejemplo: las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y los brasinoesteroides (Davies, 1995).

Los RCV más utilizados en los cultivos *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, ya que son los que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo, en los cultivos de tejidos vegetales. En menor grado se utilizan algunos reguladores no pertenecientes a estos grupos como las giberelinas y el ácido abscísico (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Alterando ligeramente las concentraciones relativas de auxina y citocinina, los investigadores han podido modificar el desarrollo de las células indiferenciadas en el cultivo *in vitro* de muchas especies vegetales. Una concentración más o menos igual de las dos hormonas hace que las células sigan indiferenciadas, formando masas celulares amorfas llamadas callos. Cuando la concentración de auxina es superior, el tejido indiferenciado forma raíces; con una concentración superior de citocinina se forman yemas. Un cuidadoso equilibrio de las dos hormonas puede inducir raíces y/o yemas (Figura 1.4).

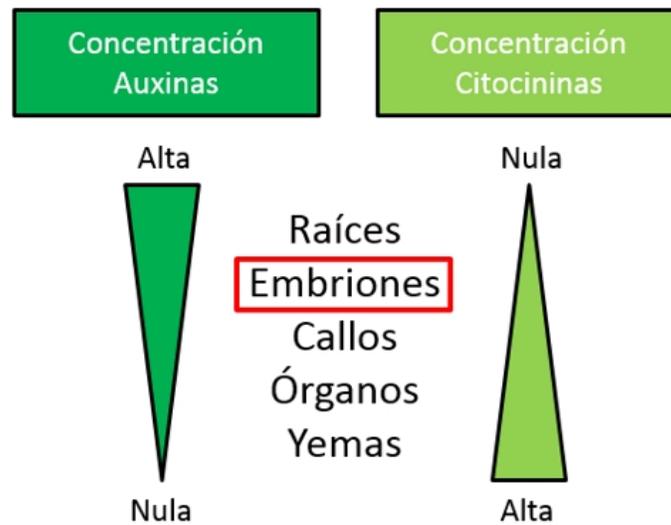


Figura 1.4. Control de la diferenciación ejercido por la interacción entre las auxinas y las citocininas en los cultivos *in vitro* (modificado de Pérez- Molphe *et al.*, 1999).

1.5. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Capsicum*

La Embriogénesis Somática es un sistema ideal para investigar los procesos completos de diferenciación de plantas, así como los mecanismos de expresión de totipotencia en células vegetales, tiene muchas ventajas comparada con la embriogénesis cigótica; por ejemplo, a) el proceso de embriogénesis es fácilmente monitoreado, b) el ambiente del embrión puede ser controlado, c) un gran número de embriones puede ser fácilmente obtenido (Avilés, 2007).

Se ha definido a los embriones somáticos asexuales o adventicios a aquellos iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales (Roca y Mroginski, 1991).

La Embriogénesis Somática (ES) se puede definir 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 (William y Maheswaran, 1996).

La ES *in vitro*, puede ocurrir por dos vías: Directa (ESD) e Indirecta (ESI); en la ESD los embriones se originan directamente de las células del explante, en la ESI, en una primera etapa del cultivo, se forma un callo (Figura 1.3). Si este callo es transferido a un medio de cultivo líquido, donde es desagregado, se forma una suspensión celular a partir de la cual son inducidas las células a formar los embriones somáticos. Este es un proceso mucho más complejo que la ESD. La ESD se da cuando las células del explante original están predeterminadas a formar embriones somáticos, por lo que sólo se requiere proporcionar al tejido las condiciones adecuadas para la inducción y diferenciación de los embriones somáticos. En la ESI, el explante original no tiene células proembriogénicas, por lo que se requiere primero darle al tejido las condiciones para que ocurra la inducción y luego cambiarlo a otras que sean propicias para la diferenciación de los embriones. Las células de tejidos muy jóvenes, como por ejemplo los embriones cigóticos inmaduros; son ya en una buena proporción células proembriogénicas, o si no lo son, son fácilmente inducibles para que lo sean. Por el contrario, las células más diferenciadas o de tejidos adultos muy difícilmente o casi nunca se llegan a convertirse en proembriogénicas. Esto explica por qué la ES resulta sencilla en algunos tejidos y prácticamente imposible en otros (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

El método biotecnológico más eficiente de regeneración de plantas *in vitro*, es la embriogénesis somática (ES), sin embargo, existen numerosos reportes que argumentan la recalcitrancia del género *Capsicum* a la morfogénesis *in vitro* (Tabla 1.2).

Cuadro 1.2. Reportes la recalcitrancia del género *Capsicum*.

Artículo	Autor
Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (<i>C. annuum</i> L.)	Harini y Sita 1993
Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.)	Binzel <i>et al.</i> , 1996
Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (<i>C. annuum</i> L.)	Jo <i>et al.</i> , 1996
<i>In vitro</i> chili pepper Biotechnology	Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón 2001
Pepper (<i>Capsicum annuum</i> L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot	Steinitz <i>et al.</i> , 2003
Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for <i>in vitro</i> regeneration of Habanero pepper (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	López-Puc <i>et al.</i> , 2006
Improvement of <i>in vitro</i> culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects	Santana-Buzzy <i>et al.</i> , 2006
Ontogenesis of the somatic embryogenesis of Habanero pepper (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	Santana-Buzzy <i>et al.</i> , 2009
Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis	Kothari <i>et al.</i> , 2010
Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor	Heidmann <i>et al.</i> , 2011
Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of <i>Capsicum chinense</i> Jacq. in liquid medium	Avilés-Viñas <i>et al.</i> , 2013
Polyamines and WOX genes in the recalcitrance to plant conversion of somatic embryos of Habanero pepper (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	Valle-Gough <i>et al.</i> , 2015

La recalcitrancia en el género *Capsicum*, se manifiesta a través de: 1) La baja eficiencia de los sistemas de regeneración, 2) La baja reproducibilidad de los protocolos de regeneración, 3) El alto índice de embriones somáticos deformados, y 4) La baja tasa de germinación y/o conversión de los embriones somáticos en plantas (Steinitz, 2003).

Los primeros reportes de regeneración de chile habanero *in vitro* fueron realizados recientemente. Santana y colaboradores en el 2005, reportaron por primera vez la regeneración de plantas *in vitro* a partir de nudos de plantas asépticas cultivados en medio sólido. Posteriormente, este mismo grupo (Santana-Buzzy *et al.*, 2006) evaluando la elongación y el desarrollo de las de las plántulas de chile habanero, detectó la alta sensibilidad de la especie al etileno concentrado en recipientes de cultivo sin ventilación durante su cultivo *in vitro*. López-Puc *et al.* (2006) reportaron el primer sistema de regeneración de plántulas de chile habanero a partir de la embriogénesis somática directa utilizando como explantes segmentos de

hipocotilo de plántulas asépticas (Tabla 1.3). Zapata-Castillo *et al.* (2007) propusieron el primer sistema de regeneración vía embriogénesis somática indirecta, a partir de células en suspensión (Tabla 1.3).

Cuadro 1.3. Protocolos para la Embriogénesis Somática generados en el grupo de la Dra. Santana Buzzy. ESD: Embriogénesis Somática Directa; ESI: Embriogénesis Somática Indirecta.

Vía	Explante	Eficiencia	Referencia
a) ESD	Hipocotilo	175 ± 20 por explante	López-Puc <i>et al.</i> , 2006
b) ESI	Hipocotilo	NR	Zapata-Castillo <i>et al.</i> , 2007
c) ESD	Hipocotilo	1.77 x 10 ⁴ ESs/L	Avilés-Viñas <i>et al.</i> , 2012

En el 2012 Avilés-Viñas reportó un protocolo de embriogénesis somática para *Capsicum chinense* de alta eficiencia (Tabla 1.3) en el cual se han superado los dos primeros problemas que cita Steinitz (eficiencia y reproducibilidad), sin embargo, falta resolver el problema que representa el alto índice de embriones somáticos deformados y la baja tasa de germinación y/o conversión de los embriones.

1.6. EL ROL DE LAS AUXINAS EN EL DESARROLLO VEGETAL

Las plantas y los animales tienen diferentes estrategias al afrontar problemas para su supervivencia en entornos adversos y en constante cambio. Considerando que los animales tienen la capacidad de reaccionar luchando o huyendo, las plantas han desarrollado un amplio repertorio de estrategias para optimizar y moldear su estructura física y su metabolismo dependiendo de las exigencias medioambientales específicas (Gallavotti, 2013). Estas características tan notables del desarrollo vegetal se dan durante todo su ciclo de vida, esta capacidad de adaptar el crecimiento se debe a los meristemos, que son grupos de células madre vegetales capaces de llevar a cabo la organogénesis, tienen una notable capacidad de regeneración y determinan la dirección de crecimiento en respuesta

a señales externas (Davies, 2004 y Tanaka *et al.*, 2006), esto sugiere que los mecanismos de regulación en las plantas son muy complejos.

Existe un plan de desarrollo predeterminado, intrínsecamente relacionado al programa genético de todas las especies de plantas, pero el medio ambiente circundante juega un papel importante en el resultado del desarrollo final. Las fitohormonas, que son pequeñas moléculas que pueden ser producidas y transportadas a diferentes partes de la planta, son los principales determinantes de cómo crecen las plantas y por lo tanto representan la primera línea de respuesta a los cambios en las condiciones ambientales (Vert *et al.*, 2011). A pesar de que se han reconocido numerosas sustancias que funcionan como hormonas vegetales, la forma de la planta está controlada en gran parte por moléculas indólicas bastante simples conocidas como auxinas (Tanaka *et al.*, 2006). Las auxinas son hormonas vegetales sintetizadas localmente en tejidos jóvenes, principalmente en los ápices, hojas jóvenes y semillas en desarrollo de las plantas, sus efectos clásicos están relacionados con el gravitropismo y el fototropismo (Normanly *et al.*, 1991 y Ljung *et al.*, 2001).

Nos ha tomado más tiempo reconocer y comprender el papel que juegan las auxinas en el desarrollo de células u órganos en el embrión. Esto es debido a que el embrión de la planta se encuentra inaccesible y protegido en el interior de la semilla para muchos propósitos experimentales. También se debe a que hemos tenido, hasta hace poco, una comprensión muy limitada de los mecanismos moleculares de acción de las auxinas. A pesar de estas dificultades, los profundos efectos de las auxinas en los tejidos vegetales *in vitro* en cultivo han sugerido que éstas tienen el poder no sólo de regular el crecimiento, sino también para dictar el destino de una célula.

1.6.1. ACCIÓN DE LAS AUXINAS A NIVEL MOLECULAR

Las auxinas activan la transcripción mediante la destrucción de represores

transcripcionales como las proteínas AUX/IAA (Gray *et al.*, 2001 y Zenser *et al.*, 2001). Las proteínas AUX/IAA contienen potentes dominios de represión transcripcional, pero no se unen al ADN por sí solas (Figura 1.5).

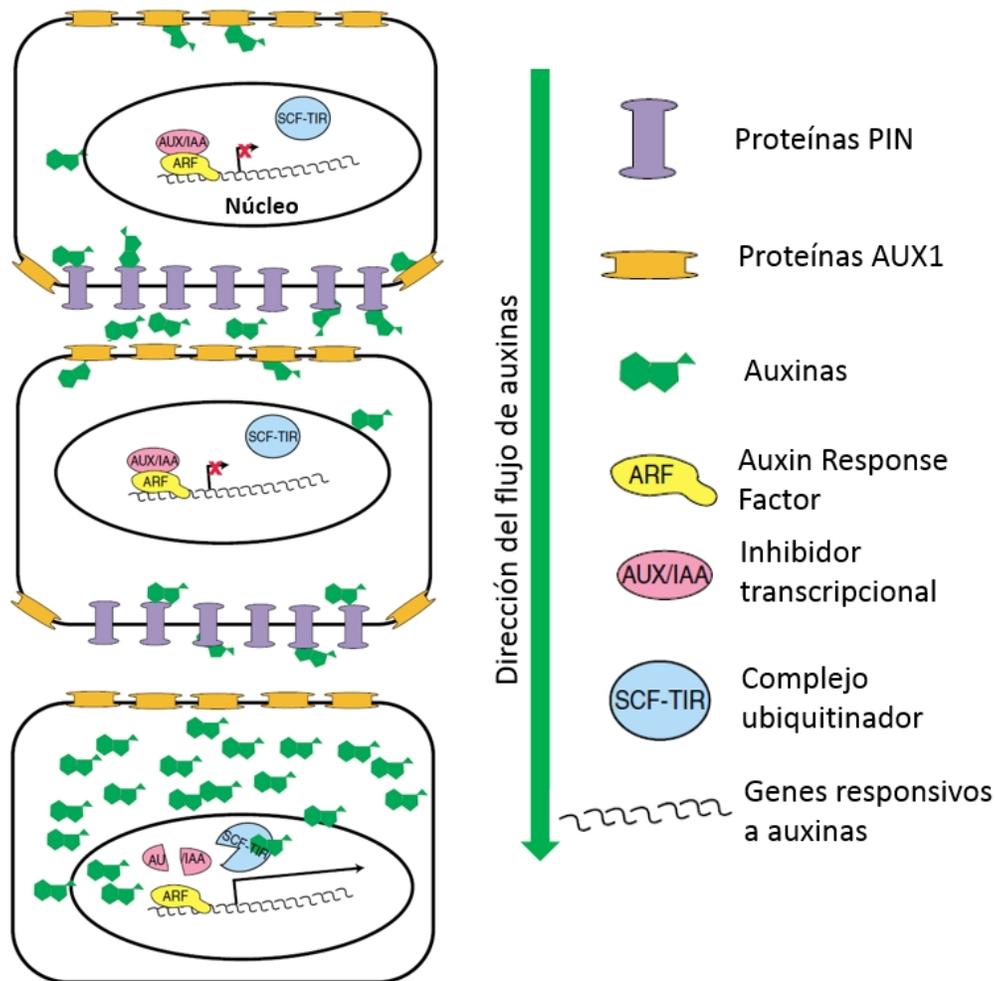


Figura 1.5. Mecanismo de acción de las auxinas a nivel molecular (Modificado de Jenik y Barton, 2005).

En lugar de eso, las proteínas AUX/IAA dimerizan con el Auxin Response Factor (ARF - activadores de la transcripción por medio de la unión al ADN) impidiendo la activación de la transcripción (Tiwari *et al.*, 2001 y Tiwari *et al.*, 2004). Las auxinas activan la transcripción cuando se unen a la TIR1 F-box, que es un componente

de la SCF^{TIR1} E3 ubiquitin-ligasa, que ubiquitina las proteínas AUX/IAA, marcándolas para ser degradadas por el proteosoma. Después de la degradación de AUX/IAA mediada por una auxina, la proteína ARF está libre para activar la transcripción de su promotor.

Posteriormente las auxinas son transportadas desde su lugar de síntesis hasta su sitio de acción por un mecanismo transcelular. El transporte direccional de auxinas está mediado por la acción combinada de transportadores de entrada y acarreadores de salida. La auxina que es expulsada de una célula es tomada por la siguiente célula en línea, que la expulsa a su extremo opuesto, y así sucesivamente.

1.6.2. EL TRANSPORTE DE AUXINAS

Desde la década de 1920, Cholodny y Went trataron de formular una hipótesis de forma independiente sobre cómo se transportan las auxinas desde el ápice hacia la zona de elongación. Se describieron dos vías principales para el transporte de auxinas: 1) un transporte rápido no direccional capaz de transportar estas moléculas a largas distancias a través del floema y 2) una vía más lenta y direccional en diversos tejidos para movilizar a largas o cortas distancias a través de un mecanismo intercelular, llamado transporte polar de auxinas (PAT por sus siglas en inglés). La evidencia de la existencia de transporte por el floema se estableció a través de experimentos con auxinas marcadas radiactivamente (Morris y Thomas, 1978). Este transporte tanto basipetal (del ápice hacia abajo) como acropetal (de la base hacia el ápice), procede relativamente rápido (5-20 cm/h) y parece que se correlaciona bien con el transporte de sustancias asimiladas y los conjugados inactivos de auxinas (Nowacki y Bandurski, 1980). Un análisis directo de auxinas reveló cantidades fisiológicamente considerables de ácido indol-3-acético (IAA por sus siglas en inglés) libre en el exudado de floema (Baker, 2000). Experimentos en guisante mostraron que la auxina marcada

transportada dentro del floema se detecta más tarde en el sistema de PAT, lo que indica que ambas vías de transporte pueden estar ligadas (Cambridge y Morris, 1996).

En contraste con el transporte del floema, el PAT es específico para las auxinas activas libres, se produce de célula a célula y tiene un carácter estrictamente unidireccional. La corriente principal del PAT se extiende desde el ápice basipetalmente con una velocidad de 5-20 mm/h hacia la base de la planta (Lomax *et al.*, 1985). Usando marcadores radioactivos de auxina, se detectó este tipo de transporte principalmente en el cambium y el xilema (Morris y Thomas, 1978). En las raíces el transporte de auxinas se da acropetalmente desde la punta de la raíz, donde parte de las auxinas se redirigen y se transportan a través de la epidermis basipetalmente de la raíz a la zona de elongación (Rashotte *et al.*, 2000). En contraste, el PAT en los brotes se produce en dirección lateral (Morris y Thomas, 1978). Algunos ensayos sobre el transporte de auxinas también revelaron que el PAT requiere energía, es saturable y sensible a los inhibidores de la síntesis de proteínas. Estos resultados sugieren la existencia de proteínas específicas de transporte de auxinas y condujo en medio de la década de 1970 a la formulación de un modelo coherente para el transporte de auxina, denominándola “hipótesis quimiosmótica” (Rubery y Sheldrake, 1974; Raven, 1975).

1.6.3. LA HIPÓTESIS QUIMIOSMÓTICA

En el medio relativamente ácido de la pared celular (pH alrededor de 5.5) alrededor del 15% del IAA se encuentra en su forma protonada (IAAH). Esta molécula apolar y lipofílica pasa fácilmente a través de la membrana plasmática por difusión. En el citoplasma que es más básico (pH alrededor de 7) se disocia el IAAH y por lo tanto el IAA⁻ anión resultante es 'atrapado' en la célula debido a la pobre permeabilidad de la membrana plasmática (MP) (Figura 1.6). Por lo tanto, se postuló la existencia de un transportador de flujo de salida específico y la

polaridad del flujo de auxinas se explica por su distribución asimétrica en las células. Además, se planteó la hipótesis de la existencia de transportadores de auxinas específicos en el flujo de entrada (Goldsmith, 1977).

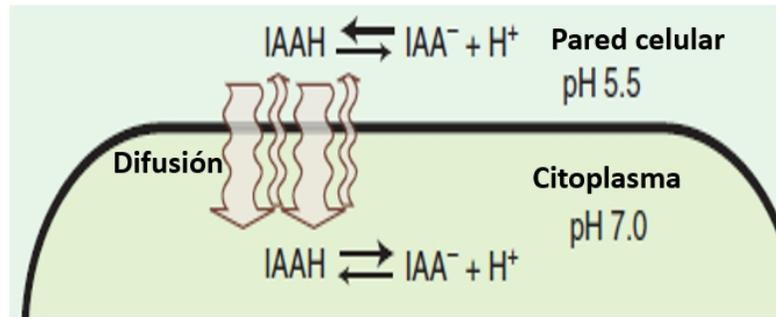


Figura 1.6. Movilización de IAA de acuerdo a la hipótesis quimiosmótica (Modificado de Zazimalova *et al.*, 2010).

1.7. TRANSPORTADORES DE AUXINAS Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS PIN

La teoría descrita anteriormente implicaba la necesidad de transportadores activos tanto de entrada como de salida para las moléculas de auxina (más precisamente aniones de auxina). Se determinó que las moléculas de auxina podían ser transportadas a las células por la actividad de la familia de proteínas permeasas AUX/LAX (Kerr y Bennett, 2007). El genoma de *Arabidopsis* codifica para una proteína AUX1 y tres tipo AUX1 (LAX1, LAX2 y LAX3), se sabe actualmente que estas cuatro proteínas comparten aproximadamente el 80% de su secuencia de aminoácidos (Parry *et al.*, 2001). En la figura 1.7 se muestra la organización de las proteínas implicadas en el transporte de auxinas donde las proteínas exportadoras PIN que aparecen en rojo representan las PINs "largas" (PIN 1, 2, 3, 4 y 7), mientras que las PINs marcadas en color rosa representan PINs "cortas" (Pin 5, 6 y 8). Las estructuras moradas representan el ER (retículo endoplásmico) y los endosomas, las flechas curvas continuas muestran el proceso cíclico de las proteínas y las flechas discontinuas simbolizan el proceso de transcitosis

(Zazímalová *et al.*, 2010).

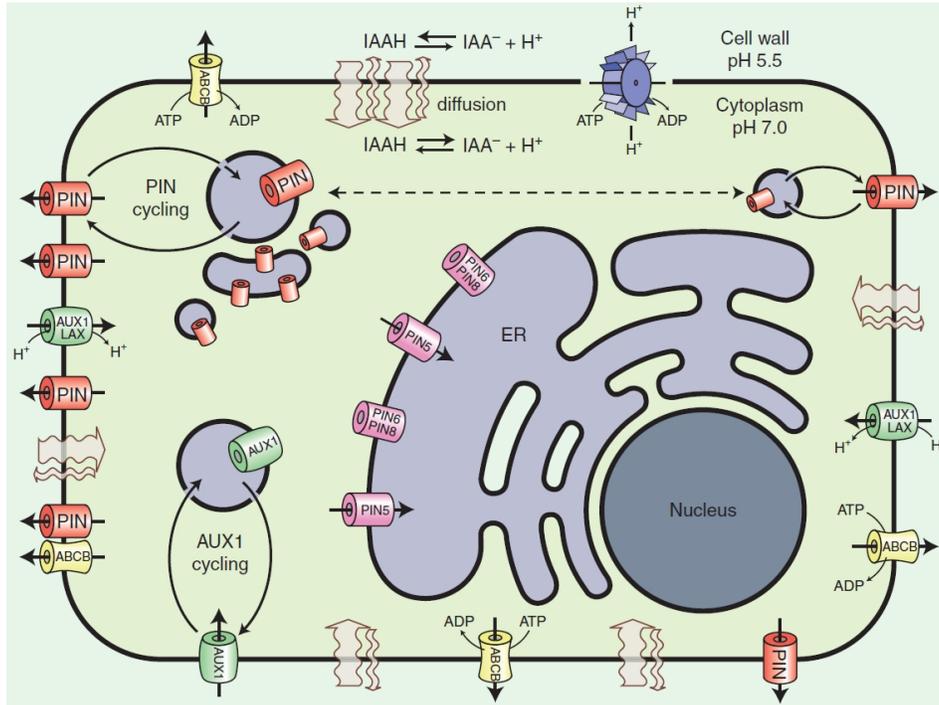


Figura 1.7. Transporte celular de auxinas (Zazimalova *et al.*, 2010).

Por otra parte, los exportadores de auxinas apenas se caracterizaron en la última década. Sin embargo, no hay sólo uno o unos pocos transportadores, sino que existen al menos dos familias de proteínas, cuyos miembros poseen actividad exportadora de auxinas. Se trata de la familia de proteínas PIN que son específicas en las plantas y de la superfamilia de transportadores ATP-binding cassette (ABC), principalmente del tipo B (ABCB/multidrug resistance [MDR] / phosphoglycoprotein [PGP]). La superfamilia ABC es una de las familias más grandes de transportadores y están asociadas con el movimiento de una gran variedad de moléculas pequeñas, nutrientes, etc. (Verrier *et al.*, 2008).

Los miembros de la familia PIN (PIN-FORMED) se asociaron con el transporte polar de auxinas a finales de 1990 (Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998), aunque la primera referencia para sus respectivos mutantes (*pin-formed1*, *pin1*) aparecieron en la década de 1950 (Goto *et al.*, 1987) y estos se caracterizaron en

la década de 1990 (Okada *et al.*, 1991). De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, las PIN son proteínas integrales de membrana con una topología similar a algunas proteínas transportadoras. En *Arabidopsis*, la familia PIN se compone de ocho miembros y se divide en dos subclases básicas, que difieren en la longitud de un bucle hidrófilo en medio de su cadena de polipéptidos. Las PINs "largas" (PIN1, 4 y 7) (Tanaka *et al.*, 2006; Vieten *et al.*, 2007; Zazimalová *et al.*, 2007) muestran principalmente una localización polar en la membrana plasmática (MP) y la función directa del transporte de auxinas es fuertemente apoyado por PIN1, 2, 4, y 7 (Petrásek *et al.*, 2006; Yang y Murphy, 2009). La localización polar de estas PIN largas determinan la dirección del flujo de auxina (Wisniewska *et al.*, 2006) y se han caracterizado sus funciones en muchos procesos dependientes de auxinas en el desarrollo vegetal (Luschnig *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002a, 2002b; Blilou *et al.*, 2005; Scarpella *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006; Sauer *et al.*, 2006). En estas PINs aunque su localización celular en los dominios de la MP es principalmente polar, no residen allí estáticamente. Por el contrario, se mueven cíclicamente entre la MP y los compartimientos endosomales (Geldner *et al.*, 2001; Dhonukshe *et al.*, 2007), y pueden ser relocalizados rápidamente a diferentes partes de la célula a través de un mecanismo de transcitosis (Kleine-Vehn *et al.*, 2008) en respuesta a señales ambientales. La localización polar de las proteínas PIN largas subyace en el transporte de auxina requerido para el desarrollo del embrión, la organogénesis, los tropismos y otros procesos de desarrollo (Friml *et al.*, 2002b, 2003; Benkova *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Blakeslee *et al.*, 2005).

En contraste con las PIN largas, hay tres miembros de la familia *AtPIN* que tienen su bucle hidrofílico central de forma parcial (PIN6) o significativamente (PIN5, 8) reducido. Mravec *et al.* (2009) demostró que estas PINs "cortas" no se localizan en la MP, en el caso de PIN5, es una proteína endomembranal que se ubica en el retículo endoplásmico (RE). Dado que PIN5 es un transportador de auxinas funcionales, su localización en el RE sugiere un papel en la distribución

intracelular y en la regulación de la homeostasis celular de auxinas, por lo tanto, el control de la disponibilidad de auxinas activas para diversas acciones subcelulares y celulares.

1.7.1. FUNCIONES PRINCIPALES DE LAS PROTEÍNAS PIN

El transporte polar direccional de auxinas requerido para la embriogénesis y la organogénesis es controlado por un subconjunto de proteínas PIN que son controladas en la membrana plasmática (MP) y que presentan localizaciones y polaridad distintas (Benková *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Dhonukshe *et al.*, 2008). La función de PIN1 y PIN7 es mantener los flujos polares basipetales en el embrión en desarrollo y a lo largo del eje embrionario apical-basal durante todo el desarrollo (Friml *et al.*, 2003; Jönsson *et al.*, 2006; Kuhlemeier 2007), PIN1 y PIN2 median el flujo polar de auxinas durante la organogénesis (Benková *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003), PIN2 lo hace hacia arriba desde el ápice de la raíz (Chen *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2004). Durante el crecimiento de las plantas se requiere de la reorientación dinámica de los flujos de auxinas. Las proteínas PIN parecen ser los principales vehículos para la redirección de estos flujos (Friml *et al.*, 2002b; Blakeslee *et al.* 2004; Robert y Friml, 2009), pero no se ha demostrado cómo se inicia esta redirección. La velocidad de la respuesta inicial de redirección de auxinas en el gravitropismo de las raíces sugiere que los cambios de pH y los potenciales de membrana pueden preceder a la relocalización de las proteínas PIN (Peer y Murphy, 2007). El tráfico celular controlado por las proteínas PIN es comúnmente generalizada como "dinámico" en los tejidos donde la localización polar de estas proteínas es bastante estable, por ejemplo, las PIN1 en el tejido vascular maduro (Friml *et al.*, 2003), PIN7 en el tejido de tallos adultos (Blakeslee *et al.*, 2007), PIN3 en tejidos fotosensibles (Titapiwatanakun y Murphy, 2009) y PIN2 en los tejidos epidérmicos de la raíz (Müller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2004). Por otro lado, la

señal de PIN3 reorienta lateralmente el flujo de auxinas en el ápice de la raíz en respuesta al gravitropismo (Friml *et al.*, 2002b), la relocalización dinámica de PIN1 se observa en la foto-respuesta de los meristemos apicales de brotes (Blakeslee *et al.*, 2004). Aunque las proteínas AUX1/LAX se movilizan hacia y desde la MP por procesos dinámicos similares no son idénticos a la movilización de las PINs (Friml *et al.*, 2004; Dharmasiri *et al.*, 2006; Kleine-Vehn *et al.*, 2006), se ha encontrado evidencia para la relocalización polarizada de estas proteínas.

1.7.2. ASPECTOS EVOLUTIVOS DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Los análisis filogenéticos de las proteínas transportadoras PIN y ABCB indican que las ABCB constituyen un sistema de transporte más ancestral que el mediado por las proteínas PIN, pues la estructura de las ABCB está altamente conservada a lo largo de los filos (Peer y Murphy, 2007), mientras que las proteínas PIN parecen haber surgido con las plantas vasculares (Zazimalová *et al.*, 2007). Además, los flavonoides de plantas endógenas que surgieron en las plantas terrestres primigenias interferían con el mecanismo fundamental de los transportadores ABCB, mientras que los de las proteínas de PIN sólo están afectados indirectamente por estos compuestos (Rausher, 2006; Geisler *et al.*, 2005; Blakeslee *et al.*, 2007; Peer y Murphy, 2007; Santelia *et al.*, 2008; Sukumar *et al.*, 2009). Esto sugiere que la presencia de los flavonoides de las plantas fue un factor selectivo en la evolución de las proteínas exportadoras del tipo PIN1/2 y proporciona una razón evolutiva para explicar la función transportadora que se superponía con la función de las proteínas ABCB, pues el transporte de auxinas debía seguir funcionando a niveles basales en presencia de los flavonoides producidos en respuesta a los organismos herbívoros y al estrés oxidativo. Los factores que contribuyeron a la aparición de las proteínas AUX/LAX de la antigua familia de proteínas del tipo permeasa aún no están claros.

Sin embargo, la mayor fuerza exportadora en el sistema de transporte de auxinas

la proporciona las proteínas PIN, pues al parecer posee un desarrollo más sofisticado en las plantas vasculares. La localización generalmente apolar de los transportadores ABCB y su alto grado de estabilidad en la membrana plasmática (Blakeslee *et al.*, 2007; Titapiwatanakun *et al.*, 2009; Titapiwatanakun y Murphy, 2009) no es compatible con la complejidad del desarrollo requerido en las plantas terrestres (Zazimalová *et al.*, 2007) y en la evolución de los procesos morfogénicos como el desarrollo del tejido apical, del tejido vascular, la organogénesis y el transporte polar de auxinas. Los únicos genes tipo PIN con función desconocida se han encontrado en bacterias y levaduras (Paponov *et al.*, 2005), y tres genes tipo PIN se identificaron en el musgo *Physcomitrella patens* (Decker *et al.*, 2006; Rensing *et al.*, 2008). Por el contrario, la angiosperma *Arabidopsis* tiene ocho genes PIN con un alto grado de homología relativamente (32-45% de identidad mutua) (Paponov *et al.*, 2005), aunque se dividen en dos subclases distintas (PIN "largas" y "cortas" PIN), que difieren en la longitud de un bucle citosólico central (Zazimalová *et al.*, 2007 y Mravec *et al.*, 2009). Algunos miembros de la subclase de PINs cortas (PIN 5 y 8) son similares en longitud a las proteínas bacterianas y de levaduras tipo PIN, pudiendo representarlos ancestros de las proteínas PIN en plantas.

Las proteínas PIN 5, 6 y 8, y PpPINA de *P. patens*, y la levadura AEL1 se localizan en el RE (Matsuyama *et al.*, 2006 y Mravec *et al.*, 2009), mientras que las otras PIN de *A. thaliana* se localizan en la membrana plasmática, esto nos lleva a la siguiente hipótesis: la diversificación de las proteínas PIN ocurrió durante el proceso evolutivo de radiación adaptativa de las plantas terrestres. La localización mayormente polar de proteínas PIN también concuerda con la polaridad de las plantas y la organogénesis (Benjamins y Scheres, 2008; Robert y Friml, 2009). La reciente evolución de las proteínas PIN coincide con la evolución de la proteína PINOID, una quinasa que regula la localización polar de PIN, sin embargo, no se han encontrado genes de PINOID o PIN en los genomas de algas verdes de *Chlamydomonas* o *Ostreococcus*, aunque el transporte de auxinas que parece

regular el crecimiento direccional y los patrones de color marrón en las algas, se cree que está mediada por los transportadores ABCB (Cooke *et al.*, 2002; Galvan-Ampudia y Offringa, 2007). La coevolución de PINOID y PINs en plantas terrestres sugiere que el transporte polar de auxinas dependiente de los PIN regulados por la PINOID-quinasa, podría desempeñar un papel importante en esta transición (Galvan-Ampudia y Offringa, 2007).

1.7.3. EL PAPEL DE LAS PROTEÍNAS PIN EN EL TRANSPORTE DE AUXINAS DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EN *Arabidopsis thaliana*

Hay cuatro genes de la familia PIN (facilitadores en el flujo de salida de auxinas) que se expresan en diferentes lugares y en diferentes momentos durante el desarrollo embrionario: *PIN1*, *PIN3*, *PIN4* y *PIN7* (Friml *et al.*, 2002a; Friml *et al.*, 2003). El control temporal y espacial de la secuencia de expresión de las proteínas PIN parece ser el responsable en la dinámica y el cambio del patrón de acumulación de auxinas en el embrión.

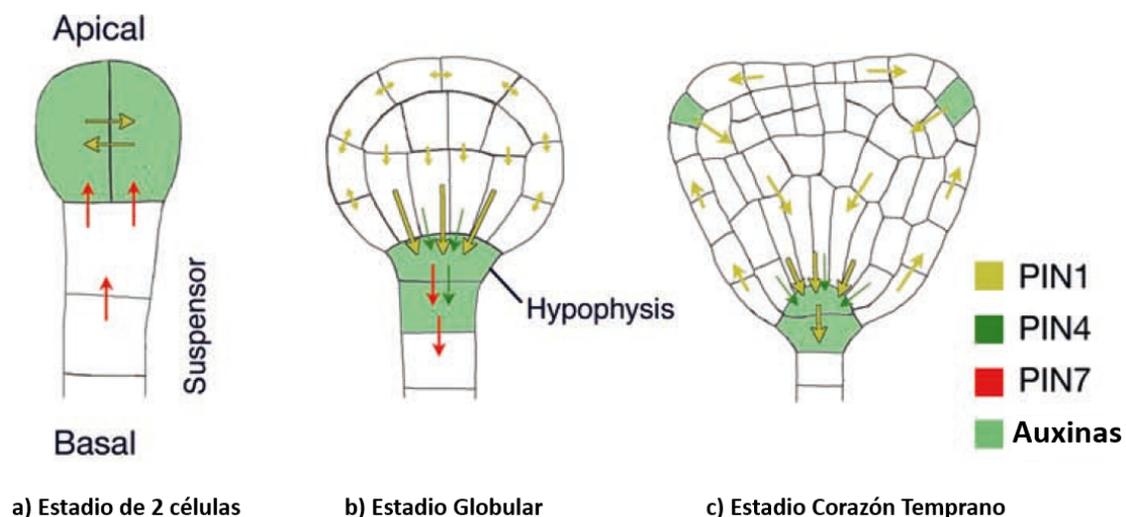


Figura 1.8. Transporte de auxinas mediado por proteínas PIN durante el desarrollo embrionario de *A. thaliana* (Tanaka *et al.*, 2003).

En el proembrión, las auxinas fluyen hacia arriba, lejos del suspensor extraembrionario (Figura 1.8a). En la etapa de transición (Triangular stage), la auxina invierte su curso y fluye hacia la raíz. Los experimentos en los que estos flujos son interrumpidos muestran que la auxina puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del eje apical/basal.

PIN7 y *PIN1* (Figura 1.8a) son los primeros genes *PIN* expresados en el embrión (Friml *et al.*, 2003). La proteína PIN7 se encuentra en la membrana apical de la célula basal en el embrión de dos células y en la membrana apical de las células suspensoras hasta la etapa de 32 células (Figura 1.8b). Este patrón de localización sugiere un papel para PIN7 en el transporte de auxinas desde las células basales a la célula apical.

Por el contrario, la proteína PIN1 se localiza apolarmente en todo el embrión, desde la fase de una célula hasta la de 32 células (Figura 1.8a, b). Cuando aparece polarmente (Figura 1.8c), se localiza en los extremos basales de las células provasculares (Steinmann *et al.*, 1999; Friml *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, la proteína PIN7 cambia a los extremos basales de las células suspensoras, la proteína PIN4 comienza a acumularse en las células hipofisarias y en los haces vasculares.

Apoyando el modelo anterior, el gen reportero DR5 (promotor sintético responsivo a auxinas, en este caso la variante fluorescente *DR5rev::GFP*) se expresa en las zonas donde hay concentración de auxinas el embrión de *A. thaliana* como se muestra en la Figura 1.9 (Friml *et al.*, 2003)

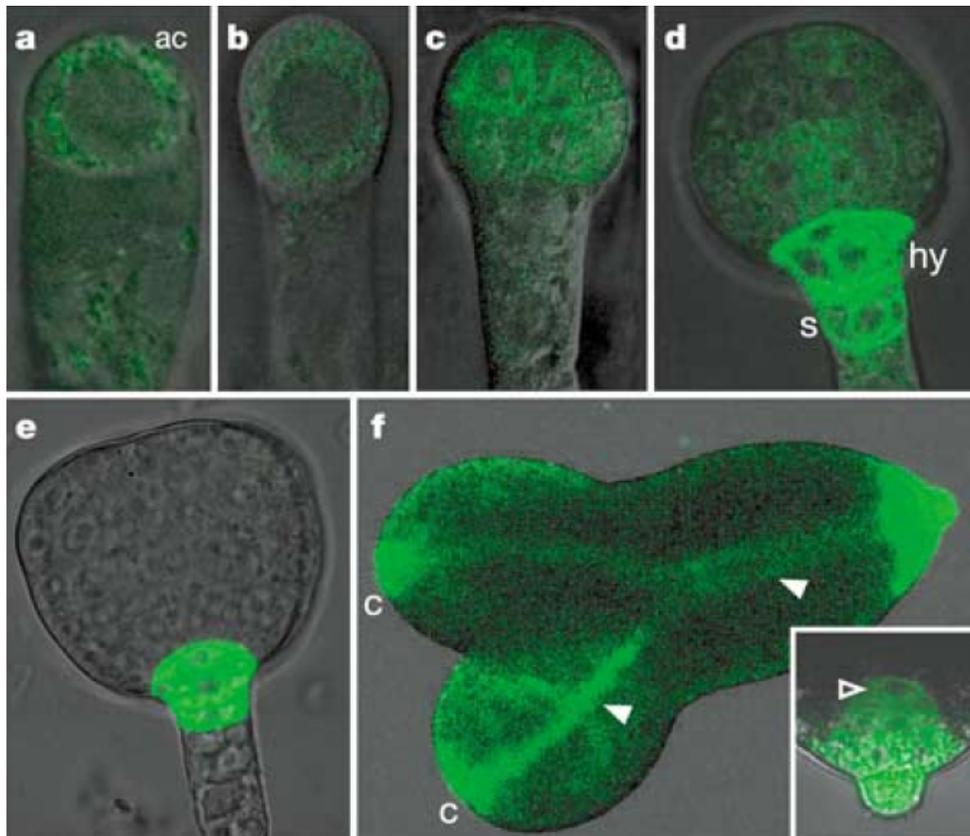


Figura 1.9. Concentración de auxinas en embriones de *A. thaliana*. (a) Proembrión después de la división cigótica, ac: célula apical; (b) embrión en estadio de 1 célula; (c) 8 células; (d) en estadio globular, s: suspensor, hy: hipófisis; (e) triangular; (f) cotiledonar, c: cotiledones. (Friml *et al.*, 2003).

Mutantes deficientes en *PIN1*, *PIN4* o *PIN7* mostraron un patrón anormal durante la división celular, sobre todo en las células donde se esperaba el transporte de auxinas por su respectiva proteína PIN:

- La célula apical y la hipófisis en mutantes *pin7* (Friml *et al.*, 2003.): En la Figura 10a se muestran embriones tipo silvestre, mientras que en las Figuras 10b-e se muestran mutantes *pin7*.

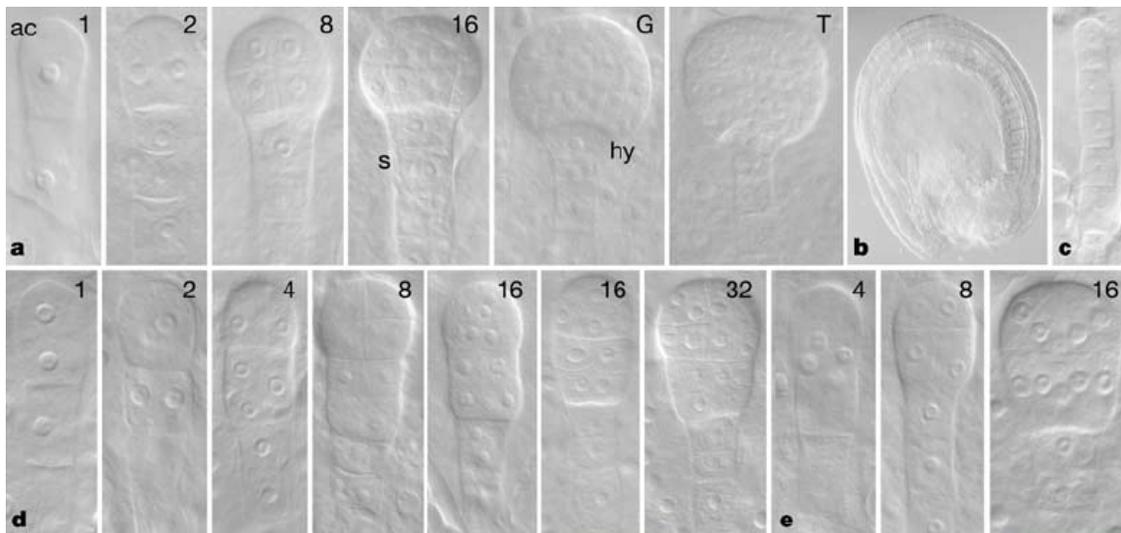


Figura 1.10. Embriones mutantes *pin7* de *A. thaliana*. (a) Embriones tipo silvestre, ac: célula apical, s: suspensor, hy: hipófisis; (b,c) Embriones mutantes *pin7* filamentosos sin un patrón celular apical establecido; (d) límite apical-basal no definido; (e) defectos leves en la parte apical. Los números en la parte superior derecha representan el número de células del embrión (Friml *et al.*, 2003).

- La hipófisis en mutantes *pin1* (Friml *et al.*, 2003);

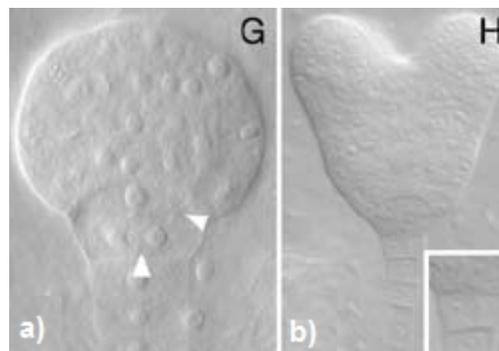


Figura 1.11. Embriones mutantes *pin1* de *A. thaliana*. (a) Con defectos en la hipófisis en estadio globular, G: globular y (b) acorazonado, H: heart (Friml *et al.*, 2003).

- Las columelas iniciales y la hipófisis en mutantes *pin4* (Figura 1.12) (Friml *et al.*, 2002a).

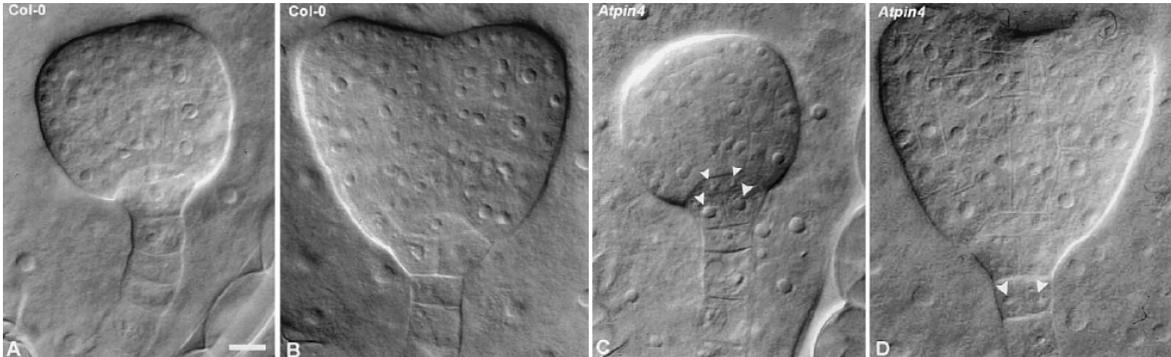


Figura 1.12. Embriones de *A. thaliana*. Col-0= Embriones silvestres (a) globular, (b) acorazonado. *Atpin4*: Embriones mutantes *pin4*: (c) globular, (d) acorazonado. (barra= 10 μ M) (Friml *et al.*, 2002a).

Los defectos en mutantes *pin* individuales son bastante sutiles y los embriones al final se recuperan para convertirse en embriones normales.

Sólo cuando las mutaciones *pin* se combinan en dobles, triples y cuádruples al mismo tiempo, los defectos son más graves (Figura 1.13). Las mutantes múltiples más afectadas se desarrollan como embriones globulares sin ninguna evidencia clara de polaridad apical-basal (Figura 1.13a-d).

Debido a que las diferentes proteínas *PIN* se expresan en diferentes tiempos y en diferentes lugares, la sustitución de un miembro de la familia *PIN* por otro no es simple.

En efecto, en las mutantes *pin1* y *pin7* no hay acumulación de auxinas en las células durante la etapa globular (Friml *et al.*, 2003). Sin embargo, el embrión parece ser capaz de volver a establecer el patrón de desarrollo correcto, tal vez por el restablecimiento del gradiente de auxinas después de la etapa globular.

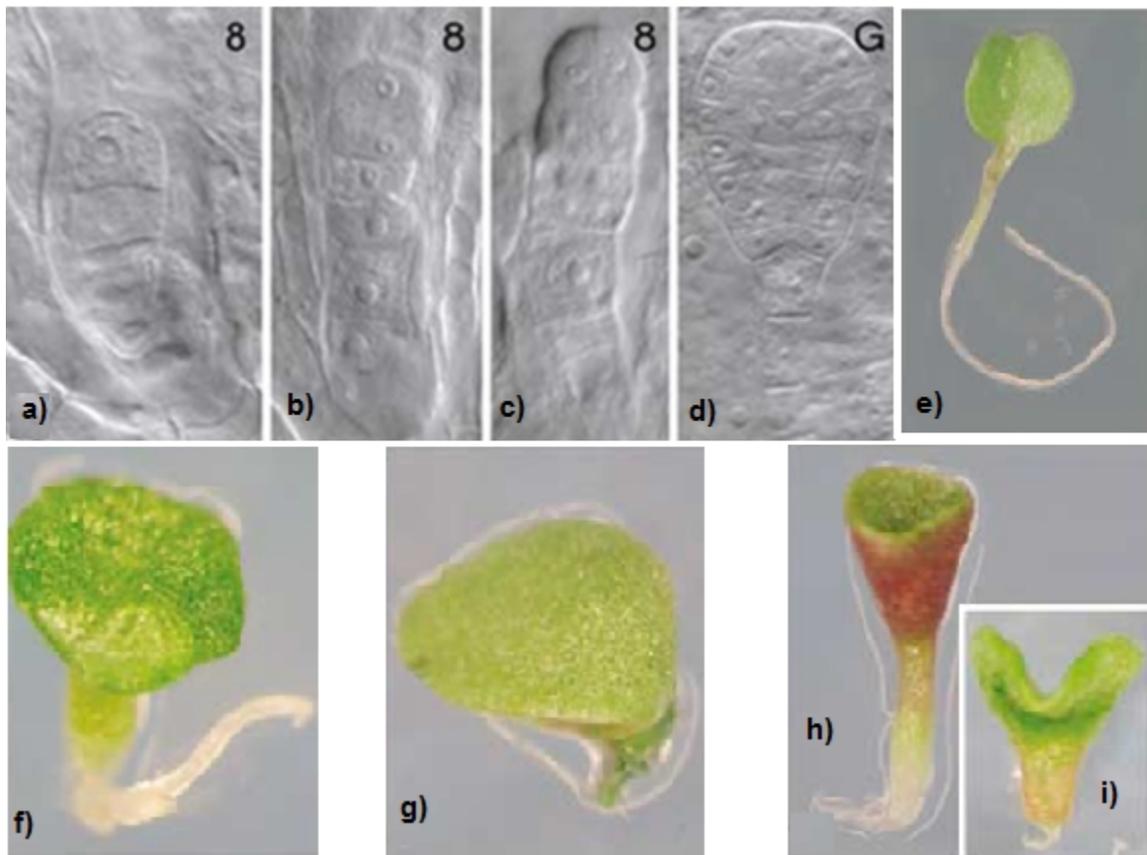


Figura 1.13. Embriones mutantes *pin1*, *pin3*, *pin4* y *pin7* con el patrón apical-basal completamente comprometido en estadio de ocho células (a-c) y globular (d), los números en la parte superior derecha representan el número de células del embrión, G: globular. (e) Mutante doble *pin4 pin7* con defectos en cotiledones. (g) Mutante triple *pin1 pin3 pin4* con defectos en el ápice caulinar y con raíz. (f-i) Mutantes *pin1 pin3 pin4 pin7*, con las deformidades más severas (h) y las más leves (i) (Friml *et al.*, 2003).

HIPÓTESIS

Las proteínas PIN intervienen de manera fundamental en el transporte y el cambio del patrón de acumulación de auxinas durante el desarrollo embrionario en las plantas, por lo que la expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* está relacionada con las deformidades en embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7*, y su relación con las deformidades en el ápice caulinar de embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislamiento de secuencias homólogas de *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en el GenBank.
- Diseñar cebadores específicos de *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* para *Capsicum chinense*.
- Determinar los niveles de expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en embriones somáticos y cigóticos de *Capsicum chinense*.

JUSTIFICACIÓN

Capsicum chinense es una especie recalcitrante a la conversión de embriones somáticos en plantas, presentando deformidades en el ápice caulinar en los estadios tardíos de este proceso. La distribución de auxinas está involucrada en el desarrollo de los embriones, por lo que en este trabajo se analizará la expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* debido a que ésta influye en el transporte polar de auxinas y en la definición del eje apical/basal en embriones.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

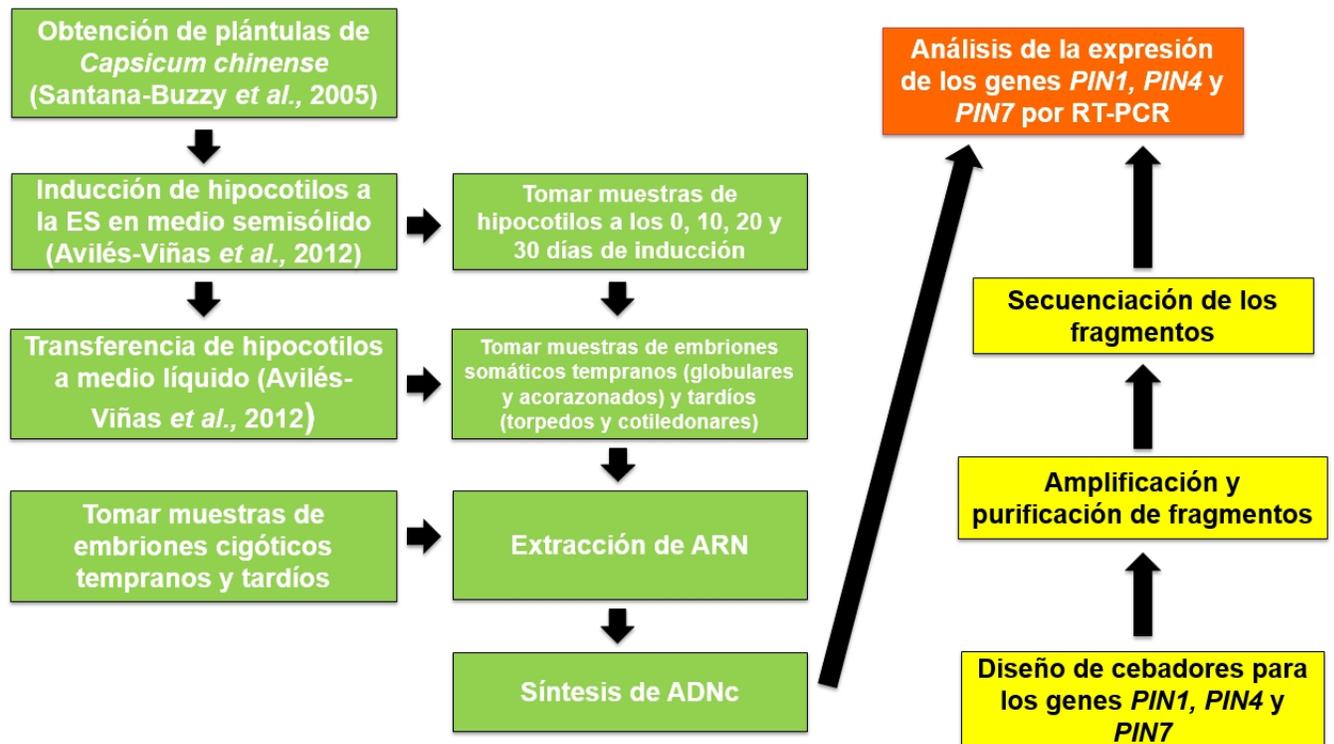


Figura 1.14. Estrategia experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews J. (1984) Peppers - The Domesticated Capsicums. University of Texas Press, Austin, Texas.
- Andrews J. (1999) The Pepper Trail. History and Recipes from Around the World. University of North Texas Press, Denton, Texas.
- Avilés-Viñas S., Lecona-Guzmán C., Canto-Flick A., López-Erosa S., Santana-Buzzy, N. (2013) Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. Plant Biotechnol Reports **7**: 277-286.
- Baker D.A. (2000) Long-distance vascular transport of endogenous hormones in plants and their role in source: sink regulation. Israel J Plant Sci **48**: 199–203.
- Barampuram S., Zhang Z.J. (2011) Recent advances in plant transformation. En: Birchler JA. Plant Chromosome Engineering, pp. 1–35.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jürgens G., Friml J. (2003) Local, efflux dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. Cell **115**: 591-602.
- Benjamins R., Scheres B. (2008) Auxin: The looping star in plant development. Annu Rev Plant Biol **59**: 443-465.
- Benning C. (1986) Evidence supporting a model of voltage dependent uptake of auxin into cucurbita-pepo vesicles. Planta **169**: 228-237.
- Binzel M.L., Sankhla N., Joshi S., Sankhla D. (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annum* L.). Plant Cell Rep **15**: 536-540.

-
- Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Lee O.R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S.N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J. (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 131-147.
- Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Peer W.A., Makam S.N., Murphy A.S. (2004) Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* **134**: 28-31.
- Blakeslee J.J., Peer W.A., Murphy A.S. (2005) Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 494-500.
- Bliou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44.
- Cambridge A.P., Morris D.A. (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **199**: 583-588.
- Chen R., Hilson P., Sedbrook J., Rosen E., Caspar T., Masson P.H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 15112-15117.
- Cooke T.J., Poli D., Sztein A.E., Cohen J.D. (2002) Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Mol Biol* **49**: 319-338.
- Davies P.J. (1995) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies P.J. (Ed). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. pp. 1–11.
- Decker E.L., Frank W., Sarnighausen E., Reski R. (2006) Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol* **8**: 397-406.

Dharmasiri S., Swarup R., Mockaitis K., Dharmasiri N., Singh S.K., Kowalchuk M., Marchant A., Mills S., Sandberg G., Bennett M.J. (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science* **312**: 1218-1220.

Dhonukshe P., Aniento F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.D., Friml J. (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **17**: 520-527.

Dhonukshe P., Tanaka H., Goh T., Ebine K., Mähönen A.P., Prasad K., Blilou I., Geldner N., Xu J., Uemura T. (2008) Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* **456**: 962-966.

Endress R. (1994) *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 353.

Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jürgens G. (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 661-673.

Friml J., Wisniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809.

Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147–153.

Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A., Tietz O., Benjamins R., Ouwerkerk P.B., Ljung K., Sandberg G. (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**: 862–865.

Gallavotti A. (2013) The role of auxin in shaping shoot architecture. *Journal of*

- Experimental Botany, **64**: 2593-2608.
- Galvan-Ampudia C.S., Offringa R. (2007) Plant evolution: AGC kinases tell the auxin tale. Trends Plant Sci **12**: 541-547.
- Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. Science **282**: 2226-2230.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. (1968) Nutrients requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res **50**: 151-158.
- Gamborg O.L., Shyluk J.P. (1981) Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. In: Thorpe TA. (Ed). Plant tissue culture. Academic press, New York. pp. 21-44.
- Geisler M., Blakeslee J.J., Bouchard R., Lee O.R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bailly A., Richards E.L. (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. Plant J **44**: 179-194.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y.D., Jürgens G., Palme K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. Nature **413**: 425-428.
- Goldsmith M.H.M. (1977) The polar transport of auxin. Annu Rev Plant Physiol, **28**: 439-478.
- González-Estrada T., Gutiérrez-Pacheco L.C., Contreras-Martín F. (2006) El chile habanero de Yucatán. Ciencia y Desarrollo, Mérida. pp 9-15.
- Goto N., Starke M., Kranz A.R. (1987) Effect of gibberellins on flower development of the pin-formed mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis* Information Service **23**: 66-71.

- Gray D.J., Purohit A. (1991) Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *CRC Crit Rev Plant Sci* **10**: 33-61.
- Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF TIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271-276.
- Grunewald W., Friml J. (2010) The march of the PINs - developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *The EMBO Journal* **29**: 2700-2714
- Harini I., Sita L. (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*C. annuum* L.). *Plant Sci* **89**: 107-112.
- Heidmann I., de Lange B., Lambalk J., Angenent G.C., Boutilier K. (2011) Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Rep* **30**: 1107-1115.
- ITIS (2015) Sistema Integrado de Información Taxonómica. *Capsicum chinese* Jacq. Taxonomic Serial No. 30494. Disponible en: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=30494 Actualización, Jueves, 08-Mayo-2015.
- Jenik P., Barton M. (2000) Surge and destroy: the role of auxin in plant embryogenesis. *The Company of Biologists* **132**: 3577-3585.
- Jo J., Choi E., Choi D., Lee K. (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*C. annuum* L.). *J Plant Biol* **39**: 127-135.
- Kerr I.D., Bennett M.J. (2007) New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochem J* **401**: 613-622.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Sauer M., Brewer P., Wisniewska J., Paciorek T., Benková E., Friml J. (2008) ARF GEF-dependent transcytosis and polar

-
- delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **18**: 526-531.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Swarup R., Bennett M., Friml J. (2006) Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell* **18**: 3171-3181.
- Kothari S.L., Kachhwaha A.J.S., Ochoa-Alejo N. (2010) Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnol Adv* **28**: 35-48.
- Krecek P., Skupa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., Zazimalová E. (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* **10**: 249.
- Kyte L. (1987) *Plants from test tubes. An introduction to micropropagation*. Timber Press Portland. pp.160.
- Leifert C., Murphy K.P., Lumdsen P.J. (1995) Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Rev Plant Sci* **14**: 83-109.
- Linsmaier E.M., Skoog F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 18:100-127.
- Ljung K., Ostin A., Lioussanne L., Sandberg G. (2001) Developmental regulation of indole-3-acetic acid turn over in Scots pine seedlings. *Plant Physiol* **125**: 464-475.
- Lomax, TL, Mehlhorn RJ and Briggs WR. (1985) Active auxin uptake by zucchini membrane vesicles: quantitation using ESR volume and Δ pH determinations. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6541-6545.
- Long-Solis, J. (1986) *Capsicum* y cultura: La Historia del Chilli. Fondo de Cultural Economica, S. A. de C. V. Av. de la Universidad 975, 03100 Mexico, DF.
- López-Puc G., Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P., Montalvo-

- Peniche M., Barahona-Pérez F., Santana-Buzzy N. (2006) Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience **41**: 1-7
- Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P., Fink G.R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. Genes Dev **12**: 2175-2187
- Maggi C.A. (1992) Therapeutic potential of capsaicinlike molecules—studies in animals and humans. Life Science **51**: 1777-1781
- Matsuyama A., Arai R., Yashiroda Y., Shirai A., Kamata A., Sekido S., Kobayashi Y., Hashimoto A., Hamamoto M., Hiraoka Y. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Nat Biotechnol **24**: 841-847
- Morris D.A., Thomas C.P., (1978) A micro autoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.). J Exp Bot **29**: 147-157
- Mravec J., Skupa P., Bailly A., Hoyerova K., Krecek P., Bielach A, Petrásek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y.D. (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin mediated by the ER-localized PIN5 transporter. Nature **459**: 1136-1140
- Müller A., Guan C., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. EMBO J **17**: 6903-6911
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol Plant **15**: 473-479
- Murray S.C., Eckhoff P., Wood L., Paterson A.H. (2013) A proposal to use gamete

-
- cycling in vitro to improve crops and livestock. *Nat Biotechnol* **31**: 877-880
- Normanly J., Cohen J.D., Fink G.R. (1991) *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10355-10359
- Nowacki J., Bandurski R.S. (1980) Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed auxin precursors of *Zea mays* L. *Plant Physiol* **65**: 422-427
- Ochoa-Alejo N., Ramírez-Malagón R. (2001) In vitro chili pepper Biotechnology. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* **37**: 701-729
- Okada K., Ueda J., Komaki M.K., Bell C.J., Shimura Y. (1991) Requirement of the auxin polar transport system in the early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell* **3**: 677-684
- Paponov I.A., Teale W.D., Trebar M., Blilou I., Palme K. (2005) The PIN auxin efflux facilitators: Evolutionary and functional perspectives. *Trends Plant Sci* **10**: 170-177
- Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C., Bennett M.J. (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J* **25**: 399-406
- Peer W.A., Murphy A.S. (2007) Flavonoids and auxin transport: Modulators or regulators? *Trends Plant Sci* **12**: 556-563
- Pérez-Molphe-Balch E., Ramírez-Malagón R., Núñez-Palenius H., Ochoa-Alejo N. (1999) *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. pp. 179
- Petrásek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M., Seifertova D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanova M. (2006) PIN proteins perform a ratelimiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**: 914-918

- Rashotte A.M., Brady S., Reed R., Ante S., Muday G.K. (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **122**: 481-490
- Rausher M. (2006) The evolution of flavonoids and their genes. In *The Science of Flavonoids*. Springer, Heidelberg. pp. 175-212
- Raven J.A. (1975) Transport of indolacetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients and its significance for polar IAA transport. *New Phytol* **74**: 163-172
- Reinhardt D., Pesce E.R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennett M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* **426**: 255-260
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**: 64–69
- Roca W.M., Mroginski L.A. (1991) *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). L. A. Cali, Colombia. pp. 970
- Robert S., Friml J. (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 325-332
- Rubery P.H., Sheldrake A.R. (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta* **118**: 101-121
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L.G., Montalvo-Peniche M.C., López-Puc G., Barahona-Pérez F. (2006) Improvement of in vitro culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* **41**: 405-

- Santana-Buzzy N., Lopez-Puc G., Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Balam-Uc E., Aviles-Viñas S., Solís-Marroquín D., Lecona-Guzman C., Bello-Bello J., Gomez-Uc E., Mijangos-Cortes JO (2009) Ontogenesis of the somatic embryogenesis of Habaneropepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience **44**:113-118
- Santelia D., Henrichs S., Vincenzetti V., Sauer M., Bigler L., Klein M., Bailly A., Lee Y., Friml J., Geisler M., Martinoia E. (2008) Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxinfluxes during root gravitropic responses. J Biol Chem **283**: 31218-31226
- Sauer M., Balla J., Luschnig C., Wisniewska J., Reinohl V., Friml J., Benkova E. (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. Genes Dev **20**: 2902-2911
- Scarpella E., Marcos D., Friml J., Berleth T. (2006) Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. Genes Dev **20**: 1015-1027
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesca). Anuario estadístico de la producción agrícola. Gobierno Federal. México. Disponible en <http://www.siap.gob.mx>. Actualización, Lunes, 12-Junio-2015.
- Steinitz B., Kusek M., Tabib Y., Paran I., 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
- Stepan-Sarkissian G. (1990) Selection of Media for Tissue and Cell Culture. In: Pollard J.W., Walker J.M. (Eds) Plant cell and tissue culture. Methods in Molecular Biology 6. Humana Press. New Jersey. pp. 1-12
- Sukumar P., Edwards K.S., Rahman A., DeLong A., Muday G. (2009). PINOID

kinase regulates root gravitropism through modulation of PIN2-dependent basipetal auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **150**: 722-735

Szweykowscy A.J. (1993) *Diccionario de Botánica*. Wiedza Powszechna, Varsovia.

En: Jankiewicz Leszek S. 2003. *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resitencia en plantas Vol.1 (Propiedades y acción)* UACH. Edición Mundi-Prensa. México, D.F. pp. 16, 99 y 242-247

Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2738-2754

Tisserat B., Esan B.B.T., Murashige T. (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hortic Rev* **1**: 1-78

Titapiwatanakun B., Murphy A.S. (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: Cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot* **60**:1093-1107

Titapiwatanakun B., Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Yang H., Mravec J., Sauer M., Cheng Y., Adamec J., Nagashima A., Geisler M. (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J* **57**: 27-44

Tiwari S.B., Wang X.J., Hagen G., Guilfoyle T.J. (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* **13**: 2809-2822

Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.J. (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **16**: 533-543

Tun-Dzul J.C. (2001) *Chile habanero, características y tecnología de producción*.

-
- Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. pp. 74.
- Vergara D., Lozada-Requena I., Aguilar O.J. (2006) Efecto de la capsicina sobre la producción de TN F- α en células mononucleares. Estudio piloto. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública **23**: 52-55
- Verrier P.J., Bird D., Buria B., Dassa E., Forestier C., Geisler M., Klein M., Kolukisaoglu U., Lee Y., Martinoia E. (2008) Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. Trends Plant Sci **13**: 151-159
- Vert G., Chory J. (2011) Crosstalk in cellular signaling: background noise or the real thing? Developmental Cell **21**: 985-991
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. Trends Plant Sci **12**: 160-168
- Went F.W. (1974) Reflections and speculations. Annu Rev Plant Physiol **25**: 1-26
- Wisniewska J., Xu J., Seifertova D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquie D., Benková E., Scheres B., Friml J. (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. Science **312**: 883
- Xu J., Hofhuis H., Heidstra R., Sauer M., Friml J., Scheres B. (2006) A molecular framework for plant regeneration. Science 311: 385-388
- Yang H., Murphy A.S. (2009) Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. Plant J **59**: 179-191
- Zapata-Castillo Y.P., Canto-Flick A., López-Puc G., Solís-Ruiz A., Barahona-Pérez F., Santana-Buzzy N. (2007) Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. HortScience **42**: 1-5

Zazimalová E., Krecek P., Skupa P., Hoyerova K., Petrásek J. (2007) Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1621-1637

Zenser N., Ellsmore A., Leasure C., Callis J. (2001) Auxin modulates the degradation rate of AUX/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11795-11800

CAPÍTULO II

EXPRESIÓN DE *PIN1*, *PIN4* Y *PIN7* EN EMBRIONES DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

2.1. INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática (ES) es un proceso mediante el cual una célula somática adquiere la capacidad de formar estructuras bipolares cuyo desarrollo es similar al de un embrión cigótico (Elhiti y Stasolla, 2011; Karami y Saidi, 2010; Kothari *et al.*, 2010; Lacau-Danila *et al.*, 2010). Este proceso es altamente complejo y regulado donde intervienen varios factores físicos, químicos y moleculares (Elhiti y Stasolla, 2011; Karami y Saidi, 2010; Ikeda *et al.*, 2006; Gaj, 2004; Cugh y Khurana, 2002; Von Arnold *et al.*, 2002; Dodeman *et al.*, 1998).

Las auxinas intervienen en el crecimiento y el desarrollo de las plantas por su papel en la coordinación de la división, la expansión y diferenciación celular. Un aspecto importante de la acción de las auxinas es su transporte direccional a través de la planta (Friml, 2003). Este transporte polar de auxinas (PAT) es de vital importancia en los eventos de desarrollo tales como la embriogénesis y la diferenciación de órganos (Vanneste y Friml, 2009) y requiere de la actividad de los reguladores del flujo de salida localizados polarmente, representado por los miembros de la familia de proteínas PIN-FORMED. El PAT puede ser inhibido por el ácido naftilftalámico (NPA) y otros fármacos. El tratamiento de embriones inmaduros con tales inhibidores del PAT provoca defectos en el patrón de formación de embriones en varias especies de plantas (Schiavone y Cooke, 1987; Liu *et al.*, 1993; Hadfi *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2003). El hecho de que los mismos defectos del patrón se hayan observado en mutantes múltiples de *Arabidopsis* en los miembros de la familia de genes *PIN*, tales como *pin1*, *pin4* y *pin7* (Liu *et al.*, 1993; Friml *et al.*, 2002a, 2003), respalda la teoría de que las proteínas PIN son necesarias en el PAT para el desarrollo embrionario normal.

En el caso del género *Capsicum* todos los reportes de ES, en *C. annuum* y *C. chinense*, muestran una incapacidad de los embriones de convertirse a planta debido al alto número de deformaciones localizadas en la zona apical de los embriones somáticos (ESs) (López-Puc *et al.*, 2009; Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Steinitz *et al.*, 2003), similares a embriones cigóticos mutantes múltiples *pin1*, *pin4* y *pin7* de *A. thaliana* (Friml *et al.*, 2002a y Friml *et al.*, 2003), por lo que se propuso estudiar la expresión de tres genes miembros de la familia *PIN* (*PIN1*, *PIN4* y *PIN7*) involucrados en el desarrollo del eje apical/basal en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS E INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *C. chinense*

Se tomaron semillas de *C. chinense* var. Mayan Ba'alché y se remojaron 24-h en agua destilada, posteriormente en campana de flujo laminar se realizó la asepsia con etanol (80% v/v) durante 5 min, posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para transferir a una solución de Hipoclorito de Sodio comercial (Cloralex, 30% v/v) por 15 min con cinco lavados de agua destilada estéril. La germinación se realizó como reporta Santana-Buzzy *et al.* en 2005, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionando 1.44 μ M de ácido giberélico (AG₃).

Las semillas se colocaron a razón de 10 semillas por cada frasco de cultivo con 20 ml de medio (Figura 2.1a), los frascos se incubaron en condiciones de oscuridad continua durante 14 días de cultivo para posteriormente transferir a condiciones de luz continua por 7 días.

Para la inducción de la embriogénesis somática se tomaron hipocotilos de aproximadamente 2 cm de longitud y se colocaron en medio MS adicionado con

2,4-D con las condiciones descritas por Avilés-Viñas *et. al.*, (2012) con una fase de inducción de 30 días con 9.05 μM de 2,4-D en medio semisólido (Figura 2.1d), posteriormente los hipocotilos se transfirieron a medio líquido con 4.5 μM de 2,4-D con resiembras cada 14 días con tres ciclos de resiembra (Figura 2.1e).

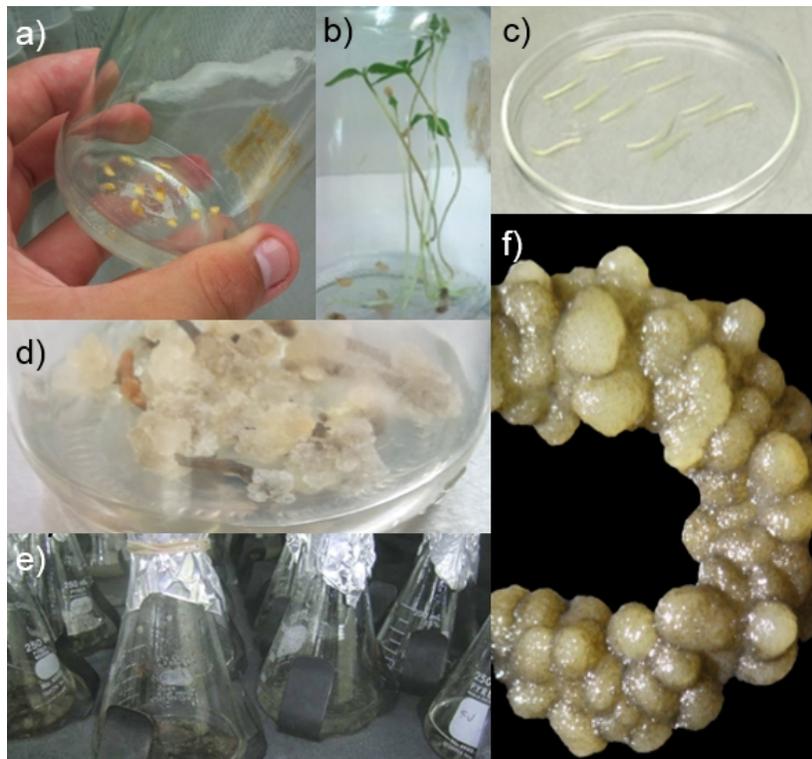


Figura 2.1. Protocolo de embriogénesis somática (Avilés-Viñas *et. al.*, 2012). a) Germinación de semillas en medio MS + AG₃ semisólido, b) Plántulas recién germinadas, c) Cortes de hipocotilos listos para inducirse, d) Hipocotilos inducidos en medio MS + 2,4-D, e) Matracas en agitación con medio líquido MS + 2,4-D para embriogénesis somática y f) Embriones somáticos después de 45 días de cultivo en medio líquido MS + 2,4-D.

Los embriones somáticos (ESs) se separaron en diferentes momentos de desarrollo: ESs en estadios iniciales (globular y acorazonado) y ESs en estadios avanzados (torpedo y cotiledonar).

2.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDOS DE *C. chinense* EN DIFERENTES MOMENTOS DE LA INDUCCIÓN Y DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Se tomaron muestras de tejido en diferentes momentos de la inducción, embriogénesis somática (ES) y embriogénesis cigótica (EC): Hipocotilo a los 0 días (H0), 10 días (H10), 20 días (H20) y 30 días (H30) de inducción, embriones somáticos iniciales (ESI), embriones somáticos avanzados (ESA) (Figura 2.2). Los cuales se almacenaron en tubos Eppendorf a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

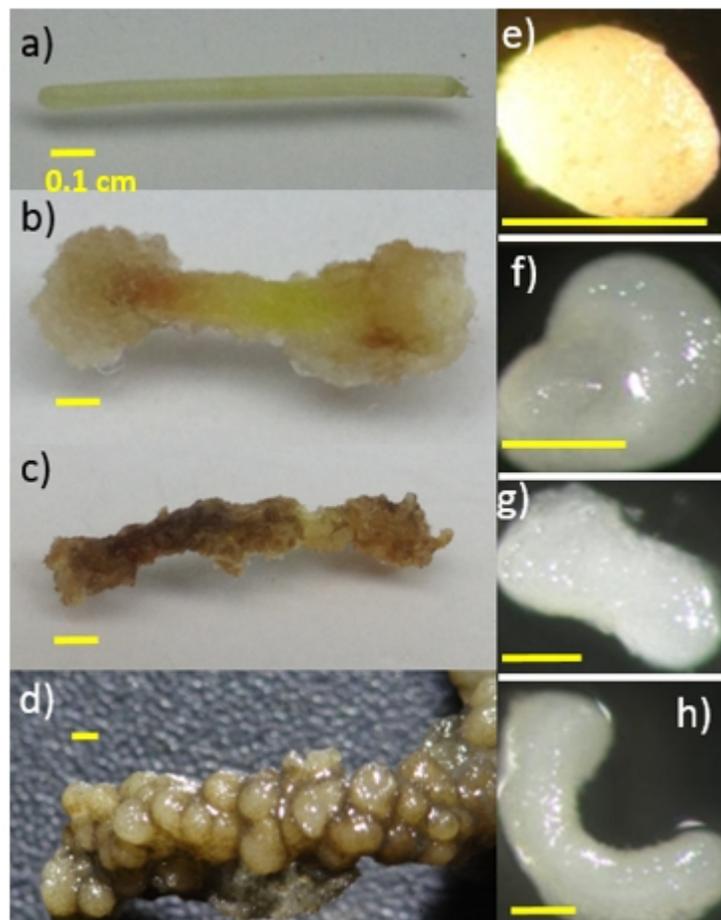


Figura 2.2. Hipocotilos en inducción a los 0 días (a), 10 días (b), 20 días (c) y 30 días (d); embriones somáticos iniciales (e y f), embriones somáticos avanzados (g y h).

En el caso de los embriones cigóticos iniciales (ECI) se extrajeron de frutos de tamaño pequeño (1.43 ± 0.11 cm, Figura 2.3a), las semillas son de una coloración blanco-verdosa con una testa muy suave con una alta cantidad de agua. Los embriones cigóticos avanzados (ECA) se extrajeron de frutos maduros (4.8 ± 0.15 , Figura 2.3b) que presentan semillas de color blanco crema, una testa de mayor dureza y con la presencia de endospermo.

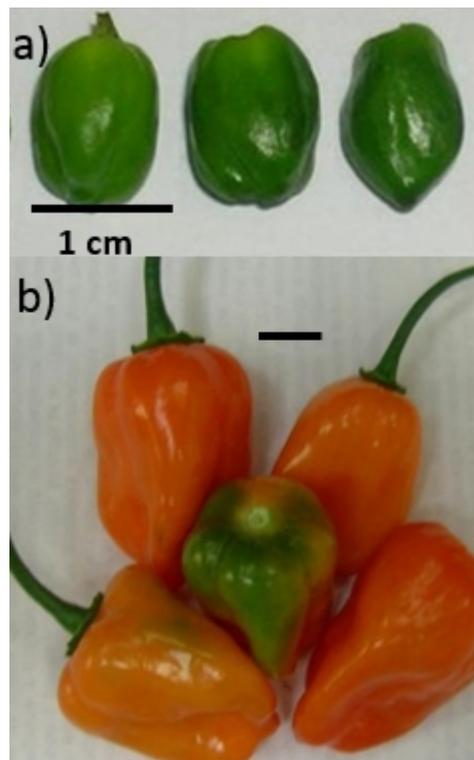


Figura 2.3. Frutos de *C. chinense* en diferentes momentos de desarrollo. a) Frutos pequeños y b) Frutos maduros (barra=1 cm).

La extracción de ARN total se realizó tomando 1 g de tejido y agregando 5 ml del reactivo Trizol siguiendo la metodología de Chomczynski y Sacchi, (1987). A las muestras se les eliminó el ADN mediante el kit ADN-Free de Ambion.

La integridad del ARN se verificó en geles de agarosa al 1.4% teñidos con bromuro de etidio ($60 \mu\text{g/ml}$) con buffer TAE 1X a 80 V. Las muestras se

cuantificaron en un NanoDrop y fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

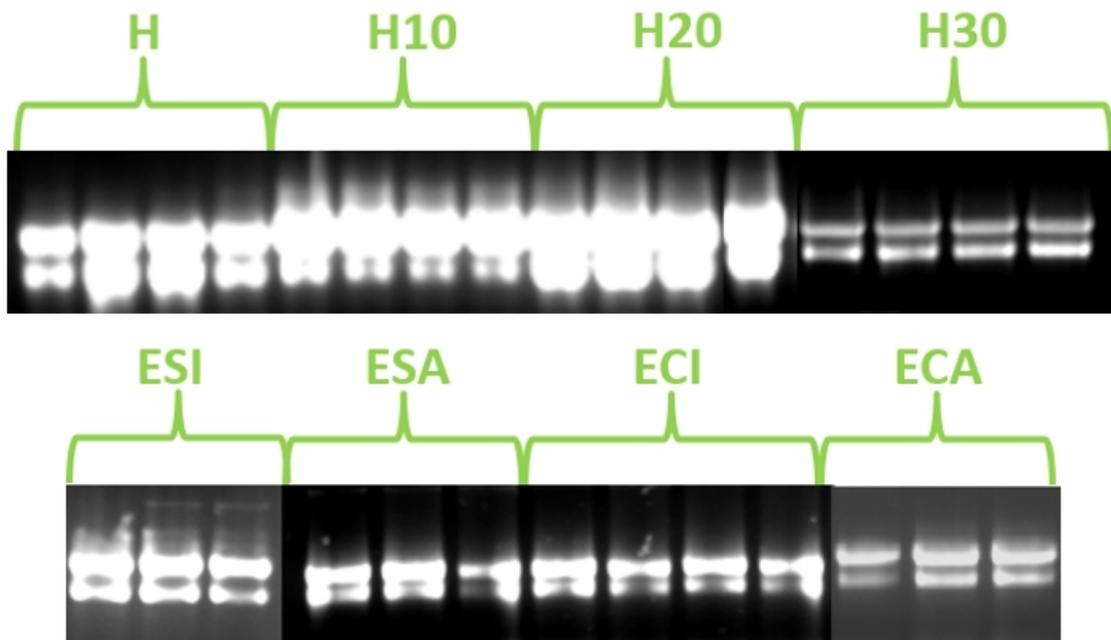


Figura 2.4. Geles de agarosa que comprueban la integridad del ARN total extraído. H: Hipocotilo a los 0 días de inducción, H10: Hipocotilo a los 10 días de inducción, H20: Hipocotilo a los 20 días de inducción, H30: Hipocotilo a los 30 días de inducción, ESI: embriones somáticos iniciales, ESA: embriones somáticos avanzados, ECI: embriones cigóticos iniciales, ECA: embriones cigóticos avanzados.

2.2.3. SINTESIS DE ADNc A PARTIR DE DIFERENTES TEJIDOS

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se siguió el protocolo del fabricante (Promega) tomando 2 μg de ARN total, 1 μl de OligodT y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 13 μl la mezcla se precalentó a 65 °C por 5 min. Posteriormente se agregó 1 μl de dNTPs (10mM), 5 μl de FS-Buffer, 1 μl de DTT (0.1 M), 1 μl de RT-Superscript III posteriormente la mezcla se calentó 50 °C (60 min) y la reacción se finalizó a 70 °C (15 min). La integridad de las muestras

se verificó en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio con buffer TBE 1X a 90V (Figura 2.5). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

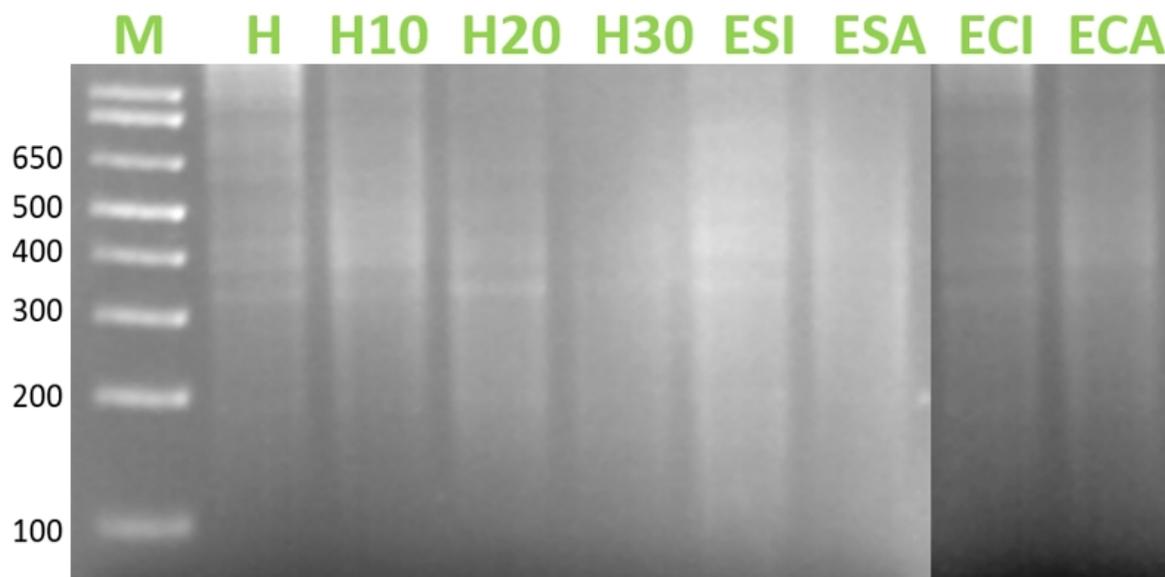


Figura 2.5. Geles de agarosa que comprueban la integridad del ADNc sintetizado. H: Hipocotilo a los 0 días de inducción, H10: Hipocotilo a los 10 días de inducción, H20: Hipocotilo a los 20 días de inducción, H30: Hipocotilo a los 30 días de inducción, ESI: embriones somáticos iniciales, ESA: embriones somáticos avanzados, ECI: embriones cigóticos iniciales, ECA: embriones cigóticos avanzados.

2.2.4 DISEÑO DE CEBADORES

Se utilizó la base de datos del NCBI y se tomaron como criterio de búsqueda proteínas PIN1, PIN4 y PIN7 de tomate (*Solanum lycopersicum*). Se utilizó el algoritmo nucleotide-BLAST, los resultados se filtraron sólo para Solanaceae y se utilizaron las secuencias con el valor E más bajo. Se identificaron y descartaron los fragmentos de la secuencia que codifica para los dominios conservados entre los miembros de la familia PIN. Los cebadores se diseñaron con el programa Primer3Plus y se analizaron en OligoAnalyzer (IDT Technologies).

Cuadro 2.1. Cebadores de tomate empleados para amplificar el gen *PIN1* (Acceso: NM_001247234.1).

Cebador	Secuencia	Tm	Posición	Fragmento
PIN1.1TF	TCCTGTTTCTGATGTTTTTGGGA	63.3	1098	118 pb
PIN1.1TR	GTTCCCTTGCCCTCAACTT	64.2	1215	
PIN1.2TF	AATGGCAACAAAGCACACAA	64.1	1006	117 pb
PIN1.2TR	TCCTCCAAAAACATCAGAAACA	63.3	1117	
PIN1.3TF	TTTTACTCAATGGTGGCTGGT	63.2	778	209 pb
PIN1.3TR	CCTGGATTGGTGCTGGATA	64.7	986	
PIN1.4TF	GCTGGTACTGCTGGGAGAAA	64.3	793	233 pb
PIN1.4TR	TTGTGTGCTTTGTTGCCATT	64.1	1025	
PIN1.5TF	TTATCATGGTGGAGCAGCAG	63.8	921	299 pb
PIN1.5TR	TATTGTTCCCTTGCCCTCA	64.2	1219	
PIN1.6TF	TCAAATGCCTCAAGGTCTGA	63.4	625	398 pb
PIN1.6TR	TGTGCTTTGTTGCCATTGTT	64.1	1022	
PIN1.7TF	TTATCATGGTGGAGCAGCAG	63.8	921	101 pb
PIN1.7TR	TGTGCTTTGTTGCCATTGTT	64.1	1003	
PIN1.8TF	AACAATGGCAACAAAGCACA	64.1	1003	153 pb
PIN1.8TR	GCTGCAGGCTGGTCTAGATT	63.4	1156	
PIN1.9TF	GCTGGTACTGCTGGGAGAAA	64.3	793	232 pb
PIN1.9TR	TTGTGTGCTTTGTTGCCATT	64.1	1006	
PIN1.10TF	AATGGCAACAAAGCACACAA	64.1	1006	209 pb
PIN1.10TR	GTTCCCTTGCCCTCAACTT	64.2	1196	
PIN1.11TF	TCAAATGCCTCAAGGTCTGA	63.4	625	397 pb
PIN1.11TR	TGTGCTTTGTTGCCATTGTT	64.1	1003	
PIN1.12TF	AATTCAAGAGGGCCAACCTCC	64.2	853	366 pb
PIN1.12TR	TATTGTTCCCTTGCCCTCA	64.2	1200	

Cuadro 2.2. Cebadores de tomate empleados para amplificar el gen *PIN4* (Acceso: NM_001247255.1).

Cebador	Secuencia	Tm	Posición	Fragmento
PIN4.1TF	CAAAACCTCAGCAGCCAAAT	64	989	185 pb
PIN4.1TR	ATCATTGCCACCGAACACAT	65.2	1173	
PIN4.2TF	CGACCCCGAGACCATCTAAT	65	836	194 pb
PIN4.2TR	TTCTGCTTCTGCGTTTGTA	63.5	1029	
PIN4.3TF	CAATGATTTTCAGTGCCAACG	64.1	1167	210 pb
PIN4.3TR	AGTCCAGTGGGTCCCTCTTT	63.8	1376	
PIN4.4TF	CCAATTTTGGTCTCTGCAGAT	63.8	788	283 pb
PIN4.4TR	TTAGCATTTGGCTGTTGGTG	63.6	1070	
PIN4.5TF	TCTCACCGGAGCTGAGATTT	63.9	672	342 pb
PIN4.5TR	TGTACATTTGGCTGCTGAGG	63.8	1013	
PIN4.6TF	TGTACATTTGGCTGCTGAGG	63.8	672	337 pb
PIN4.6TR	ATTTGGCTGCTGAGGTTTTG	64	1008	

Cuadro 2.3. Cebadores de tomate empleados para amplificar el gen *PIN7* (Acceso: NM_001247275.1).

Cebador	Secuencia	Tm	Posición	Fragmento
PIN7.1TF	ATGACACCACGACCATCCA	65.3	691	125 pb
PIN7.1TR	TTTTTCCCATTCCACCATTGA	62.7	815	
PIN7.2TF	GCTGAAGTTGGTGATGATGG	63.2	580	132 pb
PIN7.2TR	ATTGGATGGTCGTGGTGTC	63.4	711	
PIN7.3TF	ATGTGTTTCAGGGGAGGTGAC	63.9	1046	219 pb
PIN7.3TR	CAGCAGGCATAGCAGTAGCC	64.9	1264	
PIN7.4TF	CAGGGGAGGTGACTTTGGTA	63.9	1053	218 pb
PIN7.4TR	CACTAGCAGCAGGCATAGCA	64.2	1270	
PIN7.5TF	TCTTTCCATGACACCACGAC	63.7	684	378 pb
PIN7.5TR	CCTCCCCTGAACACATGAAT	63.8	1071	
PIN7.6TF	ACACCACGACCATCCAATTT	64	694	372 pb
PIN7.6TR	GTCACCTCCCCTGAACACAT	63.9	1065	

2.2.5. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN PARA *PIN1*, *PIN4* Y *PIN7*

Cada tubo de reacción para PCR contenía los siguientes componentes: a un volumen final de 10 μ l: 1X PCR Buffer, 1.5 mM de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$), 20 μ M de dNTPs, 1.5 μ M de cada cebador, 0.3 μ l Taq polimerasa (Invitrogen) y 400 – 1,200 ng ADNc.

Las condiciones de amplificación fueron: 94 °C (3 min); 35 ciclos de 94 °C (15 s), un gradiente de 60 °C a 66 °C (30 s), 72 °C (30 s) y una extensión final de 72 °C (10 min).

El gradiente de temperatura que se le aplica a la reacción es para determinar la temperatura de alineamiento óptima para el par de cebadores. Los fragmentos se visualizaron en un gel nativo de agarosa al 3% teñido con de bromuro de etidio (1 μ g/- μ l).

2.2.6. ELECTROFORESIS DE RNA

Preparación del gel: Se pesó 0.9 g de agarosa (3%) y se introdujo en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se añadió 35 mL del buffer de electroforesis (TAE),

seguidamente, la agarosa con el TAE fue expuesta a calor para la disolución de este gelificante, posteriormente fue vertida la agarosa en la bandeja de la cámara de electroforesis y se le agregó 4 μ L de bromuro de etidio. Se dejó solidificar la agarosa con los peines respectivos y finalmente se añadió el buffer de electroforesis hasta el borde del gel.

2.2.7. REAMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Los fragmentos de tamaño esperado para los diferentes genes se reamplificaron utilizando la condición óptima del gradiente y ajustando las concentraciones de cada componente a un volumen final de 50 μ l con un total de 20 μ l de Producto de PCR. Los fragmentos se purificaron utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se visualizaron en un gel de agarosa (3%) teñido con bromuro de etidio (1 μ g/ ml).

La cuantificación de los fragmentos se realizó en un Nanodrop a 260 nm posteriormente los fragmentos se enviaron a la Universidad de Davis en California. Las secuencias se compararon en bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el algoritmo BLASTn.

2.2.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las secuencias obtenidas con un valor de E bajo se tomaron para la reconstrucción filogenética, se alinearon con el programa MEGA6 usando el algoritmo MUSCLE. La historia evolutiva fue deducida por el método de Máxima Verosimilitud (ML), y el modelo se ajustó dependiendo de los diferentes criterios arrojados por el programa. La construcción del árbol consenso BS se realizó a partir de 1000 réplicas que se tomaron para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a las particiones indican que en menos del 50% de las réplicas de BS son colapsadas. El porcentaje de réplicas de

árboles cuando se asocian con taxones agrupados muestran la réplica de BS de 1000 réplicas al lado de las ramas. El árbol es dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas que se utilizan para deducir el árbol filogenético.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 AMPLIFICACIÓN, ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES *PIN1*, *PIN4* Y *PIN7* DE *C. chinense*

2.3.1.1 *PIN1*

Se realizaron gradientes de doce pares de cebadores de *PIN1* diseñados a partir de secuencias de tomate; sin embargo, no amplificó ninguno. Posteriormente se diseñaron seis pares de cebadores adicionales a partir de secuencias del genoma de *Capsicum annuum* (Cuadro 2.4), recientemente secuenciado.

Cuadro 2.4. Cebadores de *C. annuum* empleados para amplificar el gen *PIN1* (Acceso: Capa03g000765).

CEBADOR	SECUENCIA	T _m	Región	TAMAÑO
CaPIN1 .1F	TTTACTCAATGGTTGCTGGTG	58.7		125
CaPIN1 .1R	TGATTTCCCACTTTCCTCCTC	60.4		
CaPIN1 .2F	TTTTACTCAATGGTTGCTGGTG	60		126
CaPIN1 .2R	TGATTTCCCACTTTCCTCCTC	60.4		
CaPIN1 .3F	TGATTTTTACTCAATGGTTGCTG	59.2		130
CaPIN1 .3R	TGATTTCCCACTTTCCTCCTC	60.4		

Aunque amplificaron bandas únicas con los tres pares de cebadores a las tres temperaturas del gradiente, se decidió elegir el par 2 por mostrar una banda más visible (Fig.2.6). El fragmento obtenido se secuenció y se realizó un BLASTn en el

NCBI y en Pepper Genome (Cuadro 2.5). Se pudo observar que la mayor parte de las secuencias pertenece a la familia de las Solanáceas.

Capsicum chinense *PIN1* putativo (*CcPIN1* - 84 pb):

TGCAATGATGTTTATGGTATGTCTAATAATTCAAGAGGGCCAACTCCGAGACC
TTCAAATTATGAGGAGGAAAGTGGGAAATCA

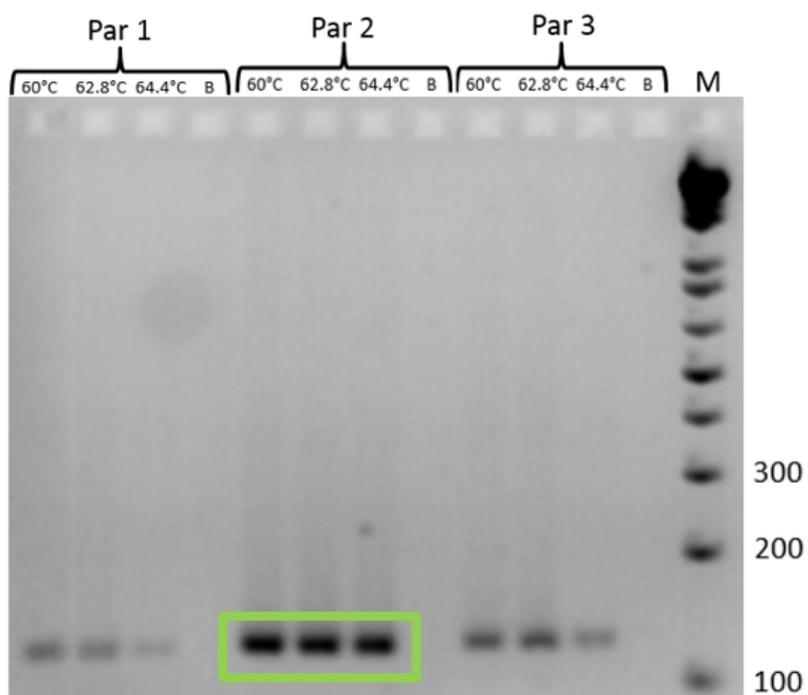


Figura 2.6. Gradientes para la amplificación de *PIN1* en ADNc de planta completa de *C. chinense*.

Cuadro 2.5. Alineamiento de *PIN1* putativo de *C. chinense* en diferentes especies mediante BLASTn.

Espece	Gen	Identidad	Valor E	Acceso
<i>Capsicum annuum</i>	PIN1	100%	8×10^{-40}	Capana03g000765
<i>Solanum tuberosum</i>	PIN1	96%	4×10^{-28}	XM_006341465.1
<i>Solanum lycopersicum</i>	PIN1	95%	2×10^{-25}	NM_001247234.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	PIN1	86%	1×10^{-16}	KC460399.1

Las secuencias enlistadas se alinearon utilizando el programa MULTALIN (INRA) donde se observó el alto grado de identidad de la secuencia obtenida con otras especies (Figura 2.7).

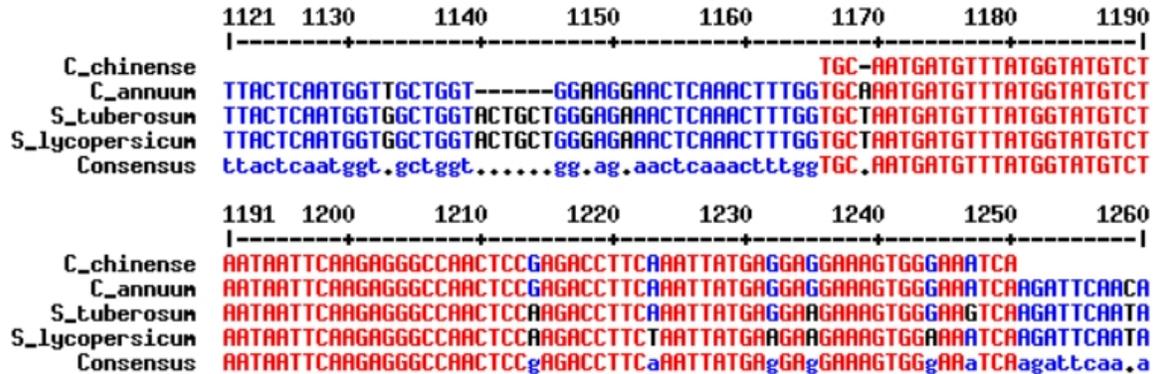


Figura 2.7. Alineamiento de *PIN1* putativo en *C. chinense* con diversas especies: *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* y *Solanum tuberosum*.

Se calculó las distancias evolutivas usando el modelo Kimura de 2 parámetros más distribución gamma y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis incluyó a 19 secuencias de aminoácidos utilizando la secuencia homóloga de *Populus tremula x populus tremuloides* como grupo externo. La reconstrucción filogenética mostró que la secuencia putativa de *PIN1* de *C. chinense* se agrupa de manera cercana con secuencias predichas de *PIN1* con otros miembros de las Solanáceas del género *Capsicum*, *Nicotiana* y *Solanum* (Fig.2.8).

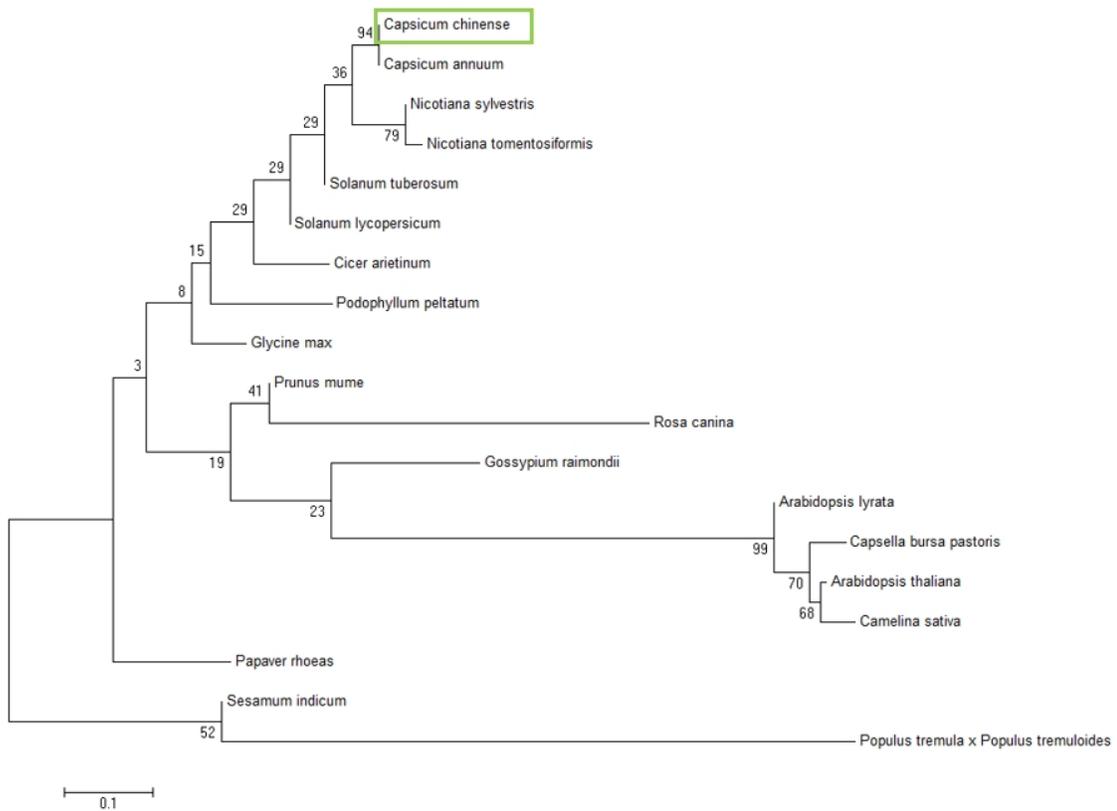


Figura 2.8. Reconstrucción filogenética de *PIN1* putativo utilizando ML, con Kimura de 2 parámetros más distribución gamma y un BS= 1,000 repeticiones.

2.3.1.2 *PIN4*

Se realizaron gradientes de seis pares de cebadores de *PIN4* diseñados a partir de secuencias de tomate, siendo el tercer par de cebadores el que mostró una banda única del tamaño esperado utilizando cDNA de planta completa (Figura 2.9).

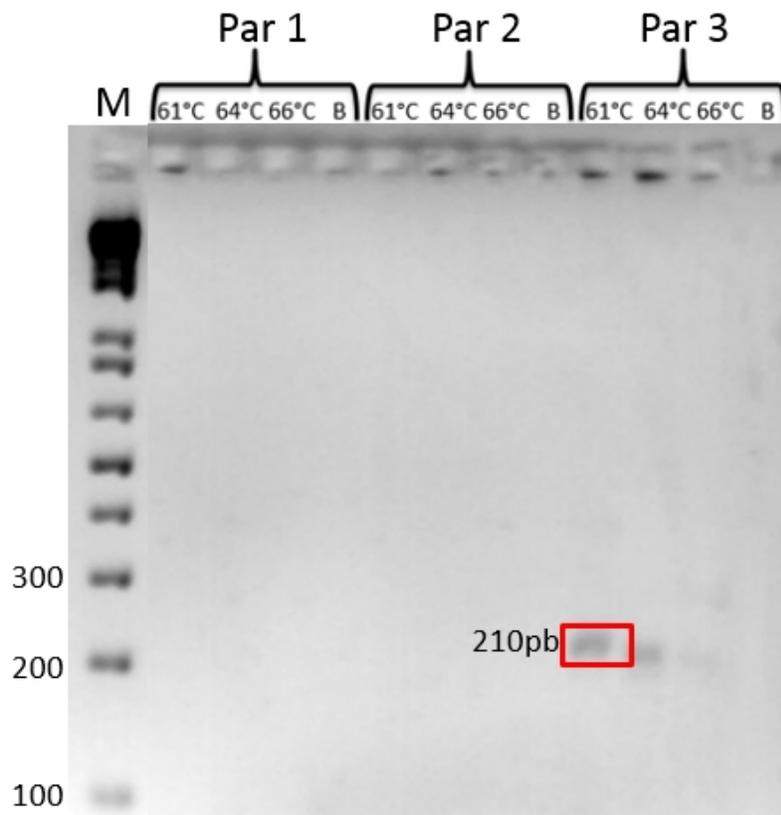


Figura 2.9. Gradientes para la amplificación de *PIN4* en ADNc de planta completa de *C. chinense*.

El fragmento obtenido se secuenció y se realizó un BLASTn en el NCBI y en Pepper Genome (Cuadro 2.6) donde se observa que la mayor parte de las secuencias pertenece a la familia de las Solanaceas.

Capsicum chinense PIN4 putativo (*CcPIN4* - 151 pb):

```
TTCGCGTGTGGTTTCATATCTCCCCAAAATGGGGATACAAAAGGCATTCCCC
AACGGGAGAATCGGAGGGGAGGATTCACCTTTGGAGTGCTATTGGTGCGAA
AAAATGGAGACAAAGAAAAGCATACGTGAAGGACCCACTGGACT
```

Cuadro 2.6. Alineamiento de *PIN4* putativo de *C. chinense* en diferentes especies mediante BLASTn.

Especie	Gen	Identidad	Valor E	Acceso
<i>Capsicum annuum</i>	PIN4	99%	1X10 ⁻⁶⁸	Capang10g001908
<i>Solanum lycopersicum</i>	PIN4	76%	2X10 ⁻¹⁵	NM_001247255
<i>Nicotiana tabacum</i>	PIN4	74%	1X10 ⁻⁵	KC433529.1

Las secuencias enlistadas se alinearon utilizando el programa MULTALIN (INRA) donde se observó el alto grado de identidad de la secuencia obtenida con otras especies (Figura 2.10).

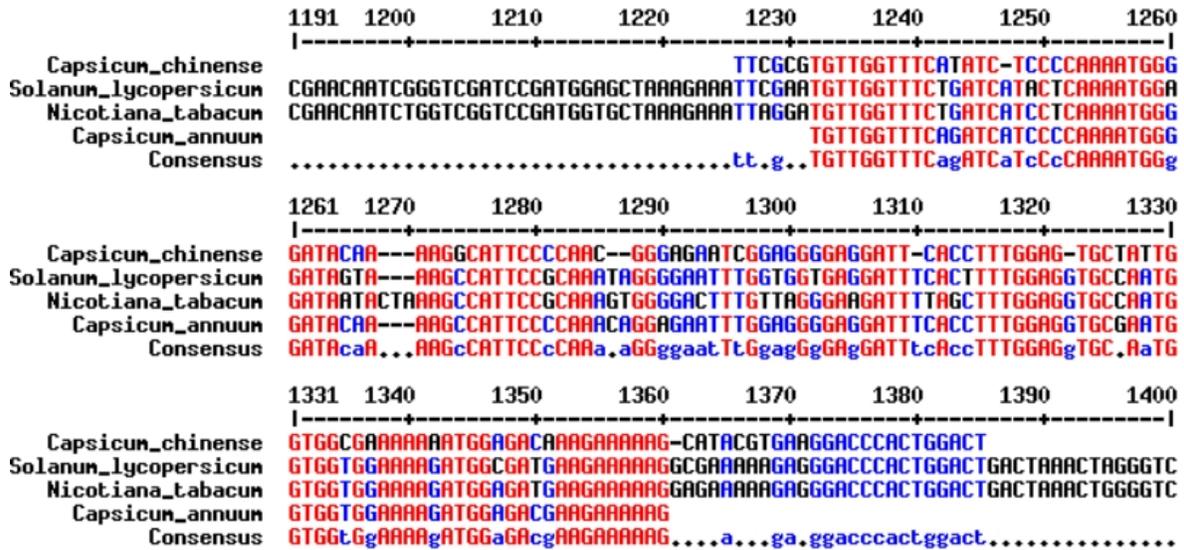


Figura 2.10. Alineamiento de *PIN4* putativo en *C. chinense* con diversas especies: *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum* y *Nicotiana tabacum*.

Se calculó las distancias evolutivas mediante el modelo Kimura de 2 parámetros más distribución gamma y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis incluyó a 14 secuencias de aminoácidos utilizando la secuencia homóloga de *Medicago truncata* como grupo externo. La reconstrucción filogenética mostró que la secuencia putativa de *PIN4* de *C. chinense* se agrupa de manera cercana con secuencias predichas de *PIN4*

con otros miembros de las Solanáceas como *C. annuum*, *S. tuberosum* y *S. lycopersicum* (Figura 2.11).

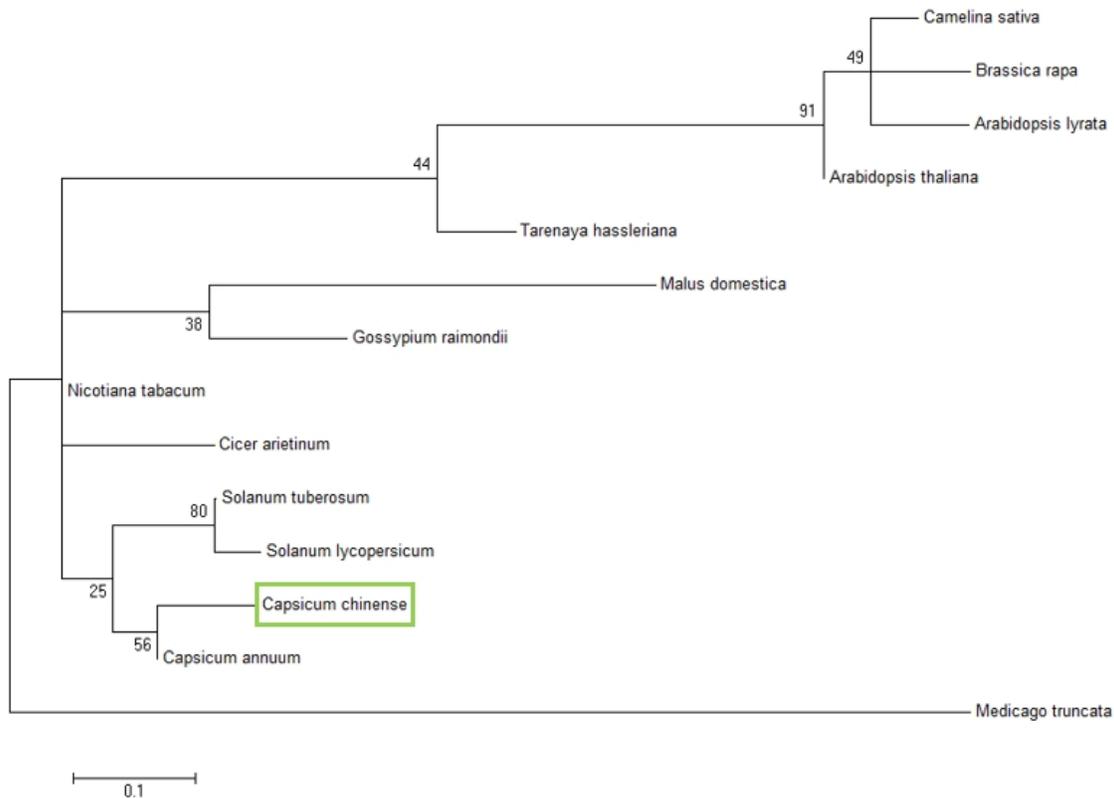


Figura 2.11. Reconstrucción filogenética de *PIN4* putativo utilizando ML, con Kimura de 2 parámetros más distribución gamma y un BS= 1,000 repeticiones.

2.3.1.3 *PIN7*

Se realizaron gradientes de seis pares de cebadores de *PIN7* diseñados a partir de secuencias de tomate, sin embargo no amplificó ninguno. Posteriormente se diseñaron seis pares adicionales a partir de secuencias del genoma de *Capsicum annuum* (Cuadro 2.7).

Cuadro 2.7. Cebadores de *C. annuum* empleados para amplificar el gen *PIN7* (Acceso: Capang10g001908).

Cebador	Secuencia	Tm	Posición	Fragmento
PIN7.1TF	ATGACACCACGACCATCCA	61	691	125 pb
PIN7.1TR	TTTTTCCCATTCCACCATTGA	59	815	
PIN7.2TF	GCTGAAGTTGGTGATGATGG	59	580	132 pb
PIN7.2TR	ATTGGATGGTCGTGGTGTC	59	711	
PIN7.3TF	ATGTGTTTCAGGGGAGGTGAC	60	1046	219 pb
PIN7.3TR	CAGCAGGCATAGCAGTAGCC	60	1264	
PIN7.4TF	CAGGGGAGGTGACTTTGGTA	60	1053	218 pb
PIN7.4TR	CACTAGCAGCAGGCATAGCA	60	1270	
PIN7.5TF	TCTTTCCATGACACCACGAC	60	684	378 pb
PIN7.5TR	CCTCCCCTGAACACATGAAT	60	1071	
PIN7.6TF	ACACCACGACCATCCAATTT	60	694	372 pb
PIN7.6TR	GTCACCTCCCCTGAACACAT	60	1065	

Amplificaron bandas con los seis pares de cebadores a las tres temperaturas del gradiente, se decidió elegir el par 2 por mostrar las bandas únicas más visibles (Figura 2.12).

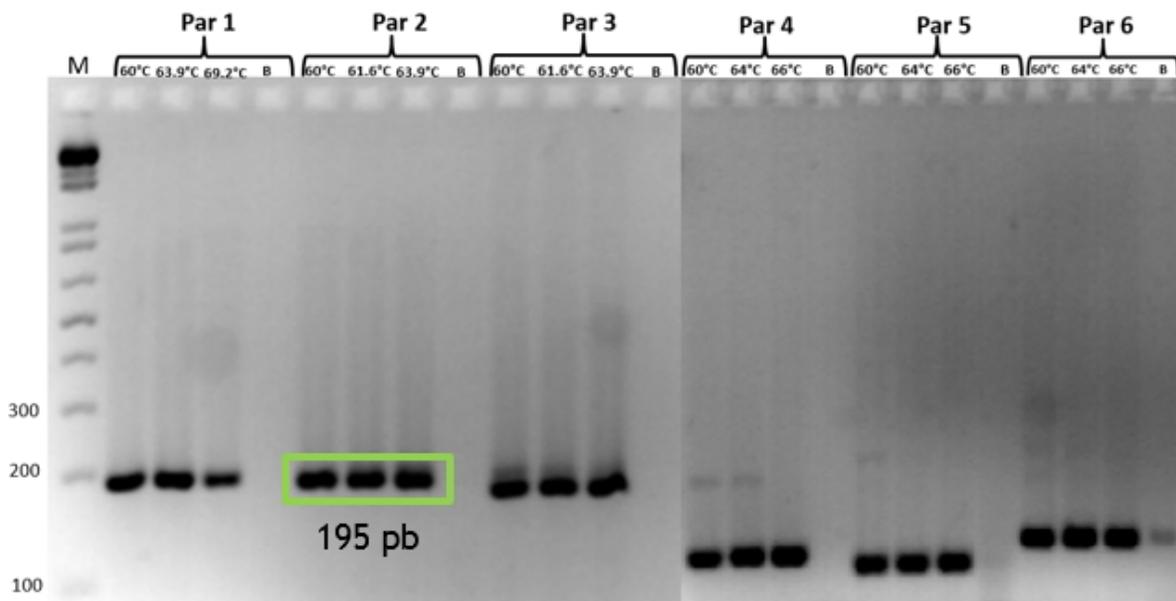


Figura 2.12. Gradientes para la amplificación de *PIN7* en ADNc de planta completa de *C. chinense*.

El fragmento obtenido se secuenció y se realizó un BLASTn en el NCBI y en Pepper Genome (Cuadro 2.8) donde se observa que la mayor parte de las secuencias pertenece a la familia de las Solanáceas.

Capsicum chinense PIN7 putativo (CcPIN7 - 195 pb):

GATACTGGTGAAGCACTTGAGCTCCAAACAAACATGTGAAGATCTTTTCCACC
TTCACCTTCCATTACCCTTCTTCTTTGTCCCCGCCGGTCCGGTTGCCGGAGAAA
ATATCCCAGCATTAGTAGGTGCAGGGTAAATGGAAGTGAAGGTGGAAAAGAT
CTTCACATGTTTGTGGAGCTCAAGTGCTTCACCAG

Cuadro 2.8. Alineamiento de PIN7 putativo de *C. chinense* en diferentes especies mediante BLASTn.

Especie	Gen	Identidad	Valor E	Acceso
<i>Capsicum annuum</i>	PIN7	99%	2×10^{-68}	Capang10g001908
<i>Solanum lycopersicum</i>	PIN7	90%	2×10^{-42}	NM_001247275.1
<i>Solanum tuberosum</i>	PIN1	91%	5×10^{-40}	XM_006339198.1

Las secuencias enlistadas se alinearon utilizando el programa MULTALIN (INRA) donde se observó el alto grado de identidad de la secuencia obtenida con otras especies (Figura 2.13).

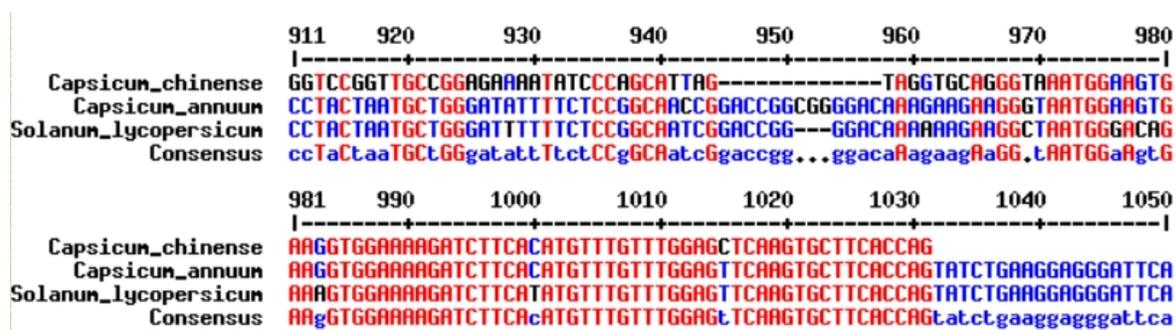


Figura 2.13. Alineamiento de PIN7 putativo en *C. chinense* con diversas especies: *Capsicum chinense*, *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum*.

El alineamiento mostró que la secuencia putativa de *PIN7* de *C. chinense* no se alinea como se esperaría con secuencias predichas de *PIN7* pertenecientes a otros miembros de las Solanáceas, esto podría ser debido a las siguientes razones: 1) el tamaño reducido del fragmento secuenciado, y 2) la porción no conservada de este alineamiento pertenece al dominio transmembranal de la proteína (dominio conservado entre PINs pero divergente entre especies). La parte conservada (apenas 30 pb) pertenece al loop hidrofílico (dominio divergente entre PINs pero conservado entre especies) que contiene los motivos que tienen una función de fosforilación (TPRXS).

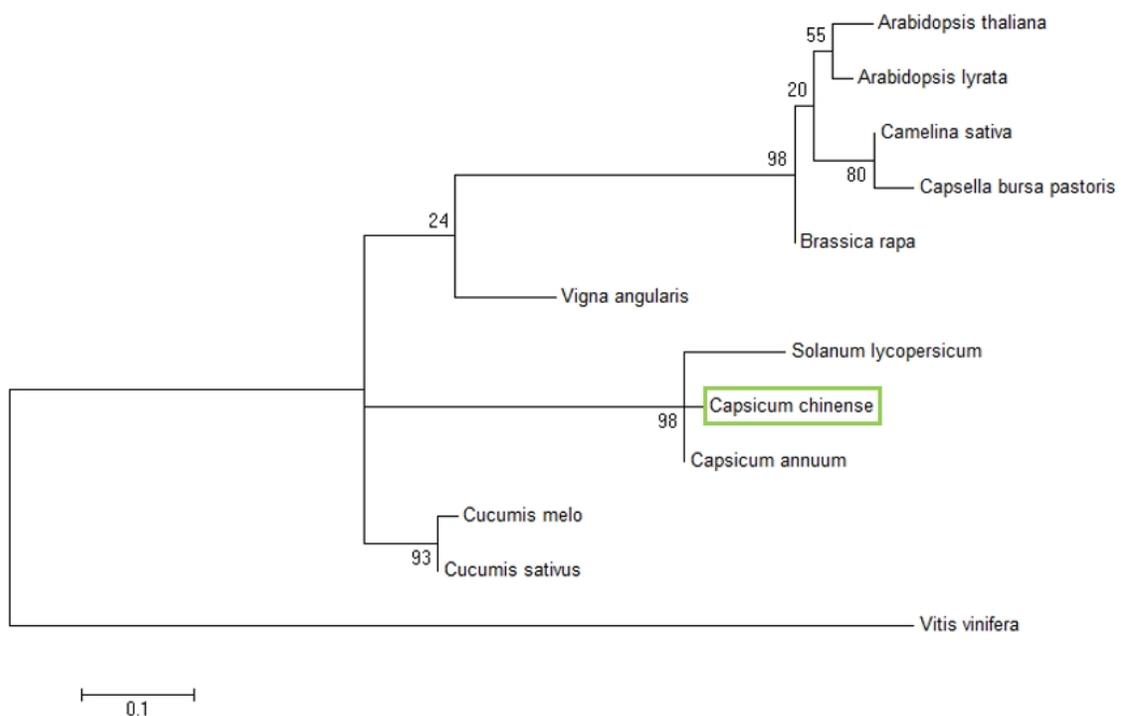


Figura 2.14. Reconstrucción filogenética de *PIN7* putativo utilizando ML, con Kimura de 2 parámetros más distribución gamma y un BS= 1,000 repeticiones.

Se calculó las distancias evolutivas mediante el modelo Kimura de 2 parámetros más distribución gamma y se encuentran en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis incluyó a 12 secuencias de

aminoácidos utilizando la secuencia homóloga de *Vitis vinifera* como grupo externo. La reconstrucción filogenética mostró que la secuencia putativa de *PIN7* de *C. chinense* se agrupa de manera cercana con secuencias predichas de *PIN7* con otros miembros de las Solanáceas como *C. annuum* y *S. lycopersicum* (Figura 2.14).

2.3.2 EXPRESIÓN DE *PIN1*, *PIN4* Y *PIN7* EN HIPOCOTILOS EN INDUCCIÓN, EMBRIONES CIGÓTICOS Y EMBRIONES SOMÁTICOS DE *C. chinense*

Se usó como marcador constitutivo el gen *18S* ribosomal (PM: 200 pb) para todos los tejidos de *C. chinense*. Con el uso de este *house keeping* se ha observado expresión homogénea en todos los tejidos, además de presentar la misma intensidad de banda (expresión) en todos los tejidos analizados (Figura 2.15).

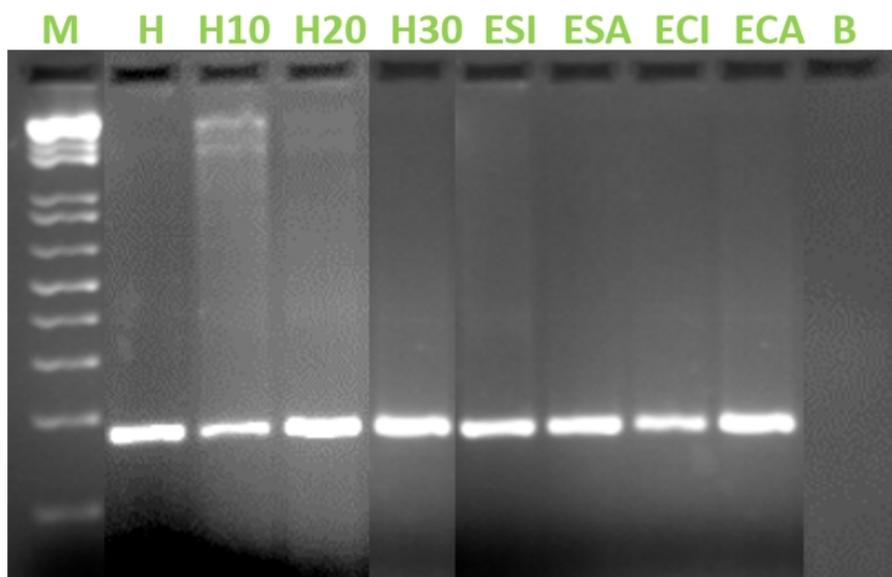


Figura 2.15. Expresión del gen constitutivo *18S* ribosomal para verificar la integridad del ADNc en diferentes tejidos de *C. chinense* (PM: 200 pb). H: Hipocotilo a los 0 días de inducción, H10: Hipocotilo a los 10 días de inducción, H20: Hipocotilo a los 20 días de inducción, H30: Hipocotilo a los 20 días de inducción, ESI: embriones somáticos iniciales, ESA: embriones somáticos avanzados, ECI: embriones cigóticos iniciales, ECA: embriones cigóticos avanzados.

En la siguiente figura (Figura 2.16) se ilustra los resultados del análisis RT-PCR semi-cuantitativo en hipocotilos a los 0, 10, 20 y 30 días de tratamiento con 2,4-D para inducir la embriogénesis somática, y en embriones somáticos y cigóticos en estadios iniciales y avanzados de su desarrollo.

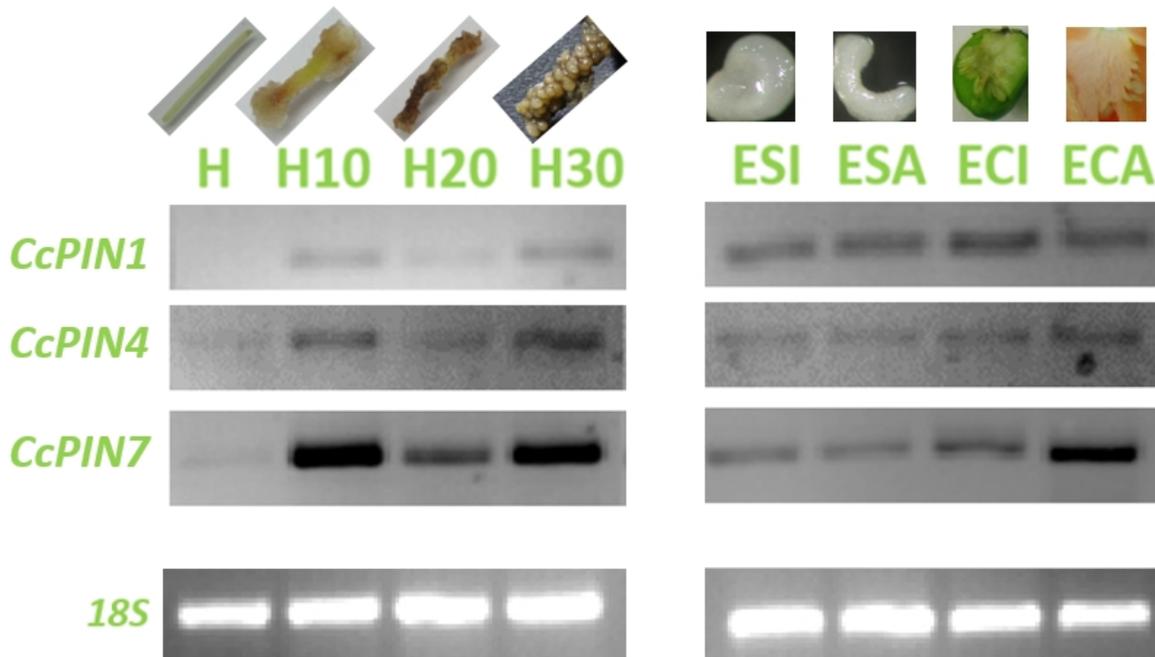


Figura 2.16. Expresión de los genes *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7*. H: Hipocotilo a los 0 días de inducción, H10: Hipocotilo a los 10 días de inducción, H20: Hipocotilo a los 20 días de inducción, H30: Hipocotilo a los 30 días de inducción, ESI: embriones somáticos iniciales, ESA: embriones somáticos avanzados, ECI: embriones cigóticos iniciales, ECA: embriones cigóticos avanzados.

Como se aprecia, la intensidad de las bandas de los genes *CcPIN* en los estadios de desarrollo del embrión, con respecto a la intensidad de la banda del gen constitutivo *18S* ribosomal, de manera general fue menor en las muestras analizadas, esto permite visualizar los siguientes patrones de expresión relativa:

- La expresión de *CcPIN1* en hipocotilos en inducción es baja, especialmente

a los 0 días donde es nula, aumenta a los 10 días, disminuye a los 20 días y aumenta de nuevo a los 30 días. La expresión es mayor en los embriones, especialmente en embriones cigóticos iniciales, sin embargo, sigue siendo menor que el gen *18S*.

- El patrón de expresión de *CcPIN4* es muy similar al de *CcPIN1* salvo las siguientes excepciones: hay una mínima expresión en hipocotilos a los 0 días de inducción a diferencia de *CcPIN1* donde es nula. De entre embriones somáticos y cigóticos, la intensidad de la banda es levemente mayor en los embriones cigóticos.
- El patrón de expresión del gen *CcPIN7* en hipocotilos en inducción es la misma que en *CcPIN4*, sin embargo en H10, H20 y H30, la intensidad de las bandas son mayores, especialmente el H10 donde incluso es mayor que la intensidad de la banda del gen *18S*. De entre los embriones, la expresión es mayor en embriones cigóticos, especialmente en la fase avanzada donde la intensidad de la banda es la misma que el gen *18S*.

Los resultados obtenidos muestran que la intensidad de la banda del gen *CcPIN7* en hipocotilos de *C. chinense* fue relativamente mayor que la de *CcPIN1* y *CcPIN4* (Figura 2.17a), el medio de cultivo utilizado en este trabajo para inducir la embriogénesis somática (Avilés-Viñas *et. al.*, 2012) contiene una concentración de 9.05 μM de 2,4-D. Estos resultados coinciden con lo reportado por Vieten *et. al.*, (2005) en 2005 (Figura 2.17b) quienes al analizar por RT-PCR la expresión de los genes *PIN* en plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en diferentes concentraciones de 2,4-D, encontraron que la expresión de los diferentes genes *PIN* revelaron diferentes cinéticas, en dependencia de la concentración de esta auxina en el medio de cultivo, resultando que cuando se trataron con 10 μM de 2,4-D la expresión del gen *PIN7* fue superior que la de *PIN1* y *PIN4*.

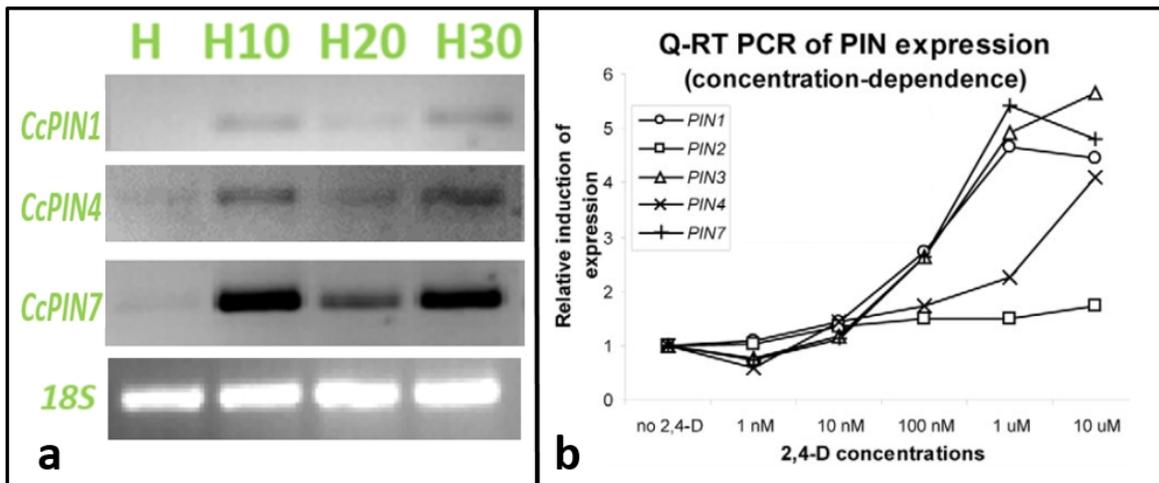


Figura 2.17. Expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en *C. chinense* y *A. thaliana*. (a) Expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en hipocotilos en inducción, H: Hipocotilo a los 0 días de inducción, H10: Hipocotilo a los 10 días de inducción, H20: Hipocotilo a los 20 días de inducción, H30: Hipocotilo a los 30 días de inducción. (b) RT-PCR mostrando la expresión diferencial de genes *PIN* bajo el efecto de la concentración de 2,4-D en plántulas de *Arabidopsis* (Vieten *et. al.*, 2005).

El aumento en la expresión de *CcPIN1*, *CcPIN 4* y *CcPIN 7* en los hipocotilos durante el lapso de los 0 a los 10 días de inducción puede ser debido a que cuando la concentración de auxinas endógenas es alta (Figura 2.18), aumenta la expresión de proteínas PIN, específicamente las PIN largas (*PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4* y *PIN7*) y disminuye la expresión hasta que esta concentración se regula (Ríos *et. al.*, 2014), lo que observamos a los 20 días de inducción. A los 30 días hay un aumento en la expresión de *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* probablemente porque ya hay embriones somáticos globulares dentro de los explantes.

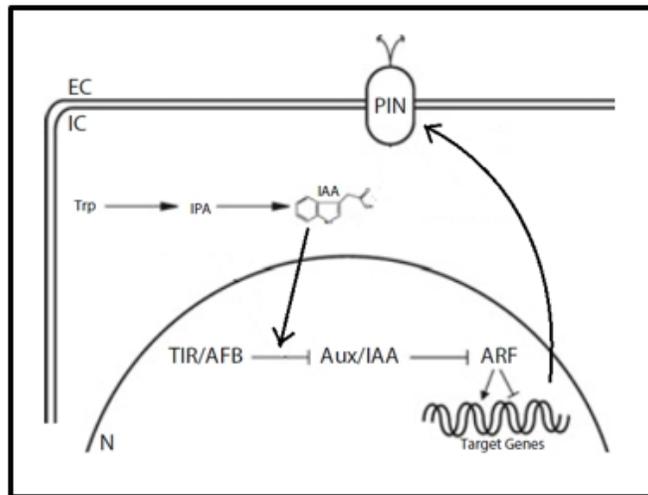


Figura 2.18. Efecto de las auxinas en la expresión de genes *PIN*. Trp: Triptofano, IPA: Ácido Indol-3-Propiónico, IAA: Ácido Indol Acético, TIR/AFB: Receptor de auxinas con actividad degradadora de Aux/IAA, Aux/IAA: Complejo con potentes dominios de represión transcripcional, ARF: Factores Responsivos de Auxinas. Modificado de Ríos *et. al.*, 2014.

En la Figura 2.16 se puede observar una clara diferencia en la intensidad de las bandas de *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7*, entre embriones somáticos y embriones cigóticos. En un estudio realizado en embriones somáticos de *Picea abis* (Figura 2.19b), la intensidad de las bandas de *PIN1* fue menor al compararla con su expresión en diferentes partes de plántulas obtenidas a partir de embriones cigóticos, lo que corrobora los resultados obtenidos en *C. chinense* donde se observó mayor expresión de *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7* en embriones cigóticos comparados con embriones somáticos (Figura 2.19a). Sin embargo, podemos observar que hay un patrón similar entre los embriones somáticos de *P. abis* y los cigóticos de *C. chinense*: En los embriones iniciales es mayor la intensidad de *PIN1* que en embriones avanzados, situación que no se da en los embriones somáticos de *C. chinense*.

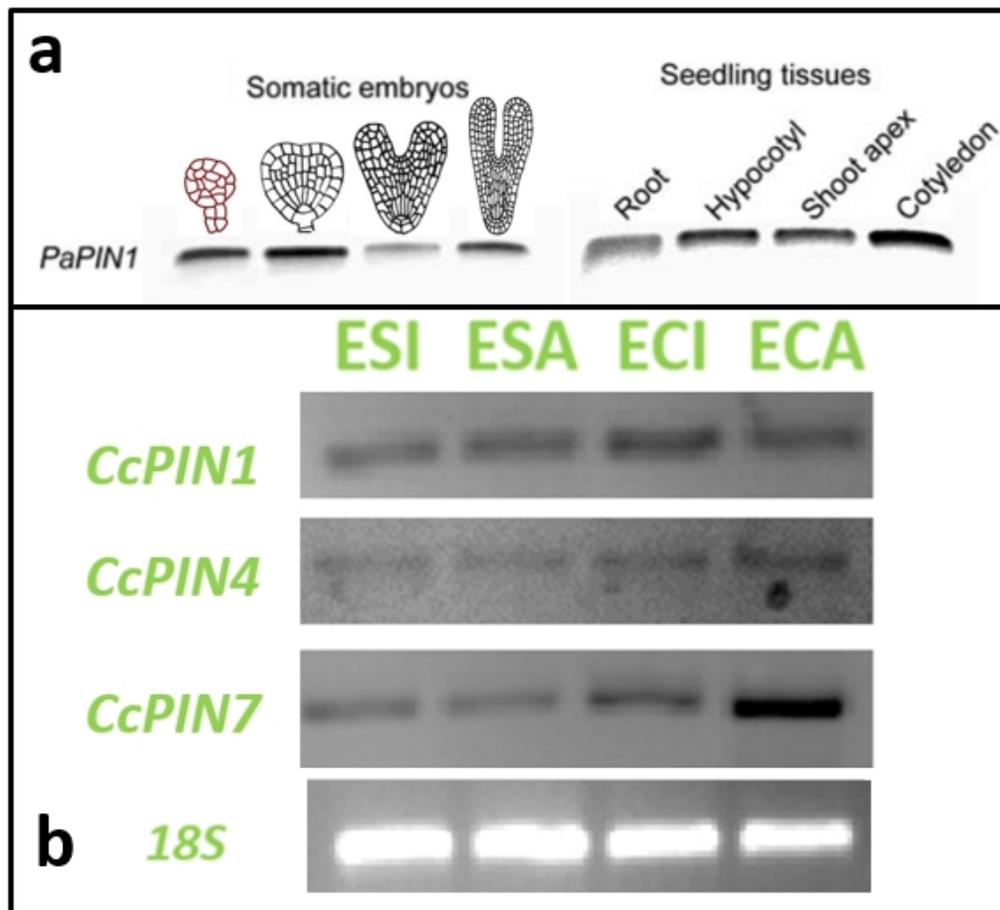


Figura 2.19. Expresión de *PIN1* en *P. abis* y *C. chinense*. (a) Expresión de *PIN1* en embriones somáticos y plántulas de *Picea abis*. Modificado de Palovaara J. *et al.* 2010 (b) Expresión de los genes *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7* en embriones somáticos y cigóticos de *C. chinense*.

Según Patison y Catalá (2012), probablemente el patrón de acumulación de auxinas en tejidos de frutos en desarrollo de tomate esté regulado por el transporte polar de auxinas mediado por las proteínas PIN, en este reporte la expresión del gen *PIN7* en tomate es mucho más alta que la de *PIN1* en frutos maduros de tomate (Figura 2.20a), y en estadios tempranos de desarrollo del fruto la diferencia de expresión entre ambos genes fue similar. Coincidiendo con lo reportado por estos autores, en *C. chinense* (Figura 2.20b), la intensidad de las

bandas sugiere que podría haber una mayor expresión de *CcPIN7* que de *CcPIN1*, en embriones cigóticos en estadios avanzados de su desarrollo, mientras que en embriones cigóticos iniciales (aislados de semillas de frutos de 10 días post antesis).

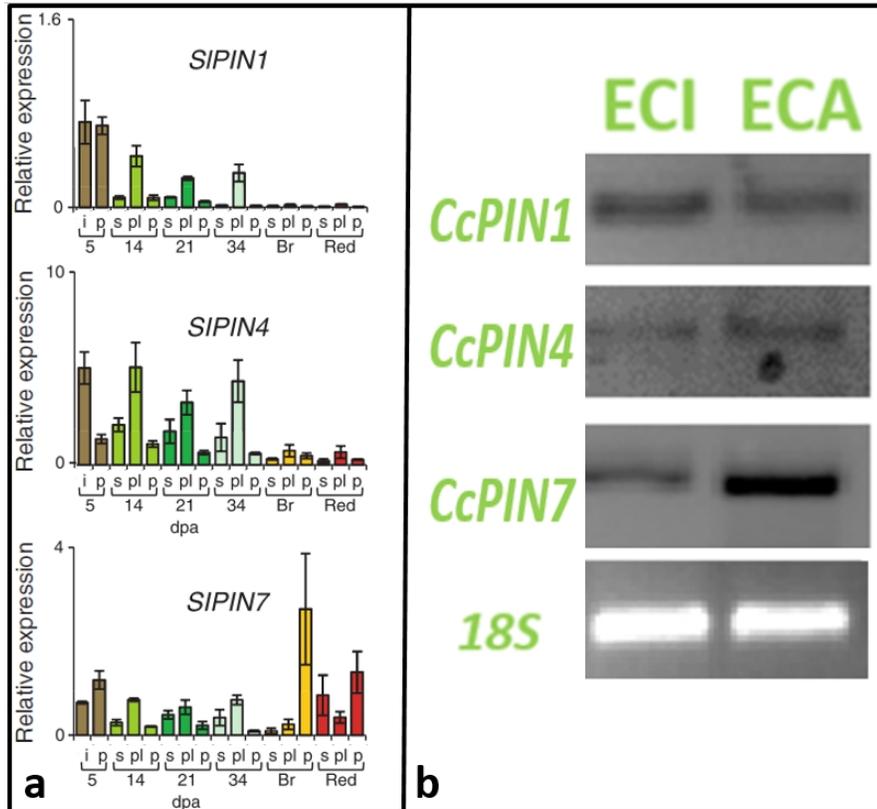


Figura 2.20. Expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en *C. chinense* y *S. lycopersicum*. (a) RT-PCR mostrando la expresión de *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* en frutos de *Solanum lycopersicum* a los 5, 14, 21, 34 días post antesis (dpa) y en frutos marrones (Br) y rojos (Red). Modificado de Pattison y Catalá 2012. (b) Expresión de los genes *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7* en embriones cigóticos iniciales y avanzados de *C. chinense*.

Los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* han sido estrechamente relacionados con el establecimiento del patrón apical-basal en embriones vegetales. Sin embargo, existen reportes que evidencian que todos los genes *PIN* funcionan asociados con

otros genes. Los resultados obtenidos por Pattison y Catalá (2012) indican que los genes *PIN* y *AUX/LAX* tienen una expresión específica en los tejidos durante los diferentes estadios de desarrollo y con frecuencia se puede superponer la expresión de ambas familias, lo que sugiere una acción coordinada de proteínas *AUX/LAX* y *PIN* en el establecimiento de los gradientes de auxina, durante el desarrollo del fruto. Así por ejemplo, un gen al que se le ha atribuido la iniciación de la embriogénesis somática en muchas especies es *BABYBOOM* (*BBM*). Se reportó que *BBM* se co-expresa junto con otros genes como *GLP*, *GST*, *PIN*, *WOX*, *LEC2*, y los genes *AGL15*. En el trabajo de Salvo (2014), *PIN1* se coexpresó con *GST*, *BBM* y los genes *WOX* (Fig.2.21).

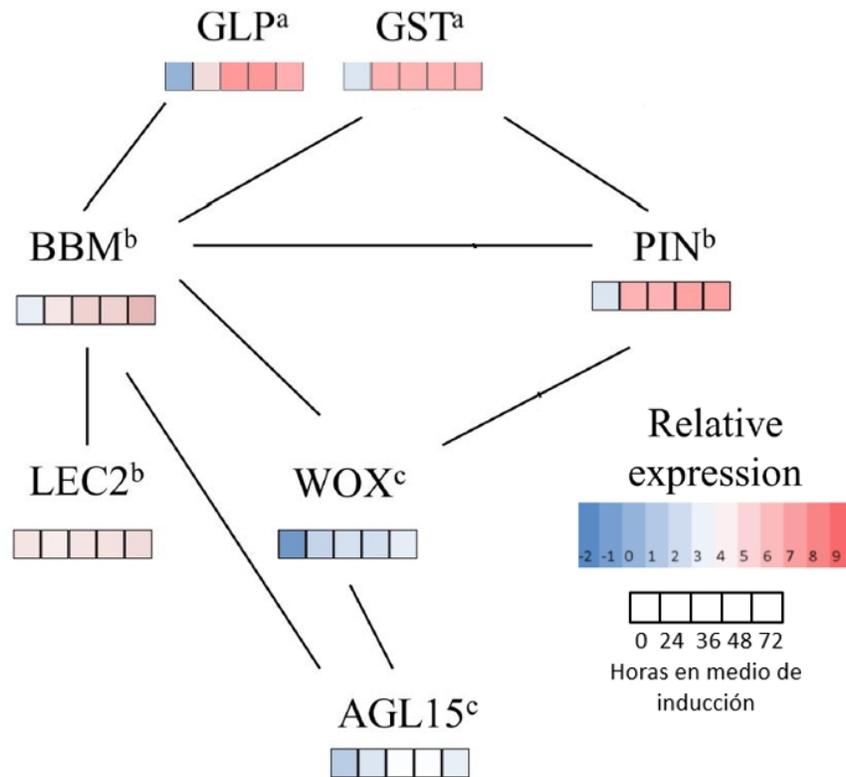


Figura 2.20. Expresión relativa de los genes relacionados con la embriogénesis somática. a) genes mayormente asociados con respuestas a estrés, b) genes mayormente reportados asociados a la vía de iniciación de la embriogénesis, c) genes mayormente reportados asociados a la formación y desarrollo embrionario. Modificado de Salvo *et al.* (2014).

Como se ha mencionado, el bucle central entre los dominios transmembranales de las proteínas PIN contienen residuos TPRXS (donde X puede ser cualquier aminoácido) que son el sitio de fosforilación de la cinasa PINOID (Michniewicz *et. al.*, 2007). La fosforilación de este bucle dependiente de PINOID, junto con la actividad antagónica de la fosfatasa PP2A, regulan la localización específica de las proteínas PIN dentro de la célula y por lo tanto la dirección de flujo de salida de auxinas (Friml *et. al.*, 2004, Michniewicz *et. al.*, 2007). También se ha reportado que las glicoproteínas ABC-B transportadores de auxina interactúan con el región de bucle de las PINs para mejorar la velocidad y la especificidad de flujo de salida de auxinas (Blakeslee *et. al.*, 2007; Geisler y Murphy 2006).

2.4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

2.4.1. CONCLUSION

La baja expresión de los genes *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcPIN7* determinada en la etapa de inducción de la embriogénesis somática y en los mismos embriones somáticos, indica que probablemente se esté afectando el transporte polar de auxina en los embriones somáticos de *C. chinense*, de manera tal que la inhibición o alteración en la acumulación de auxina durante la embriogénesis, puede estar interfiriendo en el programa de división celular y subsecuentemente, la adecuada diferenciación del meristemo apical.

2.4.2. PERSPECTIVAS

- Los resultados que se presentan en este trabajo servirán de base para la realización de futuras investigaciones orientadas a entender los mecanismos moleculares del transporte de auxinas en *Capsicum chinense* Jacq., y particularmente asociadas con la recalcitrancia *in vitro* del género *Capsicum*.
- Resulta fundamental medir la expresión génica con métodos cuantitativos (qRT-PCR) a fin de tener un mayor soporte para el análisis de la expresión.
- El análisis de la expresión a nivel de proteína, por medio de anticuerpos, puede brindar información valiosa para conocer la dinámica de las proteínas relacionadas con el transporte polar de auxinas expresadas en los embriones somáticos en momentos particulares y bajo determinadas condiciones de medio de cultivo.
- Sería muy importante realizar análisis mediante hibridación *in situ* e

histoquímica a fin de localizar la expresión de estos genes en los embriones somáticos y cigóticos de *C. chinense*.

- Sería enriquecedor estudiar la dinámica de expresión de algunos grupos de genes que están relacionados con la actividad de las proteínas PIN:

I. Genes que activan y regulan la expresión de los genes *PIN*: *ARFs*, *MONOPTEROS*, *DRN* y *PLETHORA*.

II. Genes que codifican para enzimas que regulan la actividad de las proteínas PIN como transportadores: cinasas *AGC* que fosforilan a las PINs (*PINOID*, *WAG1*, *WAG2* y *D6PK*) y las fosfatasas que las desfosforilan (*PP2A*).

III. Genes que junto con los genes PIN están involucrados en la embriogénesis: *BBM*, *WOX*, *GLP*, *GLC*, *LEC* y *AGL15*.

4. BIBLIOGRAFÍA

- Avilés-Viñas S., Lecona-Guzmán C., Canto-Flick A., López-Erosa S., Santana-Buzzy, N. (2013) Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. *Plant Biotechnol Reports* **7**: 277-286.
- Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Lee O.R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S.N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J. (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 131-147
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-159
- Cugh A., Khurana P. (2002) Gene expression during somatic embryogenesis – recent advances. *Current Science* **83**: 715-730
- Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. (1998) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* **48**: 1493-1509
- Elhiti M., Stasolla C. (2011) The Use of Zygotic Embryos as Explants for In Vitro Propagation: An Overview. In: *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols* Thorpe T.A. y Yeung E.C. (Eds). *Methods in Molecular Biology* **710**: 229-255
- Friml, J. (2003) Auxin transport—Shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 7-12
- Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jürgens G. (2002a) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 661-673

-
- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153
- Friml J., Wisniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* **415**: 806-809
- Friml J., Yang X., Michniewicz M., Weijers D., Quint A., Tietz O., Benjamins R., Ouwerkerk P.B., Ljung K., Sandberg G. (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science* **306**: 862-865
- Gaj M.D. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynht. *Plant Growth Regulation* **43**: 27-47
- Geisler M., Murphy A.S. (2006) The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett* **580**: 1094-1102
- Hadfi K., Speth V., Neuhaus G. (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* **125**: 879-887
- Ikeda M., Umehara M., Kamada H. (2006) Embryogenesis-related genes, It's expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology* **23**: 153-161
- Karami O., Saidi A. (2010) The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Mol Biol Rep* **37**: 2493-2507
- Kothari S.L., Kachwaha A.J., Ochoa-Alejo N. (2010) Chili peppers – A review on tissue cultura and transgenesis. *Biotechnology Advances* **28**: 35-48
- Lacau-Danilla A., Laborde L., Legrand S., Huot L., Lemoine Y., Hilbert J.L.,

- Hawkins S., Quillet M.C., Hendriks T., Blervacq A.S. (2010) Identification of novel genes potentially in somatic embryogenesis in chicory (*Cichorium intybus* L.). *BMC Plant Biology* **10**: 122-136
- Liu C.M., Xu Z. y Chua N.-H. (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., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P.Y., Montalvo-Peniche M.C., Barahona-Pérez F., Iglesias-Andreu L.G., Santana-Buzzy N. (2006) Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience* **41**: 1645-1650
- Michniewicz, M., Zago M.K., Abas L., Weijers D., Schweighofer A., Meskiene I., Heisler M.G., Ohno C., Zhang J., Huang F., Schwab R., Weigel D., Meyerowitz E.M., Luschnig C., Offringa R., Friml J. (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**: 1044-1056
- Murashige T., Skoog L. (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* **15**: 473-497
- Palovaara J., Hallberg H., Stasolla C., Luit B., Hakman I. (2010) Expression of a gymnosperm PIN homologous gene correlates with auxin immunolocalization pattern at cotyledon formation and in demarcation of the procambium during *Picea abies* somatic embryo development and in seedling tissues. *Tree Physiology* **30**: 479-489
- Pattison R.J., Catalá C. (2012) Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families. *The Plant Journal* **70**: 585-598

- Ríos A.F., Yoshida S., Weijers D. (2014) Auxin Regulation of Embryo Development. In: Zazimalova E, Petrasek J. y E. Benkova. Auxin and Its Role in Plant Development Transport. Springer pp. 171–189
- Salvo S.A.G.D., Hirsch C.N., Buell C.R., Kaeppler S.M., Kaeppler H.F. (2014) Whole Transcriptome Profiling of Maize during Early Somatic Embryogenesis Reveals Altered Expression of Stress Factors and Embryogenesis-Related Genes. PLoS ONE **9**(10): e111407. doi:10.1371/journal.pone.0111407
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M.C., Zapata-Castillo P.Y. y Solis-Ruiz A. (2005) Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogénesis. HortScience. **40**: 1829-1831
- Schiavone F.M., and Cooke T.J. (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., Kusek M., Tabib Y., Paran I. y Zelcer A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) Regenerants Obtained by Direct Somatic Embryogenesis Fail to Develop a Shoot. In vitro Cellular and Dev Biol Plant **39**: 296-303
- Vanneste S., Friml J. (2009) Auxin: a trigger for change in plant development. Cell **136**: 1005-1016
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C., Friml J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. Development **132**: 4521-31
- Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov I., Dyachok J., Filinova L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture **69**: 233-249