

# Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

# Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS DEL PATRÓN DE LOCALIZACIÓN Y ACUMULACIÓN DEL ÁCIDO 3 INDOL ACÉTICO (AIA) EN LA EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA Y SOMÁTICA DE *Capsicum chinense* Jacq.

Tesis que presenta

# JACOBO PÉREZ PASTRANA

En opción al título de

# DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México 2019

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 del M.C. Jacobo Pérez Pastrana titulado "ANÁLISIS DEL PATRÓN DE LOCALIZACIÓN Y ACUMULACIÓN DEL ÁCIDO 3 INDOL ACÉTICO (AIA) EN LA EMBRIOGENESIS CIGÓTICA Y SOMÁTICA DE Capsicum chinense Jacq." fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea de investigación Morfogénesis y regulación génica del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Ignacio Islas Flores, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelfa de la Peña Seaman Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 5 de febrero de 2019

## 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., 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 dichos Centros 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., en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán 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:

M.C. Jacobo Pérez Pastrana

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Recalcitrancia a la morfogénesis del género *Capsicum*: estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile *in vitro*." Número de proyecto 60170 de Ciencia Básica, CONACYT. Bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Ignacio Islas Flores.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a **CONACYT** por la beca de manutención No. 264523 otorgada para la realización de los estudios de Doctorado.

Al proyecto **CONACYT** de Ciencia básica No. **60170, titulado** "Recalcitrancia a la morfogénesis del género *Capsicum*: estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile *in vitro*" del cual este trabajo forma parte.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por las instalaciones y facilidades otorgadas para la realización de este trabajo. En especial a los laboratorios 09 y 06 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, bajo la dirección respectiva de los Doctores, Nancy Santana Buzzy e Ignacio Islas Flores.

Al **Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)** de Madrid perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Primordialmente al grupo de **"Biotecnología del polen de plantas cultivadas"** del Departamento de Biología Ambiental dirigido por la **Dra. Pilar Sánchez Testillano**, por haberme aceptado para la realización de dos estancias, siendo la primera del 1 de Julio al 31 de Diciembre de 2015, y la segunda del 28 de Agosto al 03 de Noviembre de 2017.

De igual manera, por la aceptación por parte de **CONACYT** a la solicitud de beca para estancia académica en ella **CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS. CSIC, MADRID** ubicada en España, por el periodo del 01 -AGO-17 al 30-NOV-17 derivada de la Convocatoria "**BECAS MIXTAS 2017 MOVILIDAD EN EL EXTRANJERO**" en la que concursé para complementar los estudios de posgrado, mismos que realicé como becario de **CONACYT** en el **CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.**, al amparo del Convenio de Asignación de Beca suscrito el 2014-02-05.

A la **Dra. Nancy Santana Buzzy**, al **Dr. Ignacio Islas Flores** y a la **Dra. Pilar Sánchez Testillano**. Agradezco a cada uno su tiempo, apoyo, paciencia y enseñanza que han hecho posible mi formación como Doctor en filosofía de la Ciencia.

A mis compañeros y amigos de los distintos laboratorios de investigación que me acompañaron haciendo más amena mi estadía.

## DEDICATORIAS

Al Creador, como algún día expresó el italiano Guglielmo Marconi, ganador del Premio Nobel de Física en 1909 e inventor de la radio, "Yo no he hecho más que buscar las leyes de Dios en el libro de la naturaleza".

A mis padres, mi papá el Dr. Agustín Pérez Centeno y mi mamá Sara Pastrana Vivas, como a mi hermano, a mis seres queridos, quienes me han permitido soñar y trazar mi propio camino, gracias por formarme y quererme. Siempre han deseado lo mejor, y comparten mis logros y fracasos.

A mis dos amores, mi esposa Dulce y mi hijo Mateo, que son una constante inspiración y me dan ánimo para seguir avanzando cada día. Gracias por acompañarme y hacer que me enamore.

Una especial dedicatoria a la M. en C. Clara Teresa Monreal Vargas, en paz descanse, por incursionarme y dirigirme en mis primeros pasos hacia el apasiónate mundo de la Ciencia.

"No le temas al fracaso, que no te hará más débil, síno más fuerte" Abraham Lincoln.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	28
RESUMEN	30
ABSTRACT	32
CAPÍTULO I	34
INTRODUCCIÓN	34
1.11 Referencias	54
HIPÓTESIS	62
OBJETIVO GENERAL	62
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	64
CAPÍTULO II	66
CAPÍTULO II Recalcitrance of the genus <i>Capsicum</i> : Patterns of differentiation of somation dependent on the kind of auxin	66 c embryos 66
CAPÍTULO II	66 c embryos 66
CAPÍTULO II	66 embryos 66 67 67 68
CAPÍTULO II Recalcitrance of the genus <i>Capsicum</i> : Patterns of differentiation of somatic dependent on the kind of auxin 2.1 Abstract 2.2 Introduction 2.3 Materials and methods	66 embryos 66 67 67 68 69
CAPÍTULO II Recalcitrance of the genus <i>Capsicum</i> : Patterns of differentiation of somatic dependent on the kind of auxin	66 c embryos 66 67 68 68 69 71
CAPÍTULO II	66 c embryos 66 67 68 69 
CAPÍTULO II	66 c embryos 66 67 68 69 69 

Title: Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (Capsicum chinense
Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-
esterification
3.1 Abstract
3.2 Introduction
3.3 Materials and Methods
3.4 Results
3.5 Discussion
3.6 Conclusion 117
3.7 References 119
Capítulo IV 124
DINÁMICA DE LOCALIZACIÓN DE AUXINA: ELEMENTO ESENCIAL PARA EL
CORRECTO DESARROLLO EMBRIOGÉNICO EN CHILE HABANERO (Capsicum
chinense Jacq.)
4.1 Resumen
4.2 Introducción 125
4.3 Materiales y métodos 127
4.4 Resultados 130
4.5 Discusión
4.5 Discusión

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Área núcleo de la región de origen propuesta para el género
Capsicum (Tomado de Montes-Hernández, 2010) 35
Figura 1.2 Representación botánica de una planta de <i>Capsicum</i> (tomado de Köhler, 1998)
Figura 1.3 Mapa de distribución parental de <i>C. chinense</i> en México (tomado de Montes-Hernandez, 2010)39
Figura 1.4 Formación de embriones somáticos en tejidos de Solanum tuberosum L. A) Estadio globular. B) Estadio corazón. C) Estadio corazón tardío/ torpedo temprano. D) Estadio torpedo (tomado de Seabrook y Douglass, 2001)
Figura 1.5. Patrón de división en los estadios tempranos y medianos de la embriogénesis cigótica en <i>Arabidopsis</i> . Semillas que contienen embriones cigóticos del tipo silvestre ([A] a [J]) en la etapa de una célula [A], en la etapa de dos células [B], en la etapa cuadrante [C], en la etapa octante [D], la etapa dermal [E], etapa globular [F] y [G], etapa triangular [H], etapa corazón [I] y [J], Tamaño de barras: 10 µm, (tomado de Xiang <i>et al.,</i> 2011)
Figure 1.6 Las fitohormonas y su estructura regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de la planta (tomado de Santner <i>et al.,</i> 2009)45
Figura 1.7 Estructura del ácido 3 indol acético, tomada de Wikipedia en inglés46
Figura 1.8 Procesos de desarrollo que están regulados por el flujo de auxina. a) Raíces laterales, b) Embriogénesis, c) Meristemo apical del brote, d) Formación del tejido vascular en hojas, e) La raíz primaria, (tomada de Teale <i>et al.,</i> 2006)
Figura 1.9 Esquematización de la vía de biosíntesis de auxina dependiente

del triptófano. El primer paso es catalizado por proteínas pertenecientes a la

Figura 1.10 Patrones del gradiente de concentración y transporte de auxina durante la embriogénesis cigótica en *Arabidopsis thaliana*. La distribución de la auxina (representado como un gradiente verde) fue inferida a partir de la actividad del promotor sintético sensible a auxina (DR5), y la inmunolocalización del AIA. Las flechas indican el flujo de la auxina y el transportador PIN particular; las líneas punteadas indican la localización específica de transportadores particulares de auxina del tipo celular que no presentan una polaridad evidente. (Tomado de Benková *et al.,* 2003; Petrášek y Friml 2009).

Figure 2.1. Effect of the auxins 2,4-D, Picloram, Dicamba and IAA at concentrations of 2.26, 4.52 and 9.05  $\mu$ M, respectively, on the formation of somatic embryos of *C. chinense* cv Mayan Ba'alche. (A) and *C. annuum* cv California Wonder (B), at 4 weeks of culture in liquid medium......73

Figure 2.6. Somatic embryos of *C. annuum* cv. California Wonder in cotyledonary stage, from medium with Dicamba (2.26  $\mu$ M). (A); Radicle of the

Fig. 3.2 Histology of the ovules during the floral bud development. Observations were carried out at 9 days (A and A'), 8 days (B and B'), 7 days (C and C'), 6 days (D and D'), 5 days (E and E'), 3 days (F and F'), 1 day (G and G') at PreA stage, and at anthesis (H and H'). Tissue sections were of 3 -5 µm thin, stained with toluidine blue, and observed at 40 X and 200 X (these last labeled with apostrophe). Arrows indicate in A the inner epidermis of the ovary wall, in A' they show the three zones of the ovule. In B' indicating the nucellus and the megaspore mother cell (MMC). In C the arrows point to the chalaza and micropyle. In C' indicating the megaspore dyad, endothelium and micropyle channel. In D the arrow highlights the micropyle and in D' the nucellus and the megaspore in tetrad. In E' indicating the fundamental megaspore. In F the arrow shows the endothelium and in F' the nucellus and embryo sac in two nucleated stages. In G arrows indicate the chalaza and embryonic sac, and in G' the embryonic sac at four nucleated stages. In H' the mature embryonic sac, polar nuclei, the egg cell and sinergids are indicated. In the pictures, inner epidermis (in. epi), cell zones (I, II, III), integument (Int), funiculus (Fu), megaspore mother cell (MMC), chalaza (Ch), micropyle (Mi), endothelium (Ent), fundamental megaspore (FM), embryonic sac (ES). The size of the bars inside the images are 40 µm (A, B, C, D, E and F), 20 µm (A', B', C', D', E', F'), 75 µm (G and H), and 30 µm (G' and 

Fig. 3. Immunolocalization during ovule development of highly methylesterified and low-methyl-esterified pectin with Alexa Fluor 488-conjugated JIM7 and JIM5 antibodies. Stages of 9, 8 and 6 days PreA and anthesis were analyzed. After immunoreaction with JIM5 or JIM7 (green signal), the preparations were stained with DAPI to see the nuclei. Figures labeled with apostrophes are a superposition of images for immunoreaction and DAPI staining (blue signal). The size of the bar inside the images is 50 µm....... 101

Fig. 3.4. Development of *Capsicum chinense* Jacq., fruit at different DPA. (A) Maturation progress is shown from left to right. (B–D) Observation of longitudinal and transversal dissections of *Capsicum chinense* fruits.

Fig. 5. Micrographs from *Capsicum chinense* seeds at different stages of development. Testa (Te), integument (Int), endosperm (End), embryo (Emb), chalaza (Ch), hypostases (Hyp), micropyle (Mi), suspensor (Su), endothelium (Ent), cotyledons (Co), shoot apical meristem(SAM), radicle apical meristem (RAM), procambium (Pc) ground meristem (Gm). The size of the bars inside the images are 250  $\mu$ m (A and B), 50  $\mu$ m (A'), 75  $\mu$ m (B'), 450  $\mu$ m (C and D), 20  $\mu$ m (C' and D'), 450  $\mu$ m (E and F), 50  $\mu$ m (E' and F'), and 500  $\mu$ m (G, H and I).

Fig. 3.7. Immunolocalization in embryo at 20 DPA of methyl-esterified and low-methyl-esterified pectin. Samples were processed as described in Fig. 3, and images labeled with apostrophes are a superposition of images for methylated or low-methylated pectin immunoreaction (green) and DAPI staining (blue). The size of the bars is 50  $\mu$ m, except in G and G' where it is 75  $\mu$ m.

Figura 4.1 Localización de la auxina en embriones cigóticos durante la embriogénesis cigótica temprana. IAA immunofluorescencia (verde), DAPI fluorescencia (azul). (A) Semilla en desarrollo, embrión en etapa preglobular, embrión (Emb) rodeado por el tejido del endospermo (End), al endotelio (Ent), la hipostasis (Hyp), el micrópilo (Mi), y tejido de mayor Figura 4.4 Análisis histológico e inmunológico de secciones de tejido en las etapas de corazón, torpedo y cotiledonar del embrión cigótico de *Capsicum* 

chinense Jacq. Tinción con Toluidina de secciones de embrión en etapa de corazón (A) o torpedo (G), o de la etapa corazón (B, C, E), torpedo (H, I) y cotiledonar (K) inmunodetectados con un anticuerpo anti-IAA. Señales sobrelapadas de secciones de embrión de la etapa corazón (D, F), torpedo (J) y cotiledonar (L) teñidas con DAPI e inmunodetectadas con un anticuerpo anti-IAA. Las flechas incidan las zonas de acumulación máxima en los diferentes estados del desarrollo de las secciones del embrión cigótico... 136

Figura 4.7. Explante inicial para la embriogénesis somática de *Capsicum chinense* Jacq., se analiza por microscopía y las características morfohistológicas y de distribución de IAA previo al inicio de la inducción de la embriogénesis somática *in vitro.* (A) plántula germinada *in vitro* 

Figura 4.8. Caracterización histológica e inmunológica del comportamiento intracelular de las auxinas durante la inducción de la embriogénesis somática en explantes de hipocótilo de Capsicum chinense Jacq. Análisis visual de los explantes a los 10, 15 y 30 días (A, E I) e histológico en microscopía de campo claro (B, F, J) o de fluorescencia para el Alexa 488 (C, G, K) y sobrelapamiento de las imágenes generadas con el anti-IAA y la tinción con DAPI (D, H, L). La flecha superior indica las células del cortex, la flecha intermedia se localiza en la zona de alta tasa de división celular que presentan las células del periciclo y la endodermis, la flecha inferior señala a las células de la estela (haces vasculares) (C). La flecha indica la formación de células pequeñas con núcleos grandes (D). La flecha nos muestra las células que presentan una mayor intensidad de señal del anticuerpo anti-IAA siendo células pequeñas un citoplasma denso localizadas en las zonas más expuestas al medio de cultivo (G). La flecha superior indica la capa externa de la estructura globular en donde se aprecia un escaso diferenciación de la protodermis; la flecha intermedia e inferior indican las zonas en donde se concentra la máxima señal del anticuerpo que son las primeras capas de células internas (K). ..... 143

Figura 4.9. Caracterización morfológica e inmunológica de los embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq. en diferentes estadios de desarrollo. Análisis visual de la morfología de los embriones en etapa globular, corazón y torpedo (A, D, G) e inmunolocalización del IAA mediante el anticuerpo anti-IAA acoplado al fluoróforo Alexa-Flour 488 (B, E, H) y sobreexposición de las imágenes producidas por la tinción con DAPI y la señal del anti-IAA (C, F, I) en los embriones somáticos de las tres etapas de desarrollo. La flecha superior muestra la capa interna del embrión globular con células compactas, la flecha inferior señala las células vacuoladas de la capa externa las cuales no presentan diferenciación de la protodermis (B). La flecha superior muestra las áreas de la protodermis que no se han diferenciado, la flecha inferior muestra el área de diferenciación del meristemo apical de raíz (E). La flecha superior indica la capa de células externas, en donde se aprecia un poco diferenciación de la protodermis, la flecha intermedia nos muestra las células de la capa interna en donde se acumula la mayor señal de auxina y la flecha inferior señala las células alargadas en el centro de la capa interna del embrión en estado torpedo (H).

## ABREVIATURAS

- (2,4-D) ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- (AIA) ácido 3 indol acético
- (ANA) ácido 1-naftalenacético
- (AuxRE) sitio de respuesta a auxinas
- (BSA) albúmina de suero bovino
- (Ch) calaza
- (co) cortex
- (Co) cotiledones
- (CONACYT) Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
- (DAPI) 4', 6-diamidino-2-phenylindole
- (DIC) contraste diferencial de interferencia
- (Dicamba) Ácido 3,6-dicloro-O-anísico
- (DPA) días post antesis
- (EC) conductividad electrica
- (EDAC) 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- (Em) emisión
- (Emb) embrión
- (en) endodermis
- (End) endosperm
- (Ent) endotelio
- (ep) epidermis
- (ERDF/FEDER) European Regional Development Fund
- (ES) saco embrionario
- (Ex) excitación
- (FM) célula fundamental de la megaspora
- (Fu) funículo
- (Gm) meristemo fundamental
- (HPLC) cromatografía líquida de alta resolución
- (Hyp) hipostasis

(Int) integumento

- (IPA) ácido indol-3 piruvato
- (LABIOTECA) Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada
- (Mi) micrópilo
- (MMC) célula madre de la megaspora
- (MS) medio Murashige y Skoog
- (PBS) buffer fosfato salino
- (pc) periciclo
- (Pc) procambium
- (Pd) protodermis
- (pH) potencial de hidrogeno
- (Picloram) Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropiridin-2-carboxílico
- (PIN) PIN-FORMED
- (PreA) pre-antesis
- (RAM) meristemo apical de la raíz
- (RAM) meristemo apical de raíz
- (REMIB) Red Mundial de Información de la Biodiversidad
- (RNAs) ácido ribonucleico
- (SAM) meristemo apical del brote
- (st) estela
- (Su) suspensor
- (TAA) triptófano amino-transferasa
- (Te) testa
- (Trp) triptófano

#### RESUMEN

El género Capsicum presenta una severa recalcitrancia a la regeneración in vitro, lo que afecta a la embriogénesis somática de la especie C. chinense. Se plantea la posibilidad de que esto se debe a la dependencia por el 2,4-D durante todo el proceso embriogénico. En este estudio se evaluó la capacidad de las auxinas Dicamba, Picloram y el ácido 3-indol acético (IAA) para inducir y regular la formación de los embriones somáticos, así como su efecto en los cambios generados sobre la morfología en las especies C. annuum y C. chinense. Los resultados mostraron la formación de embriones somáticos en todos los tratamientos evaluados; sin embargo, se observó de manera persistente la morfología anormal del embrión somático, lo que evidencia que la auxina 2,4-D no es directamente responsable de la incapacidad de los embriones de Capsicum para convertirse en plantas. También se pudo apreciar que la morfología del embrión estuvo influenciada por el tipo de auxina usada. Estas observaciones, en conjunto con los fenotipos de los embriones somáticos obtenidos, permiten inferir que las deformaciones pudieran estar asociadas con el balance en la relación exógena-endógena de la auxina durante el desarrollo del embrión somático. En relación a la identificación de los principales estadios histomorfológicos de la ovogénesis, así como de la embriogénesis cigótica de Capsicum chinense, se realizó una caracterización histológica mostrando a los principales estadios celulares que acompañan a las células somáticas hacia la formación de la macrospora, y su transición para el desarrollo del gameto femenino, así como los eventos posteriores a la doble fecundación que desencadenan en los estadios de desarrollo característicos de la embriogénesis cigótica. Además se hizo un análisis comparativo de los eventos histomorfológicos de la embriogénesis cigótica con la somática con respecto al patrón de localización del gradiente máximo de IAA detectado por medio de la técnica de inmunolocalización, así como la cuantificación de la concentración endógena por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En este trabajo se propone que el IAA es crucial para regular los patrones de división y diferenciación celular durante la

embriogénesis cigótica y como se ve alterado en la embriogénesis somática en *Capsicum*. Los resultados obtenidos mostraron que La concentración y distribución de esta hormona en la en los tejidos es dinámica en los eventos morfogénicos que llevan a la diferenciación del embrión cigótico y somático. Estos resultados son novedosos y muy relevantes, para lograr un mayor entendimiento sobre la recalcitrancia del género *Capsicum* a la regeneración *in vitro*.

#### ABSTRACT

The genus *Capsicum* is largely recalcitrant to *in vitro* regeneration; this affects the somatic embryogenesis in C. chinense species. It is thought to be due to 2,4-D dependence during the whole embryogenic process. In this study, the ability of the auxins Dicamba, Picloram and indole 3 acetic acid (IAA) to induce and regulate the formation of somatic embryos was evaluated, as well as their effect on the changes in embryogenic morphology of C. annuum and C. chinense species. The results show formation of somatic embryos in all evaluated treatments; however, the abnormal morphology of the somatic embryo was persistently observed, which shows that auxin 2,4-D is not directly responsible for the fail of *Capsicum* embryos to become in plants. It was evident that the morphology of the embryo was influenced by the type of auxin used. These observations, together with the phenotypes of the somatic embryos obtained, allow inferring that the deformations could be associated with the balance in the exogenous-endogenous auxin during the development of the somatic embryo. A histological characterization was made, in relation to the identification of the main histomorphological stages of ovogenesis, as well as the zygotic embryogenesis of Capsicum chinense. In addition, a comparative analysis of the histomorphological events of zygote embryogenesis with somatic embryogenesis was made with respect to the localization pattern of the maximum gradient of IAA detected by means of the immunolocalization technique, as well as the quantification of the endogenous concentration by the high performance liquid chromatography (HPLC) method. In this work, it is proposed that IAA is crucial to regulate cell division and differentiation patterns during zygotic embryogenesis and how it is altered in somatic embryogenesis in Capsicum. The results obtained showed that the concentration and distribution of this hormone in the tissues is dynamic in the morphogenic events that lead to the differentiation of the zygotic and somatic embryo. These results are novel and very relevant, to achieve a greater understanding of the recalcitrance of the Capsicum genus to in vitro regeneration.

## **CAPÍTULO I**

#### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Las especies del género Capsicum

Las especies del género *Capsicum*, son consideradas como una de las principales hortalizas a nivel mundial y pertenecen a la familia de las Solanáceas. Se han empleado como uno de los principales condimentos en las culturas americanas desde tiempos precolombinos, con un aporte nutricional al ser una fuente rica en vitamina C (Bahorun *et al.*, 2004). No es de sorprender que su riqueza en diversidad sea participe de la gastronomía mexicana. El nombre genérico botánico *"Capsicum"* deriva del griego *"Kapto"* y significa *"morder"* o *"picar"*. En Centroamérica y México se les denomina *"chile"* la cual proviene de la lengua náhuatl *"chilli"* y en Sudamérica se les conoce como *"aji"* derivado de la lengua Arawakan (Basu *et al.*, 2003).

El cultivo de las especies del género *Capsicum* se remonta entre los años 5,200 al 3,400 a.C. Los hallazgos de semillas de chile más antiguas se han dado entre Bolivia y Perú, y por esta razón se estima que su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América (Figura 1.1). A partir de allí el chile se diseminó al resto del continente Americano (Pickersgill, 1997). Su domesticación, empezó hace ~7,000 años y gracias a su aceptación entre los pueblos indígenas, las diferentes especies del género fueron de las primeras plantas domesticadas en América Central. Uno de los mejores ejemplos documentados acerca de la existencia de asentamientos en donde se encontraron chiles secos y semillas de 9,000 años de antigüedad han ocurrido en el valle de Puebla al igual que en Tamaulipas, México. A la llegada de los españoles a México, los aztecas ya habían desarrollado docenas de variedades de chile. Las principales especies cultivadas se originaron en México. Sin embargo, el centro de

origen de *C. frutescens* se encuentra alrededor de las regiones más elevadas del río Amazonas entre Colombia y Perú, y el *C. baccatum* var. *baccatum* está en el sur de Perú y norte de Bolivia (Basu and De, 2003).



# Figura 1.1 Área núcleo de la región de origen propuesta para el género *Capsicum* (Tomado de Montes-Hernández, 2010).

El éxito de la domesticación de las especies del género *Capsicum* se ve reflejado en la amplia gama de variedades que existen en la actualidad; dichas variedades tienen gran diversidad morfológica y organoléptica entre sus frutos. En la actualidad se conocen 26 especies silvestres y 5 especies domesticadas, las últimas son *C. annuum* L., *C. frutescens* Mill., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., y *C. pubescens* R. y P. (Moscone *et al.,* 2006; Nee *et al.,* 2006).

Como parte de las características de los frutos se ha detectado que estos contienen numerosos compuestos de interés, como lo son aceites volátiles, aceites grasos, capsaicinoides, carotenoides, vitaminas, proteínas, fibras y elementos minerales (Conforti *et al.*, 2007). Dichos compuestos se han empleado en la elaboración de conservas, cosméticos, productos farmacéuticos y nutracéuticos (Reilly *et al.*, 2001). Los dos compuestos químicos más importantes son los carotenoides y capsaicinoides. La coloración de los frutos se debe a los pigmentos licopercisina, xantofila y caroteno, y la característica de pungencia o

picor lo proporcionan alcaloides denominados capsaicinoides (Hornero-Méndez *et al.,* 2002; Pérez-Gálvez *et al.,* 2007). Algunas de sus propiedades se emplean en la medicina tradicional para remediar el efecto del asma, de la tos, irritación de garganta y otros desórdenes respiratorios (Andrews, 1995).

Datos de la FAO indican que los principales países productores de *Capsicum* sp., son China, México, Turquía, India, Nigeria, Indonesia (FAOSTAT, 2011). En México se producen aproximadamente unas 50 variedades de chile; entre las que más se cultivan están el chile jalapeño, serrano, poblano, pimiento morrón, habanero, chile ancho, guajillo y de árbol. También se destaca que la región de la Península de Yucatán es la principal productora de chile habanero (*Capsicum chinense*) y que actualmente cuenta con la denominación de origen de esta especie.

#### 1.2 Cultivo de chile habanero

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), es uno de los principales cultivos de la agricultura de la Península de Yucatán en México y es considerado uno de los chiles que cuentan con una pungencia elevada. Su centro de origen se localiza en el Amazonas (DeWitt y Bosland, 1993). Gracias a la adaptación del cultivo, a la gran diversidad morfológica de la especie existente en la península de Yucatán, y a las particulares cualidades organolépticas de sus frutos, se le otorgó a la Península de Yucatán la denominación de origen de la especie *C. chinense*. Declaratoria General de Protección de la Denominación de Origen "Chile Habanero de la Península de Yucatán", publicada en el Diario Oficial de la Federación el 4 de junio de 2010 (NOM-189-SCFI-2012). El mercado mundial distingue al Chile Habanero que se produce en la Península de Yucatán. Generalmente, su fruto se comercializa en fresco para consumo directo, como materia prima para uso industrial y para la elaboración de productos terminados.

1.3 Clasificación taxonómica

La taxonomía del género Capsicum, la ubica dentro de la familia Solanaceae, que comprende aproximadamente 98 géneros. Dentro de esta familia podemos encontrar especies alimenticias importantes como la papa (Solanum tuberosum), el tomate (Solanum lycopersicum), la berenjena (Solanum melongena) y los chiles, ajíes o pimientos (Capsicum), como también a los géneros Acnistus, Athenea, Brachistus, Vassovia, Withania y Witheringia, que en algún momento se clasificaron dentro del género Capsicum (Hunziker, 2001; Knapp, 2002). Tanto el género Capsicum como el género Lycianthes pertenecen a la tribu Capsiceae (Olmstead et al., 2008). Actualmente se reconocen 31 especies en el género (Moscone et al. 2006), la mayoría de ellas presentan un juego Capsicum cromosómico haploide n=12 (Moscone et al., 2006; Pozzobon et al., 2006; Tong y Bosland, 2003). La delimitación taxonómica entre C. chinense y C. frutescens es difícil, debido a la gran variabilidad existente en las formas cultivadas, las características compartidas como especie y a los distintos criterios empleados para su clasificación (Baral y Bosland, 2004).

La planta de chile es anual, con tallos erectos, herbáceos y ramificados de color verde oscuro. Su sistema radicular llega a profundidades de 0.7 a 1.2 m, y lateralmente hasta 1.2 m. La planta alcanza una altura promedio de 60 cm, las hojas son planas, simples y de forma ovoide alargada, las flores son perfectas (hermafroditas), formándose en las axilas de las ramas; son de color blanco o púrpura, el fruto en algunas variedades se hace curvo cuando se acerca a la madurez. La primera clasificación de la especie *Capsicum chinense* fue realizada por Smith y Heiser (1957) nombrándola *C. sinense*, quienes la describieron como un arbusto pequeño que alcanza hasta 1.5 m de alto, las hojas como los tallos pueden ser de glabros a pubescentes. Poseen dos a más flores por nudo, en la etapa de la antesis las flores cuelgan y raramente son erectas; el cáliz del fruto maduro carece de dientes y presenta una marcada constricción anular en la base. En las clasificaciones actuales podemos encontrar especies con el margen del cáliz entero, medio o dentado. La corola o conjunto de pétalos de la flor puede
presentar una tonalidad blanca-verdosa o verde-amarillenta; no presenta manchas difusas en la base de los pétalos, los pétalos usualmente tienen una posición recta dentro de la corola. El color de las anteras varía de color azul a violeta, raramente amarillas; con una posición de los frutos en forma colgante, con un pericarpio firme, de colores naranja, amarillo, amarillo-limón, café, púrpura amarronado, blanco-anaranjado, crema, rojo, melocotón; con una gran variabilidad en su forma pues pueden ser triangulares, acampanados, cuadrados, con variaciones en la forma del ápice. Las semillas de la especie son de color crema a amarillo (Figura 1.2).



Figura 1.2 Representación botánica de una planta de *Capsicum* (tomado de Köhler, 1998).

El mapa de la República mexicana que muestra la distribución de *C. chinens*e (Figura 1.3) está basado en información de las bases de datos del Sistema Nacional de Información de la Biodiversidad y la Red Mundial de Información de la

Biodiversidad (REMIB). La adaptación de la especie a regiones tropicales permite que *C. chinense* se cultive en México, América Central, la región del Amazonas y en el sur de Brasil (Aragón, 2003). No obstante a la excelente adaptación de *C. chinense* al clima de la península de Yucatán, esta especie no es endémica de México y actualmente se pueden encontrar materiales silvestres en Perú, Ecuador y Brasil (Pickersgill, 1997).



# Figura 1.3 Mapa de distribución parental de *C. chinense* en México (tomado de Montes-Hernandez, 2010).

# 1.4 Mejoramiento genético de *Capsicum*

La diversidad de especies de *Capsicum* en México y América Central representa un gran potencial como recurso fitogenético, lo cual es esencial para el mejoramiento genético tanto convencional como asistido por herramientas biotecnológicas. La generación de líneas puras con resistencia múltiple a las principales enfermedades y que cuenten con una buena adaptación a las condiciones climatológicas de siembra y una buena calidad del fruto, es un área de alta prioridad. El mejoramiento genético puede dar origen a plantas resistentes a herbicidas, a plagas y enfermedades, a condiciones de estrés abiótico, así como al mejoramiento de las propiedades organolépticas y nutritivas (Falk et al., 2002). En el mejoramiento genético de las variedades es también muy útil el cultivo de microesporas para la obtención de doble haploides (Heidari-Zefreh et al., 2018). La aplicación de técnicas biotecnológicas no solo permitirá el mejoramiento de los cultivos de interés de una manera rápida y precisa, sino también realizar la investigación enfocada en la comprensión de los diferentes procesos fisiológicos que acompañan el desarrollo de las plantas. No obstante, muchas de las ventajas que ofrece la biotecnología no son fáciles de aplicar a la gran mayoría de las especies del género Capsicum sp., debido a la severa recalcitrancia que presentan a los distintos métodos de regeneración in vitro (Kothari et al., 2010). Esta recalcitrancia morfogénica in vitro se ha evidenciado principalmente en un desarrollo anormal, como lo es la formación de brotes en forma de roseta, falta de delimitación del meristemo apical del brote en los embriones somáticos, o en una dependencia genotípica específica de los protocolos establecidos (Ochoa-Alejo, 2016). De manera conjunta, lo problemas en el desarrollo in vitro limitan los beneficios que se pudieran obtener en el corto plazo. El entender las causas que provocan esta recalcitrancia es uno de los principales retos para encontrar soluciones que permitan el adecuado desarrollo de los procesos morfológicos en la regeneración in vitro de Capsicum sp.

#### 1.5 Embriogénesis somática en el género Capsicum

Las investigaciones enfocadas en la inducción de la embriogénesis somática en el género *Capsicum* se han realizado principalmente en variedades de la especie *C. annuum* L. (Bárány *et al.,* 2005; Binzel *et al.,* 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Lakshmi Sita, 1993; Khan *et al.,* 2006; Kim *et al.,* 2008; Koleva-Gudeva *et al.,* 2007; Steinitz *et al.,* 2003; Supena *et al.,* 2006). No obstante, también existen estudios en la especie *C. chinense* Jacq., (Avilés-Viñas *et al.,* 2012; López-Puc *et al.,* 2006; Santana-Buzzy *et al.,* 2009; Zapata-Castillo *et al.,* 2007). El primer reporte de embriogénesis somática realizado en la especie *C. chinense* Jacq., fue

realizado por Lopéz-Puc *et al.* (2006). Estos autores establecieron un el proceso de embriogénesis somática directa, sin la necesidad de partir de callo, al utilizar hipocótilo como explante; con esta metodología se buscó una mayor estabilidad genética en los embriones somáticos respecto a la de los embriones obtenidos por embriogénesis indirecta. Es de resaltar que en algunos protocolos los embriones somáticos se inducen a partir de embriones cigóticos inmaduros como explantes, y estos provienen de una polinización cruzada, por tal razón, es necesario valorar tanto el fenotipo como el genotipo de los embriogénesis somática en la agricultura son diversos, tal es el caso de la propagación clonal o la micropropagación, la generación de semilla sintética, el mejoramiento de los cultivos, la selección celular, el rescate de embriones, la transformación, la hibridación somática, la producción de líneas homocigóticas, la producción de metabolitos, la eliminación de enfermedades y la preservación del germoplasma.

La embriogénesis somática se define como el proceso que da lugar a la formación de estructuras bipolares y que durante la diferenciación se desarrolla el meristemo apical del brote localizado en un extremo de los polos, y el meristemo radicular en el polo opuesto, indicando que su conversión a plántula puede ser obtenida en un solo paso (Figura 1.4). La serie de cambios morfogénicos que llevan al establecimiento de la embriogénesis somática inician en células somáticas, las cuales se desdiferencían y reprograman genéticamente para dar inicio al crecimiento de los tejidos y órganos que darán origen a una nueva planta (Yang y Zhang, 2010).



Figura 1.4 Formación de embriones somáticos en tejidos de Solanum tuberosum L. A) Estadio globular. B) Estadio corazón. C) Estadio corazón tardío/ torpedo temprano. D) Estadio torpedo (tomado de Seabrook y Douglass, 2001).

#### 1.6 Embriogénesis cigótica

La embriogénesis cigótica (Figura 1.5) es el proceso genético-morfo-celular que se desencadena a partir de una fusión de gametos durante la fecundación, resultando en una célula cigoto que da inicio a una planta. El patrón de división del cigoto es específico para cada especie y esto permite la generación de todos los órganos necesarios para su crecimiento y desarrollo hasta transformarse en un embrión maduro. Los patrones de división celular generados durante la embriogénesis indican la existencia de una especialización celular, característica idónea para estudiar los mecanismos que determinan los patrones de formación del nuevo individuo (Möller y Weijers, 2009). No obstante, el patrón de división celular que da origen a la forma final del embrión puede variar drásticamente entre especies (Johri *et al.*, 2013). Entre las principales características que va a presentar el

embrión durante su formación es la simetría bilateral, la presencia de un eje apical, que es el nicho de la formación del meristemo apical del brote (SAM), y el eje basal, que es el lugar en el que se forma el meristemo apical de la raíz (RAM) (De Smet *et al.,* 2010).



Figura 1.5. Patrón de división en los estadios tempranos y medianos de la embriogénesis cigótica en *Arabidopsis*. Semillas que contienen embriones cigóticos del tipo silvestre ([A] a [J]) en la etapa de una célula [A], en la etapa de dos células [B], en la etapa cuadrante [C], en la etapa octante [D], la etapa dermal [E], etapa globular [F] y [G], etapa triangular [H], etapa corazón [I] y [J], Tamaño de barras: 10 µm, (tomado de Xiang *et al.*, 2011).

# 1.7 Inducción de la ES

En los protocolos de embriogénesis somática es común aplicar un estímulo auxínico durante la primera fase del proceso, conocido como inducción; la auxina que más frecuentemente se utiliza es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), seguido por el ácido 1-naftalenacético (ANA). Ambas auxinas son ampliamente utilizadas tanto en la agricultura como en estudios biológicos *in vivo* e *in vitro* (Falk

*et al.,* 2002). Es interesante que la aplicación exógena de cada tipo de auxina conduzca a un rango de fenómenos distintos, pero en parte superpuestos (Normanly *et al.,* 2010). Se cree que tal característica está determinada por las propiedades específicas o estructurales de cada tipo de auxina, las cuales les confiere diferencias en la permeabilidad, transporte y estabilidad metabólica (Tanaka *et al.,* 2006).

La adición de 2,4-D exógeno al tejido vegetal desencadena un incremento en los niveles de auxina endógena (Michalczuk *et al.,* 1992). Este fenómeno está íntimamente relacionado con la adquisición de competencia celular hacia la vía embriogénica. Las células que adquieren esta capacidad se caracterizan por incrementar de manera significativa su contenido de ácido 3 indol acético (AIA), la principal auxina endógena.

1.8 El ácido 3 indol acético (AIA)

Las plantas presentan una pared celular rígida, por tal motivo sus células son estáticas y dependen de señales móviles que les permitan percibir y responder tanto a las fluctuaciones del ambiente, como a las involucradas en el desarrollo de la planta. Estas funciones la realizan pequeñas moléculas inductoras de morfogénesis, dentro de las cuales se encuentran las fitohormonas (Figura 1.6). Las múltiples interacciones de estas moléculas-señal van a regular la morfogénesis de la planta (Davies, 2010; Vert *et al.,* 2008), con la finalidad de que sobreviva a los constantes cambios y se adapte a ambientes adversos, mediante el moldeo de su forma y la optimización de su metabolismo (Tanaka *et al.,* 2006).





El regulador de crecimiento vegetal más estudiado es la auxina AIA; su nombre proviene del griego "auxein" que significa crecer (Spaepen and Vanderleyden, 2011). El AIA es una pequeña molécula móvil (Figura 1.7) y su importancia se debe a su participación y regulación de los procesos de crecimiento, división y diferenciación celular (Geldner *et al.*, 2000; Halperin, 1995; Harada, 1999; Petrášek y Friml, 2009). Esta molécula actúa en pequeñas concentraciones y está involucrada en la mayoría de los procesos morfogénicos de la planta (Figura 1.8).



Figura 1.7 Estructura del ácido 3 indol acético, tomada de Wikipedia en inglés.

Durante el desarrollo post embriogénico, la aplicación localizada de la auxina es suficiente para desencadenar la formación de hojas o flores en los meristemos (Braybrook y Kuhlemeier, 2010; Reinhardt *et al.*, 2000), o la inducción de raíces laterales (Himanen *et al.*, 2002). Dichos eventos sugieren que las auxinas desempeñan un papel importante en la formación de órganos. También se ha observado que los sitios de iniciación de primordios de órganos tanto de raíces como brotes presentan un incremento localizado de los niveles de auxina (Benková *et al.*, 2003), lo que indica que la regulación de su biosíntesis es importante para el crecimiento y desarrollo.

El mecanismo de acción involucra la síntesis, el transporte, así como su conjugación y degradación, lo que permite la presencia de zonas específicas de localización que se relacionan en los tejidos vegetales, con zonas de acumulación máxima conocidos como gradientes, para desencadenar o mantener las respuestas del desarrollo (Tanaka *et al.,* 2006).



Figura 1.8 Procesos de desarrollo que están regulados por el flujo de auxina. a) Raíces laterales, b) Embriogénesis, c) Meristemo apical del brote, d) Formación del tejido vascular en hojas, e) La raíz primaria, (tomada de Teale *et al.,* 2006).

Esta fitohormona se puede sintetizar en primordios del brote (Liu *et al.,* 1993), sin embargo, las plantas superiores no son las únicas con la capacidad de biosíntesis; las bacterias, los hongos y las algas también pueden sintetizarla (Lee *et al.,* 2004). En las plantas se propone que la vía del indol-3 piruvato (IPA) es la principal ruta de biosíntesis del AIA. Esta ruta de biosíntesis se deriva del triptófano (Trp). El Trp se convierte primero a IPA por medio de la enzima triptófano amino-transferasa (TAA), y posteriormente el AIA es producido a partir del IPA mediante la enzima flavín-monooxigenasa de la familia YUCCA, toma su nombre de la mutante

YUCCA, la cual a su vez se denomina así por mostrar un fenotipo parecido a la planta yuca, con las hojas maduras curvadas hacia abajo y mostrando un hábito de crecimiento semi-erecto(Kendrew, 2001). Estos dos sencillos pasos (Figura 1.9) convierten al Trp en IAA y la constituyen como la principal vía de biosíntesis de auxina en las plantas (Zhao, 2012). No obstante, también se han propuesto distintas vías de síntesis de auxina, tanto dependientes como independientes del Trp, (Normanly *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2006; Woodward y Bartel, 2005).



Figura 1.9 Esquematización de la vía de biosíntesis de auxina dependiente del triptófano. El primer paso es catalizado por proteínas pertenecientes a la familia de las TAAs que transfieren el grupo amino del Trp a un alfa cetoácido como el piruvato para generar IPA y otros aminoácidos. El segundo paso es una oxigenación dependiente de NADPH y catalizada por la flavin monooxigenasa YUC, (tomado de Zhao 2012).

#### 1.9 Transporte polar de la auxina (AIA)

El transporte polar de la auxina es el mecanismo por el cual se mueve esta molécula y ocurre de célula a célula, éste mediado por proteínas que actúan como transportadores de entrada y salida, dada su localización subcelular que dirige el flujo de la auxina. Los transportadores de salida de la PIN-FORMED (PIN) cambian en respuesta a diversas señales, canalizando de forma regulada el flujo de la auxina y esto resulta en un crecimiento organizado. La auxina por si sola modula la expresión y la localización subcelular de las proteínas PIN, contribuyendo con un complejo patrón de regulación por retroalimentación (Tanaka et al., 2006). Los estudios encaminados específicamente a la determinación de la distribución del AIA durante los procesos embriogénicos revelan que existe un cambio dinámico de esta hormona durante los pasos clave de desarrollo, tal es el caso de las etapas de transición entre los estadios preglobular, globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Figura 1.10) (Friml et al., 2003). Los gradientes formados como parte del transporte de la auxina también representan una característica común para la formación de los órganos de las plantas, independientemente de la morfología que presentarán al madurar o su origen (Benková et al., 2003). Las proteínas PIN1, PIN4 y PIN7 son las que están involucradas en el transporte de salida de la auxina durante la embriogénesis cigótica. Las proteínas PIN aunque son estables, no permanecen todo el tiempo en la membrana plasmática; pasan por un proceso de recirculación en un compartimiento endosómico por medio de vesículas endocíticas, y nuevamente son recicladas a la membrana plasmática (Robert et al., 2008). La polaridad celular de la localización de las proteínas PIN se correlaciona con la dirección del flujo de la auxina (Friml et al., 2003). Debido a esto, se acepta que las proteínas PIN participan en procesos de desarrollo, e.g. PIN1 desarrollo del tejido vascular y de las flores; PIN2 y PIN3 en tropismos y PIN4 en la adquisición de los patrones de raíz (Friml et al., 2002a; Friml et al., 2002b; Gälweiler et al., 1998; Müller et al., 1998). Por lo tanto, la acción combinada de la expresión diferencial y la

localización de las proteínas PIN da como resultado la formación de los gradientes de auxina (Friml *et al.,* 2003). Las diferentes investigaciones indican que durante el desarrollo de la planta el direccionamiento del flujo de la auxina y sus sitios de acumulación juegan un papel fundamental en los diferentes procesos de diferenciación celular (Friml *et al.,* 2002b).



Figura 1.10 Patrones del gradiente de concentración y transporte de auxina durante la embriogénesis cigótica en *Arabidopsis thaliana*. La distribución de la auxina (representado como un gradiente verde) fue inferida a partir de la actividad del promotor sintético sensible a auxina (DR5), y la inmunolocalización del AIA. Las flechas indican el flujo de la auxina y el transportador PIN particular; las líneas punteadas indican la localización específica de transportadores particulares de auxina del tipo celular que no presentan una polaridad evidente. (Tomado de Benková *et al.,* 2003; Petrášek y Friml 2009).

1.10 Detección de auxina y sus gradientes de acumulación.

La determinación y establecimiento de las concentraciones máximas de auxinas así como su localización celular se han desarrollado diversas metodologías que incluyen desde herramientas bioquímicas hasta moleculares (Chen *et al.*, 2013). Las técnicas bioquímicas estándar son capaces de cuantificar la auxina a partir de los extractos celulares (Chen *et al.*, 2013), pero la necesidad de determinar a nivel celular la concentración o acumulación de la auxina ha llevado al desarrollo de técnicas alternativas como la inmunolocalización de muestras ultra finas generadas en el criostato (Hellgren *et al.*, 2004); (Schlicht *et al.*, 2006) o a la utilización molecular de un sistema reportero llamado DR5 que es sensible a la concentración de auxina.

La identificación del sitio celular donde ocurre la máxima acumulación de auxina son localizados en una o un grupo de células, por lo que es muy difícil su ubicación con técnicas bioquímicas estándar que utilizan el extracto del tejido u órgano completo. La necesidad de obtener una resolución celular en la cuantificación de la concentración de la auxina ha permitido el desarrollo de técnicas alternativas entre ellas la inmunolocalización, la utilización de muestras ultra finas generadas en el criostato y el uso de un sistema reportero sensible a la auxina (Mathesius et al., 2000; Ulmasov et al., 1997). El uso del promotor sintético DR5 ha sido una herramienta útil para el monitoreo de la respuesta de la auxina en los diferentes procesos fisiológicos de la planta (Ulmasov et al., 1997). Los patrones de actividad de DR5 reflejan los patrones de acumulación de la auxina, por lo tanto, se puede inferir la dinámica del gradiente de ésta. Diversos trabajos han mostrado que la actividad de este reportero se puede correlacionar con el contenido de auxina en raíces (Casimiro et al., 2001), aunque su actividad no siempre refleja los niveles de la auxina debido a su propio umbral de sensibilidad y saturación con dicha fitohormona (Friml et al., 2003).

El reportero DR5 es una construcción molecular sintética altamente activa en respuesta a auxinas y que se generó mediante mutaciones sitio-dirigidas a partir del sitio de respuesta a auxinas (AuxRE) localizado en el promotor del gen

Gretchen Hagen 3 (GH3) de soja (Hagen *et al.,* 1991). Tales mutaciones incluyeron modificaciones en tándem en los 11 pares de nucleótidos que alberga al elemento sensible a auxina TGTCTC (Ulmasov *et al.,* 1997), aunque también se ha visto que los brasinoesteroides pueden activarlo (Nakamura *et al.,* 2003).

La inmunolocalización del AIA mediante anticuerpos monoclonales específicos permite la visualización de la auxina a nivel intra o extracelular, una diferencia fundamental con los promotores sensibles a esta fitohormona y que solo indican la actividad de la auxina. La utilización de anticuerpos contra AIA es muy útil en el análisis de la acumulación de auxina a nivel celular-tisular durante los procesos de desarrollo (Forestan *et al.,* 2010; Krouk *et al.,* 2010; Rodríguez-Sanz *et al.,* 2014).

Los gradientes de concentración de auxina causa un crecimiento diferencial en la planta y los anticuerpos anti-IAA son útiles como método de detección de los complejos cambios espacio-temporal que ocurren durante el desarrollo de la planta, principalmente si esta es requerida durante el desarrollo temprano para establecer el eje bilateral del embrión en desarrollo (Hadfi et al., 1998). Esta técnica se ha empleado exitosamente para observar la distribución y movilización del IAA en las células de embriones somáticos en Coffea canephora (Márquez-López et al., 2018) y la dinámica de la concentración de la auxina y su localización celular durante la embriogénesis de microsporas en Brassica napus (Rodríguez-Sanz et al., 2015). Tales estudios no se han realizado durante la embriogénesis cigótica ni somática de Capsicum chinense, por lo tanto, tales análisis contribuye a entender de las bases celulares que determinan la recalcitrancia a la embriogénesis somática en esta especie. En el presente trabajo se determinó si el patrón de localización y cuantificación de la auxina AIA es el mismo durante la ontogénesis de la embriogénesis cigótica comparándolo con la embriogénesis somática de Capsicum chinense Jacq. Para lo cual se emplearon principalmente dos técnicas para la cuantificación y localización del AIA, la cromatografía líquida de alta definición (HPLC por sus siglas en inglés de High performance liquid chromatography) (Nakurte et al., 2012) y la inmunohistoquímica para observar la

acumulación del AIA en el tejido (Rodríguez-Sanz *et al.,* 2015). Para el proceso embriogénico de *Capsicum chinense* Jacq., se tomó como base el protocolo de Aviles-Viñas *et al.* (2012). Este trabajo analizó la dinámica de localización de la auxina durante el desarrollo de embriones somáticos en el género *Capsicum* comparándolo con el patrón que se presenta en la ontogenia de los embriones cigóticos. Se identificó que el transporte polar juega un papel fundamental y que este se ve alterado durante el desarrollo de los embriones somáticos.

## 1.11 Referencias

- Andrews J (1995) Peppers: the domesticated *Capsicums*. University of Texas Press
- Aragón LH (2003) Factibilidades agrícolas y forestales en la República Mexicana. Trillas, México
- Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A & Aruoma OI (2004) Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture 84(12):1553-1561 doi:doi:10.1002/jsfa.1820
- Baral JB & Bosland PW (2004) Unraveling the species dilemma in Capsicum frutescens and C. chinense (Solanaceae): a multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. Journal of the American Society for Horticultural Science 129(6):826-832
- Bárány I, González-Melendi P, Fadón B, Mitykó J, Risueño MC & Testillano PS (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. Biology of the Cell 97(9):709-722 doi:10.1042/BC20040142
- Basu SK & De AK (2003) *Capsicum*: historical and botanical perspectives. *Capsicum*: the genus *Capsicum* 33:1-15
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G & Friml J (2003) Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. Cell 115(5):591-602 doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3
- Binzel ML, Sankhla N, Joshi S & Sankhla D (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 15(7):536-540 doi:10.1007/BF00232989
- Braybrook SA & Kuhlemeier C (2010) How a Plant Builds Leaves. The Plant Cell 22(4):1006-1018 doi:10.1105/tpc.110.073924
- Buyukalaca S & Mavituna F (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tiss Organ Cult 46(3):227-235 doi:10.1007/BF02307099
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ & Bennett M (2001) Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. The Plant Cell 13(4):843-852 doi:10.1105/tpc.13.4.843
- Conforti F, Statti GA & Menichini F (2007) Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. acuminatum L.) in relation to maturity stage. Food Chemistry 102(4):1096-1104
- Chen Y, Yordanov YS, Ma C, Strauss S & Busov VB (2013) DR5 as a reporter system to study auxin response in Populus. Plant Cell Reports 32(3):453-463 doi:10.1007/s00299-012-1378-x
- Davies PJ (2010) The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In: Davies PJ (ed) Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Springer Netherlands, Dordrecht, p 1-15

De Smet I, Lau S, Mayer U & Jürgens G (2010) Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. The Plant Journal 61(6):959-970 doi:doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04143.x

DeWitt D & Bosland PW (1993) The pepper garden. Ten Speed Press

Falk MC, Chassy BM, Harlander SK, Hoban IV TJ, McGloughlin MN & Akhlaghi AR (2002) Food biotechnology: benefits and concerns. The Journal of nutrition 132(6):1384-1390

FAOSTAT. 2011/2012. Modulo producción,

https://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

- Forestan C, Meda S & Varotto S (2010) ZmPIN1-Mediated Auxin Transport Is Related to Cellular Differentiation during Maize Embryogenesis and Endosperm Development. Plant Physiology 152(3):1373-1390 doi:10.1104/pp.109.150193
- Friml J, Benková E, Blilou I, Wisniewska J, Hamann T, Ljung K, Woody S, Sandberg G, Scheres B, Jürgens G & Palme K (2002a) AtPIN4 Mediates Sink-Driven Auxin Gradients and Root Patterning in Arabidopsis. Cell 108(5):661-673 doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00656-6
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R & Jurgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apicalbasal axis of Arabidopsis. Nature 426(6963):147-153 doi:http://www.nature.com/nature/journal/v426/n6963/suppinfo/nature02085 \_S1.html
- Friml J, Wiśniewska J, Benková E, Mendgen K & Palme K (2002b) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. Nature 415:806 doi:10.1038/415806a
- 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(5397):2226-2230 doi:10.1126/science.282.5397.2226
- Geldner N, Hamann T & Jürgens G (2000) Is there a role for auxin in early embryogenesis? Plant Growth Regulation 32(2):187-191 doi:10.1023/a:1010765914644
- Hadfi K, Speth V & Neuhaus G (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. Development 125(5):879-887
- Hagen G, Martin G, Li Y & Guilfoyle TJ (1991) Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology 17(3):567-579 doi:10.1007/bf00040658
- Halperin W (1995) In vitro embryogenesis: some historical issues and unresolved problems In vitro embryogenesis in plants. Springer, p 1-16
- Harada JJ (1999) Signaling in plant embryogenesis. Current Opinion in Plant Biology 2(1):23-27 doi:https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80005-3
- Harini I & Lakshmi Sita G (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). Plant Science 89(1):107-112 doi:10.1016/0168-9452(93)90176-Z

- Heidari-Zefreh AA, Shariatpanahi ME, Mousavi A & Kalatejari S (2018) Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using putrescine and ascorbic acid. Protoplasma doi:10.1007/s00709-018-1268-3
- Hellgren JM, Olofsson K & Sundberg B (2004) Patterns of Auxin Distribution during Gravitational Induction of Reaction Wood in Poplar and Pine. Plant Physiology 135(1):212-220 doi:10.1104/pp.104.038927
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D & Beeckman T (2002) Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. The Plant Cell 14(10):2339-2351 doi:10.1105/tpc.004960
- Hornero-Méndez D, Costa-García J & Mínguez-Mosquera MI (2002) Characterization of carotenoid high-producing Capsicum annuum cultivars selected for paprika production. Journal of agricultural and food chemistry 50(20):5711-5716
- Hunziker A (2001) The genera of Solanaceae. ARG Gantner et Verlag. KG, Germany:232–244
- Johri BM, Ambegaokar KB & Srivastava PS (2013) Comparative embryology of angiosperms, vol 1. Springer Science & Business Media
- Kendrew SG (2001) YUCCA: a flavin monooxygenase in auxin biosynthesis. Trends in Biochemical Sciences 26(4):218 doi:https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01814-X
- Khan H, Siddique I & Anis M (2006) Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. Biol Plant 50(4):789-792 doi:10.1007/s10535-006-0133-y
- Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M & Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports 27(3):425-434 doi:10.1007/s00299-007-0442-4
- Knapp S (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. Journal of Experimental Botany 53(377):2001-2022
   Köhler HA (1998) Köhler's medizinal pflanzen.
- Koleva-Gudeva LR, Spasenoski M & Trajkova F (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae 111(2):114-119 doi:10.1016/j.scienta.2006.10.013
- Kothari SL, Joshi A, Kachhwaha S & Ochoa-Alejo N (2010) Chilli peppers A review on tissue culture and transgenesis. Biotechnology Advances 28(1):35-48 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.08.005
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P & Gojon A (2010) Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. Developmental Cell 18(6):927-937 doi:https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008
- Lee S, Flores-Encarnacion M, Contreras-Zentella M, Garcia-Flores L, Escamilla J & Kennedy C (2004) Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in

Gluconacetobacter diazotrophicus strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. Journal of Bacteriology 186(16):5384-5391

- Liu C, Xu Z & Chua NH (1993) Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. The Plant Cell 5(6):621-630 doi:10.1105/tpc.5.6.621
- Márquez-López RÉ, Pérez-Hernández C, Ku-González Á, Galaz-Ávalos RM & Loyola-Vargas VM (2018) Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in Coffea canephora. Protoplasma 255(2):695-708 doi:10.1007/s00709-017-1181-1
- Mathesius U, Weinman JJ, Rolfe BG & Djordjevic MA (2000) Rhizobia Can Induce Nodules in White Clover by "Hijacking" Mature Cortical Cells Activated During Lateral Root Development. Molecular Plant-Microbe Interactions 13(2):170-182 doi:10.1094/MPMI.2000.13.2.170
- Michalczuk L, Cooke TJ & Cohen JD (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry 31(4):1097-1103 doi:10.1016/0031-9422(92)80241-6
- Möller B & Weijers D (2009) Auxin Control of Embryo Patterning. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1(5) doi:10.1101/cshperspect.a001545
- Montes Hernandez S (2010) Recopilacion y análisis de información existentes de las especies del género Capsicum que crecen y se cultivan en México. Bajío: INIFAP
- Montes Hernández S (2010) Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género Capsicum que crecen y se cultivan en México. Campo experimental Bajío, INIFAP:86
- Moscone EA, Scaldaferro MA, Grabiele M, Cecchini NM, Sánchez García Y, Jarret R, Daviña JR, Ducasse DA, Barboza GE & Ehrendorfer F The evolution of chili peppers (Capsicum-Solanaceae): a cytogenetic perspective. In: VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity 745, 2006. p 137-170
- 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. The EMBO Journal 17(23):6903-6911 doi:10.1093/emboj/17.23.6903
- Nakamura A, Higuchi K, Goda H, Fujiwara MT, Sawa S, Koshiba T, Shimada Y & Yoshida S (2003) Brassinolide Induces IAA5, IAA19, and DR5, a Synthetic Auxin Response Element in Arabidopsis, Implying a Cross Talk Point of Brassinosteroid and Auxin Signaling. Plant Physiology 133(4):1843-1853 doi:10.1104/pp.103.030031
- Nakurte I, Keisa A & Rostoks N (2012) Development and Validation of a Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Indole-3-Acetic Acid, Indole-3-Pyruvic Acid, and Abscisic Acid in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Analytical Methods in Chemistry 2012:103575 doi:10.1155/2012/103575

- Nee M, Bohs L & Knapp S (2006) New species of Solanum and Capsicum (Solanaceae) from Bolivia, with clarification of nomenclature in some Bolivian Solanum. Brittonia 58(4):322-356
- Normanly J, Slovin JP & Cohen JD (2010) Auxin Biosynthesis and Metabolism. In: Davies PJ (ed) Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! Springer Netherlands, Dordrecht, p 36-62
- Ochoa-Alejo N (2016) Somatic Embryogenesis in *Capsicum* spp. In: Loyola-Vargas MV & Ochoa-Alejo N (eds) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer International Publishing, Cham, p 233-240
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF & Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. Taxon 57(4):1159-1181
- Pérez-Gálvez A, Martin HD, Sies H & Stahl W (2007) Incorporation of carotenoids from paprika oleoresin into human chylomicrons. British Journal of Nutrition 89(6):787-793 doi:10.1079/BJN2003842
- Petrášek J & Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. Development 136(16):2675-2688 doi:10.1242/dev.030353
- Pickersgill B (1997) Genetic resources and breeding of Capsicum spp. Euphytica 96(1):129-133
- Pozzobon MT, Schifino-Wittmann MT & De Bem Bianchetti L (2006) Chromosome numbers in wild and semidomesticated Brazilian Capsicum L.(Solanaceae) species: do x= 12 and x= 13 represent two evolutionary lines? Botanical Journal of the Linnean Society 151(2):259-269
- Reilly CA, Crouch DJ & Yost GS (2001) Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin capsicum and pepper spray products. Journal of Forensic Science 46(3):502-509
- Reinhardt D, Mandel T & Kuhlemeier C (2000) Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. The Plant Cell 12(4):507-518 doi:10.1105/tpc.12.4.507
- Robert S, Chary SN, Drakakaki G, Li S, Yang Z, Raikhel NV & Hicks GR (2008) Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(24):8464-8469 doi:10.1073/pnas.0711650105
- Rodríguez-Sanz H, Manzanera J-A, Solís M-T, Gómez-Garay A, Pintos B, Risueño MC & Testillano PS (2014) Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, Quercus suberL. BMC Plant Biology 14(1):224 doi:10.1186/s12870-014-0224-4
- Rodríguez-Sanz H, Solís M-T, López M-F, Gómez-Cadenas A, Risueño MC & Testillano PS (2015) Auxin Biosynthesis, Accumulation, Action and Transport are Involved in Stress-Induced Microspore Embryogenesis Initiation and Progression in Brassica napus. Plant and Cell Physiology 56(7):1401-1417 doi:10.1093/pcp/pcv058

- Santner A, Calderon-Villalobos LIA & Estelle M (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Chemical Biology 5:301 doi:10.1038/nchembio.165
- Schlicht M, Strnad M, Scanlon MJ, Mancuso S, hochholdinger F, Palme K, Volkmann D, Menzel D & Baluška F (2006) Auxin Immunolocalization Implicates Vesicular Neurotransmitter-Like Mode of Polar Auxin Transport in Root Apices. Plant Signaling & Behavior 1(3):122-133 doi:10.4161/psb.1.3.2759
- Seabrook J & Douglass L (2001) Somatic embryogenesis on various potato tissues from a range of genotypes and ploidy levels. Plant Cell Reports 20(3):175-182 doi:10.1007/s002990000305
- Smith PG & Heiser Jr CB (1957) Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. Bulletin of the Torrey Botanical Club:413-420
- Spaepen S & Vanderleyden J (2011) Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor perspectives in biology 3(4):a001438
- Steinitz B, Küsek 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(3):296-303 doi:10.1079/IVP2002405
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E & Custers JBM (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 25(1):1-10 doi:10.1007/s00299-005-0028-y
- Tanaka H, Dhonukshe P, Brewer PB & Friml J (2006) Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 63(23):2738-2754 doi:10.1007/s00018-006-6116-5
- Teale WD, Paponov IA & Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature Reviews Molecular Cell Biology 7:847 doi:10.1038/nrm2020
- Tong N & Bosland PW (2003) Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of Capsicum buforum and C. lanceolatum. Genetic Resources and Crop Evolution 50(2):193-199
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G & Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. The Plant Cell 9(11):1963-1971 doi:10.1105/tpc.9.11.1963
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, Guédon Y, Armitage L, Picard F, Guyomarc'h S, Cellier C, Parry G, Koumproglou R, Doonan JH, Estelle M, Godin C, Kepinski S, Bennett M, De Veylder L & Traas J (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. Molecular Systems Biology 7(1) doi:10.1038/msb.2011.39

- Vert G, Walcher CL, Chory J & Nemhauser JL (2008) Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(28):9829-9834 doi:10.1073/pnas.0803996105
- Woodward AW & Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. Annals of botany 95(5):707-735
- Xiang D, Yang H, Venglat P, Cao Y, Wen R, Ren M, Stone S, Wang E, Wang H, Xiao W, Weijers D, Berleth T, Laux T, Selvaraj G & Datla R (2011) POPCORN Functions in the Auxin Pathway to Regulate Embryonic Body Plan and Meristem Organization in *Arabidopsis*. The Plant Cell 23(12):4348-4367 doi:10.1105/tpc.111.091777
- Yang X & Zhang X (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. Critical Reviews in Plant Science 29(1):36-57
- Zhao Y (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. Molecular plant 5(2):334-338

## **HIPÓTESIS**

Si los gradientes de acumulación del ácido indol-3-acético están relacionados con el desarrollo y la transición de los estadios embrionarios de *Capsicum chinense*, entonces es posible que el patrón de localización y acumulación de IAA en los embriones somáticos que se deforman será diferente al patrón presente en la embriogénesis cigótica de esta especie.

#### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar el patrón de localización y acumulación del AIA durante la histodiferenciación de embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense* Jacq. var. Mayan Ba' álche.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar anatómicamente la ontogenia de la embriogénesis cigótica (desarrollo del óvulo y la semilla), y la embriogénesis somática de *Capsicum chinense* Jacq.

Cuantificar por HPLC el contenido de AIA endógeno, en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense* Jacq.

Determinar mediante inmunohistoquímica la localización del AIA durante la ontogénesis de los embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense* Jacq.

Determinar los patrones de metilación de la pectina durante todas las fases de desarrollo de la semilla, del óvulo y de los embriones cigóticos de *Capsicum chinense* Jacq.



# **CAPÍTULO II**

Nota: Este capítulo está sometido a la revista "Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)" con el número de manuscrito PCTO-D-18-00544R1.

Recalcitrance of the genus *Capsicum*: Patterns of differentiation of somatic embryos dependent on the kind of auxin

Pérez-Pastrana Jacobo<sup>1</sup>, Avilés-Viñas Susana<sup>1</sup>, Canto-Flick Adriana<sup>1</sup>, Álvarez-López Dulce<sup>1</sup>, Islas-Flores Ignacio<sup>1</sup>, Nahuat-Dzib Sara<sup>2</sup>, Liliana Muñoz-Ramírez, Laura Peña-Yam, Iglesias–Andreu Lourdes<sup>3</sup>, Santana-Buzzy Nancy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas; Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal; Instituto Tecnológico de Mérida, Avenida Tecnológico km.
4.5 S/N, C.P. 97118, Mérida, Yucatán, México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada (LABIOTECA), Universidad Veracruzana, Lomas del Estadio S/N, CP 91000, Xalapa, Veracruz, México.

Telephone: 52 (999) 9 42 83 30

**Fax**: 52 (999) 9 42 83 00

<sup>1</sup>To whom reprint requests should be addressed. Email address: buzzy@cicy.mx.

Keywords: Recalcitrance, somatic embryogenesis, shoot apical meristem (SAM), *Capsicum.* 

### 2.1 Abstract

One of the first steps in the use of biotechnological tools in plants is ideally the development of an efficient and reproducible somatic embryogenesis protocol. However, species of the genus Capsicum are severely recalcitrance for in vitro morphogenesis. The current protocol used in the somatic embryogenesis of C. chinense Jacq., has shown to have a great embryogenic capacity. This protocol dependent on the auxin 2,4-D throughout the whole process and the principal problem is the regeneration of plants. The main abnormalities in the embryos are related with wrong development of the apical axis. Exogenous 2,4-D can modify internal content of indole-3 acetic acid (IAA), and this can trigger the development of abnormal somatic embryo. The object of this work was to evaluate the embryogenic capacity of different auxins at least in the process of development as well as to analyze the differentiation processes of the somatic embryos of Capsicum annuum L., (var. California Wonder) and C. chinense Jacq., (var Mayan Ba'alché). The results show that it was possible to replace 2,4-D, breaking with the dependence on this auxin. It was also observed that the type of auxin significantly affects the morphology of the embryos. In embryos developed with 2,4-D, cotyledon and cup-shaped fusion predominated (75 %), with Picloram or IAA (65 and 72 %, respectively) the pin phenotype was observed, and with Dicamba (2.26  $\mu$ M) most (76 %) emitted pseudo-cotyledons with the ability to germinate, showing an apparently normal morphology, but still not able to differentiate into plants. These results are an advance in the understanding of the recalcitrance of the genus, and allow to infer that the deformations of the apical axis may be associated with the unbalance of auxin during the development of the somatic embryo of both species of *Capsicum* with the addition of exogenous auxins.

#### 2.2 Introduction

A successful plant biotechnology project can depend mainly upon the ability to regenerate plants from in vitro culture techniques. This competence for regeneration of cultures commonly varies between vegetal species, depending on genetic or epigenetic changes in the cells. However, recalcitrance is a complex biological phenomenon, mainly due to the inability to respond to culture of plant cells, tissues or organs (Benson, 2000). This can occur at any development stage by many factors. Capsicum is a genus severely recalcitrant to the regeneration of plants in vitro. Numerous researchers have worked unsuccessfully to try to overcome this behavior in chillies in in vitro culture. Most reports describe during the shoot formation the growth of ill-defined buds whose development is distorted, forming leaves in a rosette form (Agrawal et al., 1989; Christopher and Rajam, 1994; Franck-Duchenne et al., 1998; Ochoa-Alejo and Ramirez-Malagon, 2001; Steinitz et al., 1999; Valera-Montero and Ochoa-Alejo, 1992). Similarly, the somatic embryogenesis of the Capsicum genus is still limited by the persistent inability of their embryos to become normal plants. In previous reports, we have studied the addition of cytokinins, brassinosteroids, proteins and polyamines, as well as their effect on some of the genes involved in the development of shoot apical meristem (SAM) (Aviles-Viñas et al., 2013; Binzel et al., 1996; Buyukalaca and Mavituna, 1996; Kaparakis and Alderson, 2002; Khan et al., 2006; Kintzios et al., 2001; Kintzios et al., 2000; López-Puc et al., 2006; Steinitz et al., 2003; Zapata-Castillo et al., 2007). Inability of somatic embryos to become plants has been related to the malformations in the apical axis, which drastically affects the shoot apical meristem (SAM) (Aviles-Viñas et al., 2013; Binzel et al., 1996; Buyukalaca and Mavituna, 1996; López-Puc et al., 2006; Santana-Buzzy et al., 2005; Steinitz et al., 2003). Steinitz and coworkers (2003) were the first to characterize and classify the malformations in the somatic embryos of C. annuum. During the early stages of the embryogenesis the bilateral symmetry is established, delimiting apical and basal axes. In the dicotyledonous species, two cotyledonary primordia arise symmetrically from the apical axis of the embryo and the SAM differentiates

between these primordia (Barton and Poethig, 1993; Mansfield and Briarty, 1991; West and Harada, 1993). Most of the steps in the embryo formation pattern depend on auxin biosynthesis, transport and response. Altering the auxin transport drastically affects embryo development, resulting in deformations, e.g., embryos with fused cotyledons or lack of apical axis (Barton and Poethig, 1993; Jürgens, 1995; Liu et al., 1993; Mayer et al., 1991; Moussian et al., 1998). Nevertheless, auxins are recognized potent initiators of somatic embryogenesis (Komamine et al., 1992). For in vitro culture conditions, the most commonly used strategy for initiation of somatic embryogenesis is subjecting tissues to the high concentration of auxin, often 2,4-D (Leyser, 2002; Raghavan, 2004). However, the addition of exogenous auxin can modify the morphogenic pathway (Charrière and Hahne, 1998), to inhibit of the development of somatic embryo (Choi et al., 2001), or cause morphogenetic disturbances in the pattern of developing embryos resulting in the formation of abnormal somatic embryos (Fischer et al., 1997; Hadfi et al., 1998; Liu et al., 1993). Auxins are key factors in morphogenesis, and their action and response is not simple (Møller and Chua, 1999, Zuo et al., 2002). The main objective of this study was to characterize in detail the differentiation of somatic embryos of *C. annuum* L. (Var. California Wonder) and *C. chinense* Jacq., (Mayan Ba' alché var.,) in respond by auxins; 2,4-D, Picloram, Dicamba and IAA at low concentration.

#### 2.3 Materials and methods

*Plant material. Capsicum* plants (*C. annuum* var. California Wonder and *C. chinense* var. Mayan Ba' alché) were grown in *in vitro* conditions as described by Santana-Buzzy et al., 2005. The sterile seeds were cultured in the medium Murashige and Skoog (MS), supplemented with organic components; 100 mg.mL<sup>-1</sup> of *myo*-Inositol, 0.5 mg.mL<sup>-1</sup> of Nicotinic acid, 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of Pyridoxine.HCl, 0.1 mg.L<sup>-1</sup> of Thiamine.HCl, 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of glycine, 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose, and 2.2 g.L<sup>-1</sup> gelrite, adjusted the pH to 5.8. The aseptic explants; hypocotyls (1 cm long), were

subcultured in the induction medium; MS + 9.05  $\mu$ M of 2,4-dichorophenoxyacetic acid (2,4-D) as reported by Aviles-Viñas *et al.* (2013).

Somatic embryo induction. They were produced according Aviles-Viñas *et al.* (2013). Briefly, segments of the hypocotyls were extracted from *in vitro* 15-day-old seedlings and were transferred to the induction medium; full MS medium supplemented with 9.05  $\mu$ M of (2,4-D), 3 % (w.v<sup>-1</sup>) of sucrose and 2.2 g.L<sup>-1</sup> of gelrite, pH 5.8. The culture vessels were incubated under continuous light at 25 ± 2 °C for 4 weeks.

Development of somatic embryos. After the induction period, the explants were transferred to liquid MS medium supplemented with different auxins. Per treatment fifteen flasks were used, each one containing 50 mL of liquid medium in which 10 explants were cultured. Four auxins were evaluated: Indole-3-acetic acid (IAA), 3,6-Dichloro-2-methoxybenzoic acid (Dicamba), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (Picloram) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), each at concentrations of 2.26, 4.52 and 9.05  $\mu$ M, pH 5.8. The cultures were kept under continuous light, at 25 °C ± 2 °C and in continuous agitation (100 rpm) for 4 weeks. The subcultures were performed every 10 days.

Frequency of the different morphologic patterns in the somatic embryos of *C. chinense* and *C. annuum* in hypocotyl were determined on. Three flasks per treatment (IAA, Dicamba, Picloram and 2,4-D; at 2.26, 4.52 and 9.05  $\mu$ M each); from each flask, only 120 somatic embryos were randomly collected and thus, 4320 somatic embryos were processed for each species. Each type of deformation in the embryos in the embryos in each treatment, per species, was calculated based on the total number of somatic embryos evaluated.

*Embryogenic capacity of Dicamba on different explants of C. annuum.* The embryogenic response to Dicamba by different types of explants (hypocotyl, cotyledons and leaves) in *C. annuum* var. California Wonder was analyzed. The explants were induced during 15 days on semisolid MS supplemented with 9.05  $\mu$ M of Dicamba, and then transferred to liquid MS medium supplemented with Dicamba (2.26, 4.52 and 9.05  $\mu$ M); incubation conditions were as above.

The number of embryos per explant in all the treatments was determined, and data were statistically analyzed using single factor ANOVA (Excel, Microsoft Office Professional 2010); the significant differences between the means were assessed by Tukey's test at 5 % of probability level.

*Histological analysis.* The biological material was fixed in FAA (formaldehyde – acetic acid – ethanol); 10 mL of 37 % formaldehyde, 50 mL of 96 % alcohol, 5 mL of 100 % acetic acid and 100 mL of distilled water (Berlyn *et al.*, 1976; Franklin *et al.*, 1991). The dehydration was performed through a gradual exposure to ethanol (30, 50, 70, 90 and 100%), ending in 100 % butanol. The biological tissues analyzed were embedded in paraffin, and 6 to 8 µm slices were obtained. The slices were deparaffinized with xylene, followed by ultraclear histograde (J.T. Baker). The sections were then subjected to gradual hydration followed by staining with 0.05 % Toluidine blue. The slices were analyzed in a Leica stereomicroscope (MZ FLIII, Leica).

#### 2.4 Results

*Histodifferentiation of somatic embryos.* Somatic embryos were observed for the two species (*C. chinense* and *C. annuum*) in all treatments. The type of auxin and the different concentration showed a differential effect on embryogenic structures in both species in qualitative terms (Fig. 2.1 A-B) and quantitatively (Fig. 2.2 A-B). *C. chinense* var. Mayan Ba'alche (Fig. 2.1 A) showed greater plasticity to respond,

the different auxins and their concentrations, resulting in the observation of somatic embryos in globular and heart-shaped stages in all treatments, at the fourth week of culture. In *C. chinense* (Fig. 2.2A), treatments of 2,4-D, Dicamba or IAA at a concentration of 9.05  $\mu$ M produced the highest number of embryos / explant without differing significantly from each other in the quantity of the embryos. For *C. annuum*, the highest number of embryos was registered with 2.26  $\mu$ M of IAA (Fig. 2.2B), differing significantly from the rest of the treatments.



Figure 2.1. Effect of the auxins 2,4-D, Picloram, Dicamba and IAA at concentrations of 2.26, 4.52 and 9.05  $\mu$ M, respectively, on the formation of somatic embryos of *C. chinense* cv Mayan Ba'alche. (A) and *C. annuum* cv California Wonder (B), at 4 weeks of culture in liquid medium.

After fourth week *C. annuum* var. California Wonder was more selective for the auxin type, showing somatic embryos in late stages and with more defined morphology. The most interesting response was obtained for Dicamba (2.26 and 4.52  $\mu$ M), where somatic embryos were observed in torpedo and cotyledon stages, and some already germinated (2.26  $\mu$ M) and showing their tiny green cotyledons (Fig. 2.1B). In contrast with *C. chinense* var. Mayan Ba' álche, *C. annuum* var. California Wonder showed a prominent histodifferentiation, from which somatic embryos were generated with more normal development.


Figure 2.2. Effect of auxins on somatic embryo induction from hypocotyl segments of *C. chinense* (A) and *C. annuum* (B) in MS medium, after 4 weeks of culture.

The diversity of morphological patterns during the development of somatic embryos when use different auxins (2,4-D, Picloram, Dicamba and IAA) is shown for *C. annuum* (Fig. 2.3) and *C. chinense* (Fig. 2.4).



Figure 2.3. Effect of auxins 2,4-D, Picloram, Dicamba and IAA on the morphology of somatic embryos of *Capsicum annuum*.



Figure 2.4. Effect of auxins 2,4-D, Picloram, Dicamba and IAA on the morphology of somatic embryos of *Capsicum chinense*.

It is possible to identify egg-shaped embryos, pin shaped fused embryo, pin shaped cup cotyledon and normal-like shaped. The patterns of differentiation of somatic embryos induced by auxins varied drastically between species (Fig. 2.5).



# Figure 2.5. Frequency of the morphologic patterns of the somatic embryos of *C. chinense* and *C. annuum*.

Embryos for the treatment with 2,4-D in *C. annuum* showed a high frequency (75%) of cup cotyledon shape for 2.26  $\mu$ M, and in *C. chinense* showed a ball shape

(72 %) with 9.05  $\mu$ M, and pin shape (55 % with 2.26  $\mu$ M). When using the auxin Dicamba, the embryos reached a more development with pseudo-cotyledons, emitting the radicle in the species *C. annuum* with a normal-like shape (76 % with 4.52  $\mu$ M), whereas in *C. chinense* the percentage of fused embryos lacking the apical axis increased (65 % with 4.52  $\mu$ M). In the case of Picloram, the most frequent morphology in *C. annuum* and *C. chinense* was pin shaped (respectively 65 and 54 % with 2.26  $\mu$ M), and also with the use of IAA 72 % with 9.05  $\mu$ M in *C. annuum*, and 42 % with 4.52  $\mu$ M in *C. chinense*. Embryos of *C. annuum* obtained with 4.52  $\mu$ M of Dicamba showed the best progress in development (Fig. 2.6A). These embryos were transferred to MS medium without growth regulators; and it was possible to distinguish two tiny cotyledonary leaves and a vigorous radicle (Fig. 2.6B and C). During germination, a phenotype with atrophied development in the apical axis was observed; despite the expansion of the cotyledons, the lack of the apical meristem of the shoot in the embryos was evident (Fig. 2.6C and D).



Figure 2.6. Somatic embryos of *C. annuum* cv. California Wonder in cotyledonary stage, from medium with Dicamba (2.26  $\mu$ M). (A); Radicle of the germinated somatic embryo; the formation of root hairs (B) is observed;

Germinated somatic embryo from the medium with Dicamba (2.26  $\mu$ M) (C); Approach of the upper part of the germinated embryo; note the apical meristem and the cotyledonary deformed leaves (D).

#### Histological analysis of the somatic embryogenesis in C. annuum.

After one week cultured in medium with 2,26  $\mu$ M of Dicamba, it was possible to observe the formation of the first pre embryogenic structures, very close to the vascular bundles. The evolution of these structures along the procambium allowed the observation of early globular stages after three days (Fig. 2.7A). As the process progress, it was observed the late-globular and early-heart stages. At the third week, somatic embryos were at heart and torpedo stages (Fig. 2.7B), and the basal zone and the apical zone of the embryo body were clearly distinguished. By the fourth week of culture, some somatic embryos had reached the cotyledonary stage, in which the formation of protodermis and procambium tissue were seen (Fig. 2.7C-D). Analysis of cross-sections of the hypocotyls, where clusters of embryos are formed in advanced stages, support by the formation of procambium and protodermis tissue in the somatic embryos of *C. annuum* (Fig. 2.7E-F).

Evaluation of the embryogenic capacity of the Dicamba auxin using different explants of the C. annuum species. When analyzing the response of the different explants (leaf, cotyledon and hypocotyl) of Capsicum annuum induced in 9  $\mu$ M of Dicamba, regardless of the type of explant, somatic embryos could be observed in all the evaluated treatments, formed directly on the explant (Fig. 2.8).



Figure, 2.7. Histological sections of the hypocotyl during the somatic embryogenesis of *C. annuum* in medium with 2.26  $\mu$ M of Dicamba: (A) longitudinal: globular embryos in the procambium zone; (B) logitudinal: heart and torpedo embryos, along the procambium; (C-D) longitudinal: cotyledonary embryos and provascular tissue; (E and F) transverse: cotyledonary embryos. The protodermis and provascular tissues are appreciated. VT, vascular tissue; GE, Globular embryo; HE, Heart Embryo; TE, Torpedo Embryo; CE, Cotyledon embryo; Pd, Protodermis;. RAM, Root apical meristem. The hypocotyl explant produced the largest number of embryos per explant and the best treatments were 2.26 and 4.52  $\mu$ M of Dicamba with no significant difference among them (Fig. 2.9).



Figure 2.8. Production of somatic embryos of different explants (leaf, cotyledon and hypocotyl) of *C. annuum* in response to different concentrations of Dicamba during the histodifferentiation stage, from Induction medium was MS + 9.05  $\mu$ M of Dicamba.



# Figure 2.9 Number of somatic embryos / explant of *C. annuum* cv. California Wonder formed in different concentrations of Dicamba.

# 2.5 Discussion

Analysis of *in vitro* response from different explants of *C. annuum* L.var. California Wonder and *C. chinense* Jacq. to different types and concentrations of auxins, show the great plasticity of species in the *Capsicum* genus. All treatments evaluated here produced a large number of embryos per explant, but hypocotyl tissue showed largely different behavior even though they had the same initial induction treatment.

This work, shows that it is possible to replace 2,4-D, and the use of other auxins reveals different patterns of differentiation. A numerous reports indicate that the effectiveness to promote embryogenesis and the morphology of embryos may vary depending on the source of auxin (Parrott, 1991; Rodriguez and Wetzstein, 1994; Ziauddin and Kasha, 1990). Moreover, it was found here that the genotype had a significant influence for success of the processes. One of the main limitations in the protocols of somatic embryogenesis for a recalcitrant genus such as *Capsicum* is the specificity of response of the species. The majority of chili regeneration

protocols reported to date is about *Capsicum annuum* species (Bárány *et al.*, 2005; Binzel et al., 1996; Buyukalaca and Mavituna, 1996; Khan et al., 2006; Kim et al., 2008; Koleva-Gudeva et al., 2007; Ochoa-Alejo, 2016; Steinitz et al., 2003; Supena et al., 2006), a few reports of Capsicum frutescens L. (Reddy and Kakani, 2007; Subhash and Christopher, 1988; Wang et al., 1991), and more recently C. chinense (Aviles-Viñas et al., 2013; López-Puc et al., 2006; Sanatombi and Sharma, 2008; Santana-Buzzy et al., 2005). A common description of most of these reports is the presence of deformations in the apical apex, which compromise the development of the shoot apical meristem. Through continuous research, we have tried to understand the causes leading to the severe recalcitrance for somatic embryogenesis of the species of the Capsicum genus. In previous reports (Aviles-Viñas et al. 2013; López-Puc et al., 2006) the formation of C. chinense somatic embryos was achieved in the presence of auxin 2,4-D and this auxin was present throughout all development. The long exposure of embryos to this auxin leads us to wonder if the deformations of the apical meristem is associated with the permanence of this auxin in the culture medium. Auxin is a small molecule, considered the most important hormone for the regulation of the plant biological processes, including somatic embryogenesis (Cooke et al., 1993), e.g., during the induction phase, the transport of auxin establishes an auxin gradient, which is essential for cell division patterns that allow bilateral symmetry and tissue differentiation during embryogenesis (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1993; Schiavone and Cooke, 1987).

To achieve a gradual accumulation of the auxin, it is necessary to increase the levels of the IAA in specific tissues. The exogenous application of 2,4-D raise the endogenous auxin levels (Michalczuk *et al.*, 1992; Pasternak *et al.*, 2002). The biosynthesis of the auxin is an important signal for the reprogramming of the embryogenic pathway (Thomas *et al.*, 2002). However, it is possible that the continuous presence of 2,4-D can maintain the levels of endogenous auxin, preventing regulation and causing, in some species, the inhibition of the embryogenic development (Nissen and Minocha, 1993). Fischer-Iglesias *et. al* 

(2001), working with wheat embryos, reported that exogenous application of auxin altered the pattern of distribution of endogenous auxin, compared with untreated plants. Auxin controls processes are directly related to the establishment of patterns during early stages and during the formation in the apical and basal domains of the embryo (Möller and Weijers, 2009). Nevertheless, in many species it is common to find abnormalities in the somatic embryos, *e.g.*, a rudimentary organization of the apical meristems of the shoot, or their complete absence was reported in alfalfa (Santos et al., 1983); abnormalities were also observed in soya, (Barwale et al., 1986) and in Vitis longii (Gray and Mortensen, 1987), suggesting that the morphogenic patterns involve a complex developmental processes and, when one of these factors is altered, abnormal events are triggered. Interference on auxin transport in zygotic embryos of *Brassica juncea* mimics the phenotype of the mutants of pin1 in Arabidopsis, both showing fusion of cotyledons. Therefore, the auxin polar transport is essential for the establishment of the cell division patterns involved in the formation of the bilateral symmetry in globular embryos (Liu et al., 1993). This suggests that somatic embryos of Capsicum are affected mainly in the early stages of development. Large changes occurring in the SE in comparison with zygotic embryos enable to easily distinguish abnormal or aberrant embryo from normal embryos; abnormalities result from the lack of one or more of structural elements, particularly during the late stages (Hoenemann et al., 2010). Similarly, the polar transportation of auxins is involved in cotyledon initiation in the late globular embryo (Cooke et al., 1993). The type of deformations observed in this work are similar to those observed in mutants with defects in the synthesis or transport of IAA (Endogenous auxin) during the process of polarization and histodifferentiation of the embryo (Hakman et al., 2009; Huang et al., 2014; Mravec et al., 2008). These results are support that exogenous auxins are involved in the embryonic development and pattern formation, which defines the architecture of the plant, and prompt us to infer that deformations of the apical meristem are associated with the exogenous-endogenous auxin interaction, the synthesis and/or polar transport of the auxin during the development of the embryo. Improvements

of embryogenic process in *Capsicum* are necessary to increase the efficiency of conversion into plant, which it is demanded in any areas, including breeding for biotechnology applications. This research should continue to determine concentrations and location of IAA during the whole process, as well as the quantification of the genes involved in the indole-3-pyruvate pathway (IPA), since IAA is crucial in Capsicum embryogenesis and plant regeneration.

# 2.6 Literature Cited

- Agrawal S, Chandra N & Kothari SL (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. mathania). Plant Cell Tiss Org 16(1):47-55 doi:10.1007/bf00044071
- Aviles-Viñas SA, Lecona-Guzman CA, Canto-Flick A, Lopez-Erosa S & Santana-Buzzy N (2013) Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. Plant Biotechnol Rep 7(3):277-286 doi:10.1007/s11816-012-0261-0
- Bárány I, González-Melendi P, Fadón B, Mitykó J, Risueño MC & Testillano PS (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. Biology of the Cell 97(9):709-722 doi:10.1042/BC20040142
- Barton MK & Poethig RS (1993) Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. Development 119(3):823-831
- Barwale UB, Kerns HR & Widholm JM (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta 167(4):473-481 doi:10.1007/bf00391223
- Benson EE (2000) Sepecial symposium: In vitro plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: An introduction. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 36(3):141-148 doi:10.1007/s11627-000-0029-z
- Berlyn GP, Miksche JP & Sass JE (1976) Botanical microtechnique and cytochemistry. Iowa State University Press
- Binzel ML, Sankhla N, Joshi S & Sankhla D (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 15(7):536-540 doi:10.1007/BF00232989
- Buyukalaca S & Mavituna F (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tiss Organ Cult 46(3):227-235 doi:10.1007/BF02307099
- Cooke TJ, Racusen RH & Cohen JD (1993) The Role of Auxin in Plant Embryogenesis. Plant Cell 5(11):1494-1495 doi:10.1105/tpc.5.11.1494
- Charrière F & Hahne G (1998) Induction of embryogenesis versus caulogenesis on in vitro cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. Plant Science 137(1):63-71 doi:10.1016/S0168-9452(98)00128-9
- Choi YE, Katsumi M & Sano H (2001) Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. Plant Science 160(6):1183-1190 doi:10.1016/S0168-9452(01)00357-0
- Christopher T & Rajam MV (1994) In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. Plant Cell Tiss Org 38(1):25-29 doi:10.1007/bf00034439
- Fischer C, Speth V, Fleig-Eberenz S & Neuhaus G (1997) Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. Plant Cell 9(10):1767-1780 doi:10.1105/tpc.9.10.1767

- Franck-Duchenne M, Wang Y, Ben Tahar S & Beachy RN (1998) In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide. Plant Cell Tiss Org 53(2):79-84 doi:10.1023/a:1006071803855
- Franklin CI, Trieu TN, Gonzales RA & Dixon RA (1991) Plant regeneration from seedling explants of green bean (*Phaseolus vulgaris* L) via organogenesis. Plant Cell Tiss Org 24(3):199-206 doi:10.1007/bf00033477
- Gray DJ & Mortensen JA (1987) Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of Vitis longii 'Microsperma'. Plant Cell Tiss Organ Cult 9(1):73-80 doi:10.1007/BF00046081
- Hadfi K, Speth V & Neuhaus G (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. Development 125(5):879-887
- Hakman I, Hallberg H & Palovaara J (2009) The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during Picea abies somatic embryo development. Tree Physiology 29(4):483-496 doi:10.1093/treephys/tpn048
- Hoenemann C, Richardt S, Krüger K, Zimmer AD, Hohe A & Rensing SA (2010) Large impact of the apoplast on somatic embryogenesis in Cyclamen persicum offers possibilities for improved developmental control in vitro. BMC Plant Biology 10(1):77 doi:10.1186/1471-2229-10-77
- Huang J-b, Liu H, Chen M, Li X, Wang M, Yang Y, Wang C, Huang J, Liu G, Liu Y, Xu J, Cheung AY & Tao L-z (2014) ROP3 GTPase Contributes to Polar Auxin Transport and Auxin Responses and Is Important for Embryogenesis and Seedling Growth in *Arabidopsis*. The Plant Cell Online doi:10.1105/tpc.114.127902
- Jürgens G (1995) Axis formation in plant embryogenesis: Cues and clues. Cell 81(4):467-470 doi:10.1016/0092-8674(95)90065-9
- Kaparakis G & Alderson PG (2002) Influence of high concentrations of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 77(2):186-190 doi:10.1080/14620316.2002.11511477
- Khan H, Siddique I & Anis M (2006) Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. Biol Plant 50(4):789-792 doi:10.1007/s10535-006-0133-y
- Kim M, Jang I-C, Kim J-A, Park E-J, Yoon M & Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. Plant Cell Reports 27(3):425-434 doi:10.1007/s00299-007-0442-4
- Kintzios S, Drossopoulos JB & Lymperopoulos C (2001) Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. Plant Cell Tiss Organ Cult 67(1):55-62 doi:10.1023/a:1011610413177
- Kintzios S, Drossopoulos JB, Shortsianitis E & Peppes D (2000) Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. Scientia Horticulturae 85(1– 2):137-144 doi:10.1016/s0304-4238(99)00135-1

- Koleva-Gudeva LR, Spasenoski M & Trajkova F (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. Scientia Horticulturae 111(2):114-119 doi:10.1016/j.scienta.2006.10.013
- Leyser O (2002) Molecular genetics of auxin signaling. Annual Review of Plant Biology 53(1):377-398 doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135227
- Liu C, Xu Z & Chua NH (1993) Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. The Plant Cell 5(6):621-630 doi:10.1105/tpc.5.6.621
- López-Puc G, Canto-Flick A, Barredo-Pool F, Zapata-Castillo P, Montalvo-Peniche MdC, Barahona-Pérez F, Santana-Buzzy N & Iglesias-Andreu L (2006) Direct Somatic Embryogenesis: A Highly Efficient Protocol for In Vitro Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience 41(7):1645-1650
- Mansfield SG & Briarty LG (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. Canadian Journal of Botany 69(3):461-476 doi:10.1139/b91-063
- Mayer U, Ruiz RAT, Berleth T, Miseera S & Juurgens G (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. Nature 353(6343):402-407 doi:10.1038/353402a0
- Michalczuk L, Cooke TJ & Cohen JD (1992) Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. Phytochemistry 31(4):1097-1103 doi:10.1016/0031-9422(92)80241-6
- Möller B & Weijers D (2009) Auxin Control of Embryo Patterning. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1(5) doi:10.1101/cshperspect.a001545
- Moussian B, Schoof H, Haecker A, Jürgens G & Laux T (1998) Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. The EMBO Journal 17(6):1799-1809 doi:10.1093/emboj/17.6.1799
- Mravec J, Kubeš M, Bielach A, Gaykova V, Petrášek J, Skůpa P, Chand S, Benková E, Zažímalová E & Friml J (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. Development 135(20):3345-3354 doi:10.1242/dev.021071
- Murashige T & Skoog F (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15(3):473-497 doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nissen P & Minocha SC (1993) Inhibition by 2,4-D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by difluoromethylornithine. Physiologia Plantarum 89(4):673-680 doi:10.1111/j.1399-3054.1993.tb05272.x
- Ochoa-Alejo N (2016) Somatic Embryogenesis in *Capsicum* spp. In: Loyola-Vargas MV & Ochoa-Alejo N (eds) Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer International Publishing, Cham, p 233-240
- Ochoa-Alejo N & Ramirez-Malagon R (2001) In vitro chili pepper biotechnology. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 37(6):701-729 doi:10.1007/s11627-001-0121-z
- Parrott WA (1991) Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. Plant Cell Reports 10(1):17-21 doi:10.1007/bf00233025

- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D & Fehér A (2002) The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. Plant Physiology 129(4):1807-1819 doi:10.1104/pp.000810
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. American Journal of Botany 91(11):1743-1756 doi:10.3732/ajb.91.11.1743
- Reddy KR & Kakani VG (2007) Screening *Capsicum* species of different origins for high temperature tolerance by in vitro pollen germination and pollen tube length. Scientia Horticulturae 112(2):130-135 doi:10.1016/j.scienta.2006.12.014
- Rodriguez APM & Wetzstein HY (1994) The effect of auxin type and concentration on pecan (*Carya illinoinensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion into plants. Plant Cell Reports 13(11):607-611 doi:10.1007/bf00232930
- Sanatombi K & Sharma GJ (2008) In vitro plant regeneration in six cultivars of Capsicum spp. using different explants. Biol Plant 52(1):141-145 doi:10.1007/s10535-008-0029-0
- Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Barahona-Pérez F, Montalvo-Peniche MdC, Zapata-Castillo PY, Solís-Ruiz A, Zaldívar-Collí A, Gutiérrez-Alonso O & Miranda-Ham MdL (2005) Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. HortScience 40(6):1829-1831
- Santos AVPd, Cutter EG & Davey MR (1983) Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfalfa). Protoplasma 117(2):107-115 doi:10.1007/bf01288349
- Schiavone FM & Cooke TJ (1987) Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. Cell Differentiation 21(1):53-62 doi:10.1016/0045-6039(87)90448-9
- Steinitz B, Küsek 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(3):296-303 doi:10.1079/IVP2002405
- Steinitz B, Wolf D, Matzevitch-Josef T & Zelcer A (1999) Regeneration in vitro and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.): The current state of art. Capsicum Eggplant Newslett 18:9-15
- Subhash K & Christopher T (1988) Direct plantlet formation in cotyledon cultures of *Capsicum frutescens*. current Science 57(2):99-100
- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E & Custers JBM (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 25(1):1-10 doi:10.1007/s00299-005-0028-y
- Thomas C, Bronner R, Molinier J, Prinsen E, van Onckelen H & Hahne G (2002) Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of

somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. Planta 215(4):577-583 doi:10.1007/s00425-002-0791-8

- Valera-Montero LL & Ochoa-Alejo N (1992) A novel approach for chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. Plant Science 84(2):215-219 doi:10.1016/0168-9452(92)90137-b
- Wang Y, Yang M, Pan N & Chen Z-L (1991) Plant regeneration and transformation of sweet pepper (*Capsicum frutescens*). Acta bot. sin 33(10):780-786
- West M & Harada JJ (1993) Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. Plant Cell 5(10):1361-1369 doi:10.1105/tpc.5.10.1361
- Zapata-Castillo PY, Flick A-C, López-Puc G, Solís-Ruiz A, Barahona-Pérez F, Santana-Buzzy N & Iglesias-Andreu L (2007) Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. chinense Jacq.*) from Cell Suspensions. HortScience 42(2):329-333
- Ziauddin A & Kasha KJ (1990) Long-term callus cultures of diploid Barley (*Hordeum vulgare*). I. Auxin effects on culture initiation and maintenance. Euphytica 48(2):171-176 doi:10.1007/bf00037197

# CAPÍTULO III

Nota: Este capítulo está publicado en la revista "Journal of Plant Physiology" en elVolumen230,Noviembre2018,Paginas1-12.DOI:<a href="https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.005">https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.005</a> Aceptado el 11 de Agosto del 2018

**Title**: Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-esterification

**Authors:** Jacobo Pérez-Pastrana<sup>1</sup>; Ignacio Islas-Flores<sup>1</sup>; Ivett Bárány<sup>3</sup>; Dulce Álvarez-López<sup>2</sup>; Adriana Canto-Flick<sup>1</sup>; Blondy Canto-Canché<sup>2</sup>; Laura Peña-Yam<sup>1</sup>; Liliana Muñoz-Ramírez<sup>1</sup>; Susana Avilés-Viñas<sup>1</sup>; Pilar S. Testillano<sup>3, \*</sup>; Nancy Santana-Buzzy<sup>1,\*</sup>

**Authors addresses:** <sup>1</sup> Unidad de Bioquímica y Biología Molecular; Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México. <sup>2</sup> Unidad de Biotecnología; Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 x 32 y 34, colonia Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán, México. <sup>3</sup> Pollen biotechnology of crop plants group, Biological Research Center, Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid, Spain.

\*Corresponding authors:

Pilar S. Testillano, e-mail: testillano@cib.csic.es, <u>phone</u>: +34 91 8373112 Nancy Santana-Buzzy, e-mail: buzzy@cicy.mx, <u>phone:</u> +52 (999) 9428330

#### 3.1 Abstract

Ovule and seed development in plants has long fascinated the scientific community given the complex cell coordination implicated in these processes. These cell events are highly conserved but are not necessarily representative of all plants. In this study, with the aim of obtaining information regarding the cellular patterns that follow the usual development of the ovule and the zygotic embryo, we carried out an integral anatomical study of the *Capsicum chinense* Jacq., floral buds and seeds at various days during maturation. This study allowed us to identify the main histo-morphological stages accompanying the transition of somatic cells into the macrospore, female gamete, and the zygotic embryogenesis. This knowledge is fundamental for future biotechnological research focused on solving the morphological recalcitrance observed during the in vitro induction of somatic or microspore embryogenesis in Capsicum. For the first time in C. chinense, we have described the hypostases, a putative source of plant growth regulators, and "the corrosion cavity", a space around the embryo. Additionally, the cell wall pectin-esterification status was investigated by immunohistology. At early stages of morphogenesis, the pectin is highly methylesterified; however, methyl-esterification decreases gradually throughout the process. A comparison of the results obtained here, together with the histo- and immunological changes occurring during the somatic and microspore embryogenesis, should help to elucidate the biochemical mechanisms that trigger the morphogenic events in Capsicum spp.

# Keywords

*Capsicum chinense* Jacq.; ovule development; zygotic embryogenesis; methylesterified/de-methyl-esterified pectin; immunohistology

# Abbreviations

Bovine serum albumin (BSA), chalaza (Ch), cotyledons (Co), days post-anthesis (DPA), 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), embryo (Emb), embryonic sac (ES),

endothelium (Ent), endosperm (End), electrical conductivity (EC), functional megaspore cell (FM), funiculus (Fu), ground meristem (Gm), integument (Int), hypostases (Hyp), megaspore mother cell (MMC), micropyle (Mi), phosphatebuffered saline *(PBS)*, potential of hydrogen (pH), pre-anthesis (PreA), procambium (Pc), protodermis (Pd), ribonucleic acids (RNAs), root apical meristem (RAM), shoot apical meristem (SAM), suspensor (Su), testa (Te).

### 3.2 Introduction

The transition of the morphological and biological events, which extends from the establishment and development of the vegetative meristem to the flower formation, has been a motive of scientific fascination for years (Endress, 2011). Those "apparently simple cell changes" enclose the power to differentiate somatic cells into macrospore or microspore (megasporogenesis/microsporogenesis), the which subsequently give rise to female or male gametes (megagametogenesis/microgametogenesis), respectively (She et al., 2013). The fertilization of the female gamete allows zygote cell formation with defined cell divisions to form the embryo (zygotic embryogenesis) until it completes its maturation into the seed, thus producing a successful offspring (Yadegari and Drews, 2004).

Proper ovule and embryo sac development is critical to reproductive success. The multiple cell layers or cell types of the ovule and the embryo sac form the various components of the future seed. Research on the development of megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis in plants involves the analysis of the histo-morphological changes which begins with the differentiation of somatic cells into the archesporium or megaspore mother cell (MMC), the two meiotic divisions undergone by the MMC, the differentiation of one of the resulting meiotic cells into the functional megaspore cell (FM), followed by three continuous mitotic divisions which, in the end, differentiate into the egg cell among other cell types. In the double fertilization process, the egg cell fertilization produces the zygote, and the continuous cell divisions permit embryo development (Reiser and Fischer, 1993; Xu *et al.*, 2011).

Anatomical details of ovule development or embryogenesis have been reported in several *Capsicum* species (Dharamadhaj and Prakash, 1978), but information on the whole process from megasporogenesis to embryo formation in *Capsicum chinense* is still lacking. Increasing evidence has indicated that many plant developmental processes, including embryogenesis, involve changes in the esterification status of cell wall pectins, which may cause cell wall remodeling during the process (Bárány *et al.*, 2010; Dobrowolska *et al.*, 2012; Kurczynska *et al.*, 2012; Lora *et al.*, 2017; Müller *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2011). Pectins are major components of primary plant cell walls; they are secreted into the cell wall in a highly methyl-esterified form and can be de-esterified in muro by pectin methyl-esterases (Lionetti *et al.*, 2007). The degree and pattern of methyl esterification affect the cell wall structure, texture, porosity, and its chemical and mechanical properties (Wolf *et al.*, 2009) dramatically. For example, pectin demethyl-esterification is essential for the correct function of the guard cells (Amsbury *et al.*, 2016).

Monoclonal antibodies that recognize plant cell wall epitopes, specifically those that recognize low and high degrees of methyl-esterified pectin, have been reported as particularly useful in revealing the patterns of pectin esterification during developmental processes (Rodríguez-Sanz et al., 2015). The JIM5 antibody immunorecognizes differentiated cells that usually contain partially methylesterified pectin with up to 40% of de-esterified residues, while the JIM7 antibody recognizes proliferating cells containing more than 80% of methyl-esterified pectin residues (Bárány et al., 2010; Solís et al., 2016; Willats et al., 2006; Xu et al., 2011). Therefore, these antibodies can detect the degree of pectin methylesterification, correlating it with cell wall stiffness or loosening, which occurs during the development of the seed from the ovule, and more importantly, the degree of cell differentiation in each stage (Rodríguez-Sanz et al., 2015). An understanding of the dynamic changes in pectin methyl-esterification and remodeling of cell wall will enable knowledge us to gain more of the megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis processes (Rafińska and Bednarska, 2011).

Anatomical and biochemical aspects relating to the development of the ovule and embryo in Capsicum spp. are poorly understood (Dharamadhaj and Prakash, 1978; Lengel, 1960). C. chinense is a pungent chili pepper and, to date, research limited. on this species is Currently, cellular differentiation during megasporogenesis, megagametogenesis, and embryogenesis is mainly unknown. In this work, we report a detailed morpho-histological and immunocytochemical characterization of the dynamics of cell changes and pectin methyl-esterification in cell walls of the different cell lineages that accompany the ovule and seed development in habanero chili pepper (C. chinense Jacq.).

#### 3.3 Materials and Methods

#### 3.3.1 Crop nutrition condition

Seeds of the Habanero chili pepper var. Mayan Ba'alché (*C. chinense* Jacq.) were obtained from the germplasm bank of the Scientific Research Center of Yucatan. Twenty plants were cultivated under hydroponic conditions in a greenhouse with average temperatures of 33°/21°C (day/night), during the winter of 2015-2016. A nutrient solution was prepared using the following nutrient concentration (mg.L<sup>-1</sup>): Total-Nitrogen 159.1, Phosphorus 38.1; Potassium 175.2; Calcium 98.8; Magnesium 28.8; Sulfur 38.4; Boron 0.4; Copper 0.4; Iron 1.7; Manganese 0.4; Molybdenum 0.1; Nickel 0.1; Zinc 0.2. with an EC of 1.6 dS.m<sup>-1</sup>, pH of 6.0 (Furlani 1998).

#### 3.3.2 Biological material

Two hundred flower buds with < 1 mm length were tagged and monitored; ten of them were harvested each day over a period of 10 days, comprising the preanthesis (PreA) and anthesis days, following the methodology reported by Aleemullah (Aleemullah *et al.*, 2000). Plant flowering began 35 days after seedling transplant. One hundred and twenty closed flower buds, just prior to opening, were selected and tagged using paper stickers. After flower opening and self-pollination, the development of the fruit was characterized. Ten fruits were harvested at 3, 5, 10, 20, 30 and 40 days post-anthesis (DPA). Pericarps from these fruits were removed with a sterile scalpel; the seeds were then carefully detached from the placental tissues and placed in fixing solution.

#### 3.3.3 Fixing and staining of the tissue sections

The vegetal tissue samples were fixed overnight with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at 4 °C. After fixing, the samples were washed in PBS, then dehydrated in acetone (30, 50, 70, 90 and 100%) and embedded in resin (Technovit 8100) at low temperature (Rodríguez-Sanz *et al.,* 2015). Thin sections of 3 to 5 µm were prepared using a microtome (Microm GmbH, mod. HM340E), stained with 0.05% (50 mg/ 100 mL) Toluidine blue in distilled water and mounted with Mowiol (Alfred *et al.,* 1982). Structural analysis was carried out under brightfield using a Zeiss Axioplan 2 microscope.

#### 3.3.4 Immunofluorescence on tissue sections

Tissue sections (2 µm thickness) from flower buds or developing seeds were hydrated three times, 5 minutes each time, in PBS 1X (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.4). Tissue sections were blocked for 10 minutes with 5% bovine serum albumin (BSA), washed again with PBS buffer 1X, and then incubated for 1 hour with the JIM5 (undiluted) or JIM7 (1:5 dilution) monoclonal antibodies, the former against low-esterified pectin and the latter against methylated pectin (Solís *et al.*, 2016). Samples were washed five times for 5 minutes each with PBS buffer 1X and then incubated for 45 minutes in the dark with 1:25 dilution of anti-rat secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Cat. no. A-11001). After washing 5 times for 5 minutes each time with PBS 1X, 1 mg/ml DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; Fluka) was added to the tissue sections, and these were incubated for 10 min and analyzed with a confocal microscope (Leica TCS-SP5). As a control, samples were prepared as above but without primary antibody.

## 3.4 Results

### 3.4.1 Development of the floral buds

From the observations carried out during the developmental period of the floral buds, starting from buttons of 1 mm in length up to the occurrence of anthesis, it was possible to determine that the Habanero chili pepper requires 9 PreA, and this permitted us to classify the floral buds according to the PreA day (Fig. 3.1 A), following the methodology of Aleemullah (Aleemullah *et al.*, 2000). During the first days of floral bud development (9 to 6 PreA), the sepals cover all the floral bud structures, and from day 5 to 1 PreA the petals emerge and enlarge more than the sepals, at this point the petals cover most of the internal floral structure. Prior to the anthesis day, all the internal floral organs have almost completed their development, including the ovules in the ovary (Fig. 3.1 B, C), while on the anthesis day, the petals open, revealing the pistil which includes the stigma, style, the ovary and the ovules, and the processes of anther dehiscence begin (Fig. 3.1 A). In angiosperm plants, flower and fruit development is tightly interrelated because flower development is the stage that precedes pollination and further development of fruit and seed (Primack, 1987).



Fig. 3.1. Flower development in *Capsicum chinense* at PreA and anthesis. (A) PreA stage takes typically 9 days in this plant, shown from left to right in the figure. (B) Longitudinal section of the floral bud at 2 days PreA showing the ovary with ovules, stigma and style, anthers, sepals and petals. (C) Transversal histological section of the ovary showing the ovules joined to the septum, and the ovary wall surrounding loculi and ovules. Histological preparations were stained with toluidine blue.

#### 3.4.2 Anatomical characterization of the ovule

The histological analysis of the sections of ovary samples during the different PreA days showed that at day 9 PreA the ovule is visible, showing an inclination in its growth. This inclination shows an outstanding growth of the integument on the convex side (Fig. 3.2 A). Most of the ovules in angiosperms present a curvature; this characteristic allows the micropyle to remain close to the placenta. The micropyle is the structure through which the pollen tube passes during fertilization (Endress, 2011).

In the ovules pertaining to the 9 days (PreA), three main zones can be seen during their emergence. The first zone corresponds to the outer layer which gives origin to the dermal layer, while the second zone corresponds to the subdermal layer which presents anticlinal and periclinal divisions, and the underlying tissue from which the procambium will originate represents the third zone (Fig. 3.2 A'). Subsequently, the nucellus tissue and the megaspore mother cell (MMC) differentiate from the first two zones. At 8 PreA (Fig. 3.2 B), the archesporium cell is observed, and it is surrounded by a layer of nucellus cells. Both the archesporium and the nucellus cells are being invaginated by the integument, which is composed of at least four layers of cells. A close-up of the nucellus cells showed that the tissue oriented to the micropylar axes is formed by a single layer of cells, while in the chalazal axis the nucellus is composed of three layers (Fig. 3.2 A'). The ovules of 7 PreA analyzed, showed the integument completely surrounding the nucellus and the archesporium cells. The integument showed at least 13 layers of cells in the widest area oriented to the micropyle axis (Fig. 3.2 C). In the integument tissues next to

the nucellus, the two most internal cell layers acquire an elongated form and are orientated tangentially in a palisade-like cell structure, which further differentiates in the endothelium; these cells stain stronger than the rest of the integument cells (Fig. 3.2 C). The chalazal axis shows one cell which stains less than the rest of the integument cells, with a greenish tone. A close-up of the archesporium and nucellus cells showed that the former is a binucleate cell that stains stronger than nucellus cells at this stage, while the nucellus still has one cell layer in the micropyle axis (Fig. 3.2 C<sup>'</sup>).

At 6 PreA, the ovules have the anatropous shape with a significant differentiation in the integument tissues where at the base of the funiculus, a group of procambial cells starts to differentiate to extend the chalazal axis. Additionally, the integument shows the micropyle channel (Fig. 3.2 D). The close up of the area corresponding to the chalaza and megasporial cells shows the presence of four megasporial cells, and the nucellus cells are still present (Fig. 3.2 D'). The ovules of 5 PreA display two layers of endothelial cells that stain stronger than the rest of the integument cells, while the nucellus encloses a group of cells, two of which show the strongest staining in the megasporial cells (Fig. 3.2 E). The megasporial cell adjacent to the chalazal axis is larger than the megasporial cell oriented to the micropyle axis. At this stage, the bigger cell might be initiating the differentiation of functional megaspore cell (FM) and the degradation of the rest of megasporium cells (Fig. 3.2 E'). At 3 PreA, the endothelium still stains stronger than the rest of the cells. Two cells are also present inside the endothelium (Fig. 3.2 F). At this stage, the nucellus cells are disorganized and start to disappear. In contrast, the functional megaspore divided into two cells that are polarized at the chalazal and micropyle axis (Fig. 3.2 F'). At 1 PreA, the endothelium cells of the ovule maintain the palisade-like arrangement and still stain stronger than the chalazal area and the rest of the integument. At this moment, the chalazal area contains more cells than in previous stages (Fig. 3.2 G). A close up of the endothelium area shows that the nucellus is absent and four nucleated cells are visible (Fig. 3.2 G').

At anthesis day, the ovule is wholly developed and is formed by the integument (Int) and the embryo sac (ES); at this stage, the ovule is mature (Fig. 3.2 H). The

embryo sac shows two nucleated cells close to the center; these cells become the polar cell, while at the micropyle axis, two strongly staining elongated cells are present (Fig. 3.2 H'). The last cells become the synergids. On the chalazal axis, inside the embryo sac, the parental cells for antipodals were not clearly distinguished, but in multiple tissue sections, they were observed.



Fig. 3.2 Histology of the ovules during the floral bud development.

Observations were carried out at 9 days (A and A'), 8 days (B and B'), 7 days (C and C'), 6 days (D and D'), 5 days (E and E'), 3 days (F and F'), 1 day (G and G') at PreA stage, and at anthesis (H and H'). Tissue sections were of 3  $-5 \,\mu\text{m}$  thin, stained with toluidine blue, and observed at 40 X and 200 X (these last labeled with apostrophe). Arrows indicate in A the inner epidermis of the ovary wall, in A' they show the three zones of the ovule. In B' indicating the nucellus and the megaspore mother cell (MMC). In C the arrows point to the chalaza and micropyle. In C' indicating the megaspore dyad, endothelium and micropyle channel. In D the arrow highlights the micropyle and in D' the nucellus and the megaspore in tetrad. In E' indicating the fundamental megaspore. In F the arrow shows the endothelium and in F' the nucellus and embryo sac in two nucleated stages. In G arrows indicate the chalaza and embryonic sac, and in G' the embryonic sac at four nucleated stages. In H' the mature embryonic sac, polar nuclei, the egg cell and sinergids are indicated. In the pictures, inner epidermis (in. epi), cell zones (I, II, III), integument (Int), funiculus (Fu), megaspore mother cell (MMC), chalaza (Ch), micropyle (Mi), endothelium (Ent), fundamental megaspore (FM), embryonic sac (ES). The size of the bars inside the images are 40 µm (A, B, C, D, E and F), 20 µm (A', B', C', D', E', F'), 75 µm (G and H), and 30 µm (G' and H').

#### 3.4.3 Immunohistochemical detection during the development of the ovule

The immunodetection of the pectin with JIM5 and JIM7 antibodies showed that at 9 PreA day the low-esterified pectin (JIM5) was preferentially located in the outer layer of the ovule (Fig. 3.3 A, A'), while JIM7 cross-reacted homogeneously with all cell layers of the ovule (Fig. 3.3 B, B'). These results indicate that the integument cells are actively dividing and that they have a high content of esterified pectin. Immunodetection of esterified and low-esterified pectin at the archesporial cell in the ovule produced similar intense signals among the nucellus cells and the outer layer of the integument (Fig. 3.3 C, C', D, D'), suggesting similar content of lowesterified and highly esterified pectin in these cells. However, in the internal cells of the integument, the JIM7 antibody produced a stronger signal in comparison with that of JIM5 (Fig. 3.3 C, D), indicating more highly methyl-esterified pectin.



Fig. 3. Immunolocalization during ovule development of highly methylesterified and low-methyl-esterified pectin with Alexa Fluor 488-conjugated JIM7 and JIM5 antibodies. Stages of 9, 8 and 6 days PreA and anthesis were

analyzed. After immunoreaction with JIM5 or JIM7 (green signal), the preparations were stained with DAPI to see the nuclei. Figures labeled with apostrophes are a superposition of images for immunoreaction and DAPI staining (blue signal). The size of the bar inside the images is 50 µm.

Similar fluorescent signals for JIM5 and JIM7 were observed among the cell walls of the cells in the layers corresponding to the integument and the four megasporial cells. Interestingly, the JIM5 antibody produced a stronger signal in the cell wall of nucellus cells (Fig. 3.3 E, E') compared to that of JIM7 (Fig. 3.3 F and F'). These findings support the possibility that nucellus cells are quickly demethylating and differentiating in the ovule.

The JIM5 antibody produced a heterogeneous signal in the floral bud at the day of anthesis; in the innermost layers of the integument cells, corresponding to the endothelium, the antibody did not produce fluorescence, but in the middle and outer layers, the signal increased towards the external cell layer. The layer delimiting the embryo sac also produced a strong signal (Fig. 3.3 G, G'). In contrast, JIM7 produced a low signal in the layer delimiting the embryo sac and at the inner and middle cell layers of the integument (Fig. 3.3 H, H'). Both antibodies produced similar signals in the outer cell layer, but in the chalazal cells, JIM5 immunoreacted with a group of cells (Fig. 3.3 G, G'), while JIM7 gave a strong signal only in a single cell (Fig. 3.3 H, H'). Taken together, these results show that when the ovule has reached maturity, most cell walls have little highly methylesterified pectin.

# 3.4.4 Fruit developmental stages

As a result of the monitoring of fruit development at 3, 5, 10, 20, 30 and 40 DPA (Fig. 3.4 A), an increase in whole fruit size can be observed over time. The fruits of 3 DPA were < 4 mm and had a small pericarp, shorter than the sepals. During the following days, the pericarp increased its size while the sepals stopped their growth. At 10 DPA the pericarp had enlarged, reaching a length between 1.2 and 1.5 cm and a width between 0.8 and 1.2 cm, while maintaining a smooth surface.

At 40 DPA, the length of the pericarp (fruit) increased to 4.5-5.0 cm and the width to 3.0-3.5 cm. At this stage, the pericarp showed some clefts on its surface, and a change in the color from green to greenish-orange was observed; this transition indicated that the chili pepper was physiologically mature. Parallel with the growth of the chili pericarp, the development of all the fruit tissues progressed (Fig. 3.4 B, C, D). Fruits at 10 DPA had seeds with a faint green hue (Fig. 3.4 B); longitudinal and transversal sections of fruits at 30 DPA showed the seeds were attached to the base and middle part of the placental tissue (Fig. 3.4 C). At this stage, the seeds have reached their maximum size, although they have not reached maturity. Mature fruits of 40 DPA become orange and have creamy yellow seeds joined to placental tissues; the seed color and hardening of the testa indicate that the seeds are mature at this point (Fig. 3.4 D).



Fig. 3.4. Development of Capsicum chinense Jacq., fruit at different DPA. (A)

Maturation progress is shown from left to right. (B–D) Observation of longitudinal and transversal dissections of *Capsicum chinense* fruits. Important components of the fruit are indicated in fruits of 5 DPA (B), 30 DPA (C) and 40 DPA (D); figures show the loculi and seeds with different degrees of development.

#### 3.4.5 Anatomical characterization of zygotic embryo

The zygote with the first cell division and initial development of endosperm (end) is observed in seeds with 3 DPA; the integument (Int) covers most of the seed. The zygote has a suspensor, and below the suspensor, the micropyle tissue (Mi) was located (Fig. 3.5 A, A'). In this stage, predecessor cells of the testa seed tissue (Te) are observed (Fig. 3.5 A). The endosperm is covered by the endothelium, and all structures are surrounded by the integument (Fig. 3.5 A'). The embryo at the pre-globular stage was completely surrounded by vacuolated-nucleated endosperm cells (Fig. 3.5 B, B'). At 5 DPA, the seeds continue their development with the endosperm (End), embryo (Emb) and integument (Int) increasing their size, and the chalaza cells (Ch) start to scroll from the upper to the lowest position of the seed, close to the micropyle (Fig. 3.5 C, D). The embryo is in progress between the globular and heart stages, with a well-defined protodermis (Pd), while the suspensor cells are not observed (Fig. 3.5 C', D').

Histological analysis of seeds collected from fruits at 10 DPA shows that the seeds have almost completed their growth, the testa delimited the size of the seeds; nevertheless, the embryo is still in the torpedo, and cotyledonary stage with a suspensor joined to placental tissue (Fig. 3.5 E, E', F, F'). At this point, the presence of a corrosion cavity in the endosperm can be clearly observed; these cavities become evident at the globular stage. At 20 DPA, the embryo has a semi-conical shape, with nucleated periderm cells and two cotyledons, one of them larger than the other (Fig. 3.5 G). In seeds collected at 30 DPA, the embryo is increasing in size, and one cotyledon is larger than the other (Fig. 3.5 H). Histological analysis showed that the embryo had not completed its maturity since the integument is still a wide area of the seed. It is well known that in mature seeds

from *Capsicum* spp., the integument is a single layer of cells or it is absent in some cases (Watkins and Cantliffe, 1983). The corrosion cavity (cc) remains present at this stage, and the cotyledonal embryo is filling it (Fig. 3.5 H). Histology of seeds collected at 40 DPA shows that they have a lignified testa, with an integument presenting fewer cell layers in comparison with previous stages, but which is more abundant in the area where the seed attaches with the placenta; at this point the embryo has reached maturity, filling the corrosion cavity and together with the endosperm, occupying most of the seed structure (Fig. 3.5 I).



Fig. 5. Micrographs from *Capsicum chinense* seeds at different stages of development. Testa (Te), integument (Int), endosperm (End), embryo (Emb), chalaza (Ch), hypostases (Hyp), micropyle (Mi), suspensor (Su), endothelium (Ent), cotyledons (Co), shoot apical meristem(SAM), radicle apical meristem

(RAM), procambium (Pc) ground meristem (Gm). The size of the bars inside the images are 250  $\mu$ m (A and B), 50  $\mu$ m (A'), 75  $\mu$ m (B'), 450  $\mu$ m (C and D), 20  $\mu$ m (C' and D'), 450  $\mu$ m (E and F), 50  $\mu$ m (E' and F'), and 500  $\mu$ m (G, H and I).

3.4.6 Immunohistochemical detection of pectin with JIM5 and JIM7 antibodies in zygotic embryo

The immunoanalysis with JIM5 and JIM7 antibodies shows similar staining of seeds at 3 DPA compared to those observed on the cell walls of the ovule at anthesis day. Although the JIM5 antibody produced a single visible signal in the endosperm (Fig. 3.6 A, A'), the JIM7 produced a low signal in all of the integument cells which also shows a large nucleus (Fig. 3.6 B, B'). When the developing seeds showed embryos at an early globular stage, JIM5 produced a stronger signal in the endosperm in comparison with that of JIM7. It was remarkable that the signal in the endosperm was detectable for the first time with both antibodies, deeper in the area surrounded by the integument (Fig. 3.6 C, C', D, D'). JIM5 and JIM7 produced a strong signal in two or three narrow cell layers of the internal face in the integument (Fig. 3.6 C, C', D, D'). A closer observation of the embryo at an early globular stage shows that JIM7 immunoreacts with the external cell layers of the suspensor and cell walls inside the embryo cells (Fig. 3.6 E, E'). The signal produced by the binding of JIM5 is similar to that of JIM7, but JIM5 does not bind to the internal cell layers of the embryo or suspensor cells (Fig. 3.6 F, F'). These results support the recognition of cell walls only in differentiated cells by JIM5, while JIM7 recognizes cell walls in cells transiting to differentiation. Moreover, a closer inspection of embryo cells tested with JIM7 revealed dividing cells with the signal in the cytoplasm and around the nucleus (Supplementary Fig. S1). The result is consistent with that found by Baluska et al. (2002) in the cells of maize root meristem treated with Brefeldin A (BFA), an inhibitor of cell exocytosis, and where JIM7 immunoreacted into the compartment produced by BFA treatment.



Fig. 3.6. Immunolocalization in ovule and embryo at 3 DPA of methyl-esterified and low-methyl-esterified pectin. Samples at 3 DPA were processed as described in Fig. 3, and images labeled with apostrophes are a superposition of images for immunoreaction and DAPI staining. Green signal (JIM5 or JIM7 antibody recognition), blue signal, DAPI staining of nuclei. The size of the bars inside the images are 50  $\mu$ m (A, B, E, and F) and 75  $\mu$ m (C, C'; D and D').

In the mature embryo (20 DPA), JIM5 produced a strong cross-reaction with the cells that originate from the pro-vascular tissues and less binding in the area that surrounds the apical meristem (Fig. 3.7 A, A'). In contrast, the JIM7 antibody produced a very low signal in both areas (Fig. 3.7 B, B'). The root apical meristem area (RAM) immunoreacted with JIM5, while the JIM7 did not bind with any cells of the RAM area (Fig. 3.7 D, D'). Additionally, the JIM5 immunoreacted more strongly

with cell layers that might differentiate into vascular tissues than with cells close to the RAM. The calyptra emitted a very low fluorescent signal in cell layers that delimits the protoderm (Fig. 3.7 C, C'). JIM5 binds homogenously and strongly with all cotyledonal cells (Fig. 3.7 E, E'), while JIM7 immunoreacted poorly with cell walls of these cells (Fig. 3.7 F, F'). In the hypocotyl hook area, the JIM5 antibody binds heterogeneously with the embryo tissues; cells close to the endosperm cross-reacted more strongly than the cells close to the integument, showing a gradual attaching of JIM5 antibody (Fig. 3.7 G, G'). JIM7 antibody produced a weak signal mainly in the provascular area, while the rest of the embryo tissue did not show cross-reaction (Fig. 3.7 H, H').


Fig. 3.7. Immunolocalization in embryo at 20 DPA of methyl-esterified and low-methyl-esterified pectin. Samples were processed as described in Fig. 3, and images labeled with apostrophes are a superposition of images for methylated or low-methylated pectin immunoreaction (green) and DAPI staining (blue). The size of the bars is 50  $\mu$ m, except in G and G' where it is 75  $\mu$ m.

#### 3.5 Discussion

This report makes a significant contribution to the fundamental knowledge of the morpho-histological changes and the status of pectin esterification in the different cell lineages in the megasporogenesis, megagametogenesis, and zygotic embryogenesis processes in Capsicum chinense Jacq., a domesticated species with increasing commercial interest (Raveendar et al., 2017). Other descriptions in Capsicum species have been partial, focusing on some specific developmental stages (Dharamadhaj and Prakash, 1978; Filippa and Bernardello, 1992; Ghimire and Heo, 2012); this is the first report addressing the study of all steps in these processes, as a whole. The monitoring of nine days before flowering (Fig. 3.1) and from the ovule-pollination to 40 DPA, enabled us to identify each stage of cell differentiation from somatic cells to female gamete and embryo development (Figs. 3.2, 3.5). Additionally, the immunodetection with the JIM5 and JIM7 antibodies in tissue sections of the primary developmental stages revealed the dynamic changes in the degree of methyl-esterification of pectin in cell walls of the different cell lineages during the ovule differentiation to mature zygotic embryo (Figs. 3.3, 3.6, 3.7). The information obtained in this work can be used in future genetic improvement programs and will allow us to learn from zygotic embryogenesis to further identify the bottlenecks in other embryogenic processes (Winkelmann, 2016).

#### 3.5.1 Megasporogenesis and megagametogenesis

The main histological findings during the ovule formation in *C. chinense* are described below. The observation of the progress of the ovule from 9 PreA to anthesis shows that the archesporial cell follows a polygonum-type pattern division until the formation of the embryo sac is complete, and the ovules adopt their anatropous shape. Polygonum-type pattern division and the anatropous shape of the ovule are characteristic of the Solanaceae family, e.g., *Withania somnifera* (Bittencourt and Mariath, 2002; Dharamadhaj and Prakash, 1978; Ghimire and Heo, 2012). Toluidine staining produced acceptable contrast among the different

cell types, allowing the distinction between the chalaza cells, the micropyle cell layer, the integument and most importantly, the cell differentiation of the embryo sac (Fig. 3.2). At the early and middle stages (9 to 6 PreA), the ovule is covered by the integument (Fig. 3.3 C, C', D, D', E, E'), which is probably involved in the protection of the embryo sac development and nutrition of the embryo, as described in Taraxacum genus in the Asteraceae family (Musiał et al., 2013). The ovule of C. chinense shows one integument, which is characteristic of more evolved plants (Endress and Igersheim, 2000; Wang and Ren, 2008). This is consistent with descriptions in other Solanaceae (Ghimire and Heo, 2012). However, the histological study could be improved by using additional dyes to stain starch, proteins, lignin, and lipids in order to obtain an integral picture of histological and metabolic changes. Regarding the 5 to 1 PreA and the anthesis day, they contained all the structures of mature flowers, including a high number of ovules in the ovary (Fig. 3.1 B). At the anthesis day, the flower contains mature ovules as revealed by their structural organization (Fig. 3.1 C), showing two synergid cells, one egg cell located in the micropyle sac and one polar nucleated cell positioned at the center of the embryo sac, together with vestiges of the antipode cells in the chalazal side (Fig. 3.2 H, H'). These findings were in concordance with an earlier description of *Capsicum annuum* (Dnyansagar and Cooper, 1960). However, after ovule fertilization a lower number of seeds are usually observed in C. chinense fruits, thus suggesting a high ratio of ovule abortion. This phenomenon has been described in Solanum phureja where approximately half of their ovules degenerate at pollination (Dnyansagar and Cooper, 1960).

After pollination, the fertilized fruits remain joined to the plant, growing in size, while non-pollinated fruits become yellow and are aborted. The degree of development of pollinated fruit and the maturity correlate with the seed development, which is why this is a simple criterion suitable to study the embryogenic process (Darnell *et al.*, 2012; Munting, 1974).

3.5.2 High methyl esterification of pectin is associated with cell proliferation during megasporogenesis and megagametogenesis

During cell differentiation in megasporogenesis and megagametogenesis, the cell walls are subjected to dynamic chemical modifications. The degree of pectin methyl-esterification in cell walls is one of the critical factors that govern the fate of cells during differentiation, and currently it is used as a marker of the primary morphogenic events (Bidhendi and Geitmann, 2016; McCann and Roberts, 1994; Solís et al., 2016). The dynamic degree of methyl-esterification pectin detected with JIM5 and JIM7 antibodies in the earlier stages of megasporogenesis in C. chinense, revealed a higher proportion of highly methylated pectin which is consistent with a large number of highly dividing cells (Fig. 3.3 A, B). As megasporogenesis progressed, the immunorecognition with JIM5 of low-esterified pectin in archesporial and nucellus cell walls were abundant in the tissues. It is interesting to note that the integument area adjacent to the nucellus did not immunoreact with JIM5, while the JIM7 immunoreaction was similar in the integument, archesporial cell, and nucellus cells (Fig. 3.3 C, C'). The labeling pattern suggests that the integument grows actively from the adjacent area of nucellus cells to the outside and that the most external cell layer is more differentiated than the rest of the integument cells.

The degree of pectin esterification in the integumentary cell walls and the four megasporial cells was similar when it was detected with JIM5 and JIM7 (Fig. 3.3 E, F), which suggests a high presence of both types of pectin in cell walls at this stage. It is remarkable that the labeling with JIM5 increases in the cell wall of nucellus cells as the maturity of the ovule increases. The increase in the deesterified pectin in the cell wall of the nucellus cells could be related with priming of the tissue for degradation or absorption (Fig. 3.3 E). The patterns of immunolabelling of the JIM5 and JIM7 antibodies, during the MMC formation and the four megaspore differentiations after meiosis in *Anona cherimola* and *Persea americana* (Lora *et al.*, 2017) were similar to the results found in this study. These results indicate that the dynamics change in methyl-esterification of pectin in cell

walls during megasporogenesis and megagametogenesis in angiosperms is mainly conserved, and our results are consistent with current knowledge. Curiously, the MMC and the four megaspore cells in *Arabidopsis thaliana* show different immunological patterns in comparison with those found in *A. cherimola* and *P. americana* (Lora *et al.*, 2017) and the results observed here; however, they were similar to the pattern observed in late stages of the megagametogenesis in *C. chinense*; according to Lora *et al.* (2017), these differences can be related to the position of the plant on the evolutionary scale.

# 3.5.3 Zygotic embryogenesis

Histological analyses of the early development of the fruit show the zygote and all other tissues that will give rise to the mature embryo and seeds (Fig. 3.5 A, A', B, B'). As observed during megagametogenesis, the integument increases the number of cell layers in young seeds until the full size of the seed is reached, as described by Filippa and Bernardello (1992) in *Athenaea, Aureliana* and *Capsicum* genera. Inside the integument, the micropyle and chalaza with vascular bundles expand towards the placental tissue. At early stages of embryo development, the endosperm has a "cellular type" division which is common in the Solanaceae family (Fig. 3.5 B, C). The integument accumulates nutrients to support embryo nutrition in further stages (Ghimire and Heo, 2012); when the seed reached maturity, the integument was reduced to only one or two cell layers.

The first histological report on *Capsicum* histology by Cochran (1936) was beneficial for the present work because he described in detail the complete ontogenic process, from the megasporogenesis to the embryogenesis (Cochran, 1938). This report enables us to analyze and classify all the stages studied here. However, one limitation of Cochran's work is that the results were recorded in drawings and many cell details are missing. Modern studies use photographic records, where resolution and structural details are better seen, but most of them focus on the subcellular localization of particular RNAs or proteins in specific stages and do not describe in detail the anatomic structures. In this report, a photographic record was carried out for all the stages of ovule and seed development in *C. chinense*, from megasporogenesis to mature embryo. Some anatomical structures, previously not described in *Capsicum*, were clearly observed, for example, the hypostases (Fig. 3.5 B'), which is probably a source of plant growth regulators or nutrients as was suggested in *Theobroma cacao* (Hasenstein and Zavada, 2001), and "the corrosion cavity", an empty space that enables the embryo to grow (Fig. 3.5 C-I) (Buchholz, 1918). It is important to emphasize that this is the first report in *Capsicum* where the full embryogenesis is histologically analyzed and can serve as a reference for further studies, in this and other genera. It is surprising that "the corrosion cavity" has not been described in previous reports of *Capsicum* (Cochran, 1936; Filippa and Bernardello, 1992) because it is clearly evident.

At 10 DPA, all the embryo cell tissues were defined as a torpedo stage, and from there, the embryo begins maturation by enlarging and increasing cell characteristics that are observable at 20, 30 and 40 DPA (Fig. 3.5 F-I). During these maturation stages, the embryo changes its shape, showing an evident hook, which is probably a result of the differences in cell number and cell wall composition between the internal and external cell layers of the embryo surface. As a result of these differences, the cotyledon from the external face is the largest during maturation. Similarly, it may be possible that close communication between the embryo and endosperm is occurring to control the volume of "the corrosion cavity" thereby facilitating embryonic growth.

3.5.4 De-methyl esterification of pectins during zygotic embryogenesis in relation to embryo differentiation

Analysis of the dynamics of methyl-esterification pectins in the cell wall of embryo cells showed that pre-globular embryos contain a high level of methyl-esterified

pectins in the inner and outer cell walls, while low-esterified pectins are very scarce. The high content of methyl-esterified pectins is congruent with the high number of cells in division in this stage. Similar labeling patterns with JIM5 and JIM7 antibodies were observed in zygotic embryos of *Capsicum annuum* and in young haploid embryos derived from pollen (Bárány et al., 2010; Bárány et al., 2005; Bueno et al., 2005; Raghavan, 1986). The results support the proposal that high levels of methyl-esterified pectin mark morphogenic cells, as in the case of the apical cells of the globular zygotic embryo in this study. The high level of methylesterification in the cell walls of first stage zygotic embryos can be extrapolated to somatic and microspore embryogenesis because similar patterns were observed during the transition from somatic proembryos to early globular embryos in banana (Musa spp. AAA, cultivar 'Yuveyoukang 1') and in microspore embryos of Capsicum annuum (Bárány et al., 2010; Xu et al., 2011). All these findings, together with the observation that actively dividing embryo cells of Capsicum chinense produce a strong signal with JIM7 in the cytoplasm surrounding the nucleus, give support to the recycling of pectins by exocytosis / endocytosis and represent a significant mechanism of pectin turnover during morphogenetic processes, as proposed by Baluska et al. (2002).

At advanced stages, low-methyl esterification increases gradually through the whole process of embryo maturation (Fig. 7 B, D, F, H). In *C. annuum*, the JIM5 antibody preferentially labels differentiated cells in mature embryos (Bárány *et al.*, 2010; Bárány *et al.*, 2005). Low-methyl-esterified pectin was detected in *C. chinense* cells near the shoot apical meristem (SAM), root apical meristem (RAM), the cotyledon, provascular tissues and parenchymal cells of the hypocotyl (Fig. 7 A-D). It is known that de-esterification produces negative charges (Wolf *et al.*, 2009) and improves the capacity of ion exchange and water-binding (Chen *et al.*, 2015; Kauss and Z. Hassid, 1967) if de-methyl-esterified pectate cross-links with Ca<sup>2+</sup> it becomes rigid "hard" pectin which receives the name of "egg boxes" (Peaucelle *et al.*, 2012). De-methyl esterification of cell wall pectin also plays a role in seed germination (Müller *et al.*, 2013). Many reports have clearly established that pectin esterification/de-esterification plays a key role in differentiation during

plant megasporogenesis and embryogenesis. Our findings in *C. chinense*, showing the changes in pectin esterification/de-esterification patterns suggest that this plays a vital role in governing the coordination of cell division and differentiation in embryogenesis. The complete histological characterization from megasporogenesis to embryogenesis carried out in this study has established a reference for decision-making in further studies on *C. chinense*, i.e., a comparison between zygotic and somatic embryogenesis will display which stages prevent the latter from achieving an efficient production of healthy embryos.

# 3.6 Conclusion

The information obtained from the critical steps during the ovule and zygotic embryo formation can be used in future genetic improvement programs or can help to design strategies to manipulate and eventually prevent the generation of aberrant embryos in somatic and microspore embryogenesis in *C. chinense*. This study is part of the research we are developing aimed at elucidating the biochemical and molecular bases of the recalcitrance of the genus *Capsicum*.

Acknowledgments

J. Pérez-Pastrana wishes to acknowledge the support of CONACYT-México with the Ph.D. scholarship No. 264523.

Funding:

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) [grant number 219651] and the Spanish MINECO and European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) [grant numbers AGL2014-52028-R and AGL2017-82447-R]

#### 3.7 References

Aleemullah, M., Haigh, A.M., Holford, P., 2000. Anthesis, anther dehiscence, pistil receptivity and fruit development in the Longum group of Capsicum annuum Aust. J. Exp. Agric. 40, 755-762

Alfred, J.P., Haskins, E.F., Ingrith, D.-O., 1982. Toluidine Blue: A Simple, Effective Stain for Plant Tissues Am Biol Teach. 44, 487-489

Amsbury, S., Hunt, L., Elhaddad, N., Baillie, A., Lundgren, M., Verhertbruggen, Y., Scheller, Henrik V., Knox, J.P., Fleming, Andrew J., Gray, Julie E., 2016 Stomatal Function Requires Pectin De-methyl-esterification of the Guard Cell Wall Curr Biol. 26, 2899-2906

Baluška, F.; Hlavacka, A.; Šamaj, J.; Palme, K.; Robinson, D.G.; Matoh, T.; McCurdy, D.W.; Menzel, D.; Volkmann, D. F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin a-induced compartments. Plant Physiology 2002, 130, 422-431.

Bárány, I., Fadón, B., Risueño, M.C., Testillano, P.S., 2010. Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in *Capsicum annuum* L. J Exp Bot 61, 1159-1175

Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mitykó, J., Risueño, M.C., Testillano, P.S., 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development Biol. Cell. 97, 709-722

Bidhendi, A.J., Geitmann, A., 2016. Relating the mechanics of the primary plant cell wall to morphogenesis J Exp Bot. 67, 449-461

Bittencourt, N.S., Mariath, J.E.A., 2002. Ovule ontogeny of *Tabebuia pulcherrima* Sandwith (Bignoniaceae): megasporogenesis and integument development Braz. J. Bot. 25, 103-115

Buchholz, J.T., 1918 Suspensor and Early Embryo of Pinus Bot. Gaz. Int. J. Plant Sci. 66, 185-228

Bueno, M.A., Pintos, B., Höfer, M., Martin, A., 2005. Pro-embryos induction from *Olea europaea* L. isolated microspore culture Acta Physiol Plant. 27, 695-701

Cochran, H.L., 1936. Some factors influencing growth and fruit-setting in the pepper (*Capsicum frutescens* L.). NY. Memoirs of the Cornell Agricultural Experiment Station 190, 1–39

Cochran, H.L., 1938. A morphological study of flower and seed development in pepper. J Agric Res 56, 395-419.

Chen, J., Liu, W., Liu, C.-M., Li, T., Liang, R.-H., Luo, S.-J., 2015. Pectin Modifications: A Review, Crit Rev Food Sci Nutr. 55, 1684-1698

Darnell, R.L., Cruz-Huerta, N., Williamson, J.G., 2012. Night temperature and source–sink effects on overall growth, cell number and cell size in bell pepper ovaries Ann Bot. 110, 987-994

Dharamadhaj, P., Prakash, N., 1978. Development of the anther and ovule in *Capsicum* L. Austral. J. Bot. 26, 433-439

Dnyansagar, V.R., Cooper, D.C., 1960. Development of the Seed of *Solanum phureja* Am J Bot. 47, 176-186

Dobrowolska, I., Majchrzak, O., Baldwin, T.C., Kurczynska, E.U., 2012. Differences in protodermal cell wall structure in zygotic and somatic embryos of *Daucus carota* (L.) cultured on solid and in liquid media Protoplasma. 249, 117-129

Endress, P.K., 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms Am J Bot. 98, 370-396

Endress, P.K., Igersheim, A., 2000. Gynoecium Structure and Evolution in Basal Angiosperms Int J Plant Sci. 161, S211-S213

Filippa, E.M., Bernardello, L.M., 1992. Estructura y desarrollo de fruto y semilla en especies de *Athenaea, Aureliana* y *Capsicum* (Solaneae, Solanaceae) Darwiniana. 31, 137-150

Furlani, P.R., 1997. Instruções para o cultivo de hortaliças de folhas pela técnica de hidroponia-NFT. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas Boletim Técnico n. 168, 30 pp.

Ghimire, B., Heo, K., 2012. Embryology of Withania somnifera (L.) dunal (Solanaceae) Acta Biol Cracov Ser Bot. 54.

Hasenstein, K.H., Zavada, M.S., 2001. Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao* Physiol Plant. 112, 113-118

Kauss, H., Z. Hassid, W., 1967. Enzymic Introduction of the Methyl Ester Groups of Pectin. J. Biol. Chem., 242, pp. 3449-3453

Kurczynska, E.U., Potocka, I., Dobrowolska, I., Kulinska-Lukaszek, K., Sala, K., Wrobel, J. 2012 Cellular markers for somatic embryogenesis, Embryogenesis. InTech, Rijeka pp 307–332

Lengel, P.A., 1960. Development of the pollen and the embryo sac in *Capsicum frutescens* L. var. Japanese variegated ornamental. OHIO J SCI. 60, 8-12.

Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N., Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F., Bellincampi, D., 2007. Overexpression of Pectin Methylesterase Inhibitors in *Arabidopsis* Restricts Fungal Infection by Botrytis cinerea Plant Physiol. 143, 1871-1880

Lora, J., Herrero, M., Tucker, M.R., Hormaza, J.I., 2017. The transition from somatic to germline identity shows conserved and specialized features during angiosperm evolution New Phytol. 216, 495-509

McCann, M.C., Roberts, K., 1994. Changes in cell wall architecture during cell elongation J Exp Bot. 45, 1683-1691

Müller, K., Levesque-Tremblay, G., Bartels, S., Weitbrecht, K., Wormit, A., Usadel, B., Haughn, G., Kermode, A.R., 2013. Demethylesterification of Cell Wall Pectins in *Arabidopsis* Plays a Role in Seed Germination Plant Physiol. 161, 305-316

Munting, A.J., 1974. Development of flower and fruit of *Capsicum annuum* L Acta Bot Neerl. 23, 415-432

Musiał, K., Płachno, B.J., Świątek, P., Marciniuk, J., 2013. Anatomy of ovary and ovule in dandelions (Taraxacum, Asteraceae) Protoplasma. 250, 715-722

Peaucelle, A., Braybrook, S., Höfte, H., 2012. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited Front Plant Sci. 3, 121

Primack, R.B., 1987. Relationships Among Flowers, Fruits, and Seeds Annu Rev Ecol Syst. 18, 409-430

Rafińska, K., Bednarska, E., 2011. Localisation pattern of homogalacturonan and arabinogalactan proteins in developing ovules of the gymnosperm plant Larix decidua Mill Sex Plant Reprod. 24, 75-87

Raghavan, V., 1986. Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study. Cambridge University Press 17.

Raveendar, S., Lee, k.j., Shin, M.-J., Cho, G.-T., Lee, J.-R., Ma, K.-H., Lee, G.-A., Chung, J.-W., 2017. Complete Chloroplast Genome Sequencing and Genetic Relationship Analysis of *Capsicum chinense* Jacq. Plant Breed. Biotech. 5, 261-268

Reiser, L., Fischer, R.L., 1993. The Ovule and the Embryo Sac Plant Cell. 5, 1291-1301

Rodríguez-Sanz, H., Solís, M.-T., López, M.-F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M.C., Testillano, P.S., 2015. Auxin Biosynthesis, Accumulation, Action and Transport are Involved in Stress-Induced Microspore Embryogenesis Initiation and Progression in *Brassica napus* Plant Cell Physiol. 56, 1401-1417

She, W., Grimanelli, D., Rutowicz, K., Whitehead, M.W.J., Puzio, M., Kotliński, M., Jerzmanowski, A., Baroux, C., 2013. Chromatin reprogramming during the somatic-to-reproductive cell fate transition in plants. Development. 140, 4008-4019

Solís, M.-T., Berenguer, E., Risueño, M.C., Testillano, P.S., 2016. BnPME is progressively induced after microspore reprogramming to embryogenesis, correlating with pectin de-esterification and cell differentiation in *Brassica napus*. BMC Plant Biol. 16,176

Wang, Z.-F., Ren, Y., 2008. Ovule Morphogenesis in Ranunculaceae and its Systematic Significance Ann Bot. 101, 447-462

Watkins, J.T., Cantliffe, D.J., 1983. Mechanical Resistance of the Seed Coat and Endosperm during Germination of *Capsicum annuum* at Low Temperature Plant Physiol. 72, 146-150

Willats, W.G.T., Knox, J.P., Mikkelsen, J.D., 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel Trends Food Sci Technol. 17, 97-104

Winkelmann, T. 2016. Somatic Versus Zygotic Embryogenesis: Learning from Seeds, in: Germana, M.A., Lambardi, M. (Eds.), In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Springer New York, New York, NY pp. 25-46

Wolf, S., Mouille, G., Pelloux, J., 2009. Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development Molecular Plant. 2. 851-860

Xu, C., Zhao, L., Pan, X., Šamaj, J., 2011. Developmental Localization and Methylesterification of Pectin Epitopes during Somatic Embryogenesis of Banana (Musa spp. AAA) PLOS ONE. 6. e22992

Yadegari, R., Drews, G.N., 2004. Female Gametophyte Development Plant Cell. 16. 133-141

# Capítulo IV

# DINÁMICA DE LOCALIZACIÓN DE AUXINA: ELEMENTO ESENCIAL PARA EL CORRECTO DESARROLLO EMBRIOGÉNICO EN CHILE HABANERO (Capsicum chinense Jacq.).

# 4.1 Resumen

El correcto desarrollo a partir de una sola célula fecundada es fundamental para el mantenimiento de las especies en los seres vivos, incluyendo las plantas. El cigoto cuenta con un programa de desarrollo que desencadena un patrón de división específico, involucrando el crecimiento, diferenciación y especialización celular, por ende la diferenciación de tejidos que de manera conjunta forman al embrión. El desarrollo de estructuras embrionarias también puede ocurrir a partir de células somáticas que bajo condiciones específicas pueden cambiar su destino para continuar un programa de desarrollo embriogénico. Durante la especialización es indispensable la participación de moléculas señal que permiten que sucedan los cambios morfológicos. La molécula señal indólica derivada del triptófano, el ácido 3 indolacético (IAA), está involucrada en los patrones de división y diferenciación durante el proceso embriogénico; además es considerado como el inductor más importante para desencadenar la embriogénesis somática. En este trabajo, se investigaron los cambios en las diferentes etapas del desarrollo embrionario de los niveles del IAA endógenos, mediante detección inmunohistoquímica y cauntificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, se identificaron los patrones de localización y acumulación del IAA tanto en la embriogénesis cigótica como en la somática de la especie Capsicum chinense Jacq.. Se detectó una acumulación de la señal IAA en las células basales del suspensor y en la hipostasis durante las primeras etapas del desarrollo de la semilla, posiblemente estos tejidos son la fuente de la auxina para el desarrollo del embrión y del endospermo. La acumulación de IAA no presentaron el mismo patrón de localización en las diversas etapas del desarrollo de los embriones somáticos y cigóticos. Los avances obtenidos son relevantes para entender como el IAA regula el proceso embriogénico en Capsicum chinense

Jacq., y entender las anormalidades que se generan en la embriogénesis somática.

#### 4.2 Introducción

El ácido indol 3 acético (IAA) fue la primera fito-hormona en ser descubierta y es la auxina más abundante en las plantas y más estudiado (Davies, 2010), y es relevante en cada uno de los procesos fisiológicos en los que participa, además es absolutamente requerido para la sobrevivencia de la planta. La importancia de esta molécula indólica derivada del triptófano se destaca por su participación en la mayoría de los procesos de diferenciación. La principal vía de biosíntesis durante la embriogénesis cigótica en las plantas es la vía IPA, la cual es dependiente del triptófano y en la que los genes YUCCA codifican la enzima flavin monooxigenasa, que convierte al ácido indol 3 piruvato (IPA) en el ácido indol 3 acético (IAA) (Cheng et al., 2007; Dai et al., 2013). La distribución de la auxina, es uno de los procesos clave en la dirección de los patrones de división y diferenciación, como los que se presentan durante la embriogénesis de plantas (Gil et al., 2001). La dinámica de distribución de la auxina endógena establece una distribución heterogénea entre las células de un tejido y resulta en un gradiente en espaciotiempo. La acumulación de la auxina en áreas específicas está asociada a zonas de activa división celular, así como con la reprogramación celular, estos eventos se reflejan en la reorganización de la cromatina en células sujetas a la acción de la auxina (Pasternak et al., 2002), también en la embriogénesis somática. La dinámica de distribución de la auxina endógena establece una distribución heterogénea entre las células de un tejido y resulta en una concentración en forma de gradiente en espacio-tiempo. Este distribución es fundamental para desencadenar los procesos morfológicos (Vanneste y Friml, 2009), y es uno de los factores que controla el destino de las células embriogénicas (Fehér et al., 2003). Los gradientes máximos de auxina preceden a los distintos eventos preembrionarios *e.g.*, la formación de los cotiledones, del meristemo apical del brote y el meristemo apical de la raíz, la diferenciación del protodermo, y postembrionarios, e.g., formación de raíces secundarias, hojas y flores de la planta

(Benková *et al.*, 2003). La localización gradual de la auxina es fundamental para la formación de nuevos órganos (Benková *et al.*, 2003). La polarización celular de las proteínas se correlaciona con la dirección de la auxina (Friml *et al.*, 2003). El transporte polar de auxinas requiere de la activación de las proteínas de la familia PIN-FORMED (PIN) que permiten que el transporte de la auxina se realice de manera direccional, como resultado de la localización polar de los transportadores PIN (Adamowski and Friml, 2015; Ljung, 2013; Savaldi-Goldstein *et al.*, 2008). Durante la embriogénesis se presentan cambios en la localización de las proteínas PIN, estas pueden ubicarse tanto de manera polar como apolar (Steinmann *et al.*, 1999). El transporte polar de las auxinas es fundamental para que se dé el establecimiento del eje apical-basal del embrión.

En *Arabidopsis thaliana* mediante la evaluación de la expresión de promotor DR5 se ha analizado el comportamiento del IAA en las primeras etapas del desarrollo del embrión (Möller y Weijers, 2009; Robert *et al.*, 2013). Sin embargo, la activación de DR5 no está relacionado directamente con la acumulación de auxina endógena, sino que también puede ser activado por otras moléculas naturales o sintéticas con actividad biológica de tipo auxínico (Vernoux *et al.*, 2011). A pesar de estas limitaciones, gracias a estos estudios se ha determinado que la auxina puede autorregular su transporte y lo hace de manera específica, que generando patrones de localización en los diferentes estadios de desarrollo (Sachs, 1991). Las alteraciones en la distribución endógena de las auxinas se relacionan directamente con deformaciones o alteraciones morfogénicas. Se ha visto que cuando se utiliza el NPA, un inhibidor del trasporte polar de la auxina altera el patrón normal del desarrollo de los embriones somáticos en distintas especies (Fischer-Iglesias *et al.*, 2001; Hadfi *et al.*, 1998; Hakman *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 1993).

Durante la embriogénesis somática de las especies de *Capsicum* se ha observado una severa recalcitrancia, *i.e.*, las estructuras formadas no se desarrollan correctamente por lo que no se asemejan al embrión cigótico; y la presencia de deformaciones o anormalidades afectan el desarrollo del polo apical e impide que los embriones somáticos completen su desarrollo hasta plántulas (Kothari *et al.*, 2010; Ochoa-Alejo y Ramirez-Malagon, 2001). Hasta el momento, las investigaciones realizadas en el género Capsicum no han permitido entender y resolver la problemática de recalcitrancia y el género sigue sin contar con un protocolo eficiente de regeneración de plantas a través de embriogénesis somática. Por lo que es necesario seguir avanzando en las investigaciones para eventualmente encontrar una solución a la problemática de la recalcitrancia de la embriogénesis somática en el género Capsicum. El éxito de esta herramienta biotecnológica podría presentar grandes ventajas para el mejoramiento de las especies del género. Para poder caracterizar la distribución espacio-temporal de la auxina IAA en las células durante la ontogenia de los procesos embriogénicos, en el presente trabajo se empleó la técnica de inmunolocalización usando un anticuerpo especifico anti-IAA. Esta es una herramienta poderosa que analiza los niveles de acumulación de auxina durante los procesos del desarrollo (Hou y Huang, 2005; Krouk et al., 2010; Rodríguez-Sanz et al., 2014), ya gue la fijación química detiene la difusión in situ de la auxina en el tejido. La posición del anticuerpo primario con su epítope se detecta de manera directa o mediante un anticuerpo secundario ligado a una molécula fluorescente. En este estudio se realizó un análisis de la distribución celular del IAA durante el desarrollo del embrión cigótico y somático en Capsicum chinense Jacq., mediante el anticuerpo anti-IAA, así como la detección y cuantificación por HPLC del IAA (Nakurte et al., 2012) durante las diferentes etapas de la embriogénesis cigótica y somática.

#### 4.3 Materiales y métodos

#### 4.3.1 Material vegetal

Como material vegetal se seleccionó a *C. chinenese* Jacq., variedad Mayan Ba' alché. El material para el análisis de la localización y acumulación de la auxina durante la embriogénesis cigótica proviene de plantas mantenidas en invernadero a 33 °C en el día y 21 °C por la noche. La selección del material se inició con la primera floración; para ello, las flores previas a la antesis fueron marcadas, emasculadas, polinizadas, cubiertas con una bolsa de celofán y monitoreadas para su recolección a los 3, 5, 10, 20, 30 y 40 días post antesis (DPA).

El análisis de la distribución y acumulación del IAA durante la embriogénesis somática se realizó con plántulas provenientes *in vitro* según la metodología propuesta por (Santana-Buzzy *et al.,* 2005). Se tomaron segmentos de hipocótilo de aproximadamente 1 cm como explante. Estos fueron colocados en medio MS semisólido adicionado con 13.57  $\mu$ M de Dicamba, e incubados en oscuridad por 15 días para el proceso de inducción y posteriormente los explantes fueron subcultivados en medio MS líquido con 1.1  $\mu$ M de Dicamba por 30 días para la histodiferenciación.

#### 4.3.2 Selección, fijación y tinción de los cortes histológicos

Para el análisis de la embriogénesis cigótica, se recolectaron flores de 3, 5, 10 DPA, y se les extrajo el ovario que contiene los óvulos y en éste último se analizaron los embriones en diferentes etapas. Para el análisis de la embriogénesis somática se colectaron hipocótilos sin tratamiento hormonal, así como de los días 1, 5,10 y 15 del tratamiento con 13.57 µM de Dicamba, y de los días 30 y 45 tratados con 1.1 µM de Dicamba. Las muestras fueron fijadas inmediatamente en una solución de 4 % paraformaldehído y 3 % (w/v) de ethyl-3(3-dimethylaminopropilo) hidroclorido carbodiimida, (EDAC, Sigma) en PBS pH 7.4. Las muestras se almacenaron a 4 °C por toda la noche. Después de la fijación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS por 10 minutos. Enseguida, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona (30, 50, 70, 90 y 100 %, por una hora en cada concentración), e incluidas en resina (Technovit 8100 a 4 °C). Los tejidos incluidos fueron seccionados a 2 - 3 µm de grosor. Una parte de las secciones de tejido fueron teñidas con azul de Toluidina 0.05 % (w/v). Las secciones destinadas a la inmunolocalización fueron seccionadas con un ultra micrótomo (Microm GmbH, mod. HM340E) a secciones de 2-3 µm, y colocadas en portaobjetos tratados con APTES (Rodríguez-Sanz et al., 2015). Alguna de las secciones fueron teñidas con 0.05 % de azul de Toluidina disuelto en agua destilada (Alfred et al., 1982). Las preparaciones permanentes se colocaron en Eukitt y se observaron en un microscopio de campo claro (Zeiss Axioplan 2).

#### 4.3.3 Inmunolocalización del IAA

La inmunolocalización del IAA se realizó en las secciones de tejido colocadas en los portaobjetos tipo multipocillos, cargados con APTES. Las secciones de tejido se incubaron en PBS por 2 minutos. En seguida, el tejido se blogueó con 5 % (w / v) de albumina suero bovino (BSA) en PBS por 10 min. Concluido el blogueo, los cortes se incubaron con una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal anti-IAA (Sigma, Cat. No A0855) por 1 h. El tejido se lavó tres veces con PBS por 5 min, y se incubó por 45 min en condiciones de oscuridad con una dilución 1:25 del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) de acuerdo con Testillano et al. (2013). Los tejidos fueron lavados con PBS, 6 veces por 5 min cada uno y enseguida tratados por 10 min con 1 mg.mL<sup>-1</sup> de DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindol) para teñir los núcleos. Se realizó un último lavado con PBS por 2 min y las muestras se colocaron en Mowil para su análisis en el microscopio laser confocal (Leica TCS-SP5-AOBS). Las imágenes se analizaron con el software LCS Leica versión 2.5. La adquisición de las imágenes teñidas con DAPI se realizó a 350 nm de longitud de excitación (Ex) y a 470 nm de longitud de emisión (Em). El análisis del espectro de la auto fluorescencia de los cloroplastos se realizó en una longitud de excitación de 470 nm y de 680 de longitud de emisión. La detección del anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 se realizó a la longitud de onda de excitación de 495 nm y de emisión de 519 nm.

#### 4.3.4 Controles de la inmunolocalización del IAA

Los controles negativos de inmunolocalización del IAA, consistieron en incubar las secciones de tejido únicamente con el anticuerpo secundario y en remplazar el anticuerpo primario por una solución de PBS. Además, se realizaron ensayos de inmunodepleción del anticuerpo primario con (IAA), para ello el anticuerpo anti-IAA se incubó toda la noche con una solución de IAA (5 mg.mL<sup>-1</sup>) en proporción 1:2 (v.v<sup>-1</sup>) a 4 °C. El anticuerpo conjugado al IAA se utilizó como anticuerpo primario para la inmunolocalización del IAA (Rodríguez-Sanz *et al.,* 2015).

# 4.3.5 Cuantificación del IAA por HPLC

El material colectado en los diferentes tiempos y tratamientos durante la embriogénesis cigótica o somática del chile habanero fueron extraídos siguiendo el protocolo de Nakurte et al. (2012) para cuantificar el IAA endógeno; las muestras para estos ensayos fueron parte de las réplicas colectadas para el análisis de inmunolocalización del IAA. Brevemente, se pesó 1 g de peso fresco de cada muestra e inmediatamente se molió con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido. El tejido se extrajo con metanol 100 % (2.5 mL.g p f<sup>-1</sup>). La solución se filtró en una precolumna C18 SPE. Se utilizaron como estándares internos el ácido indol 3 pirúvico (IPA, Sigma-Aldrich), y el ácido 3 indol acético (IAA, Fluka Analytical) para la preparación de las curvas de calibración. Los extractos concentrados en acetonitrilo (0.1 mg.mL<sup>-1</sup>) se analizaron en la fase móvil compuesta de metanol y 1% de ácido acético (30:70), en modo isocratico, con un flujo de 1 ml.min<sup>-1</sup>. El estándar de IAA presentó un tiempo de retención de 11.78 min y el IPA un tiempo de retención de 28.9 min. La cromatografía se realizó en una columna Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent Technologies) de fase reversa acoplada a un HPLC Agilent 1100, equipado con detector de fluorescencia. La detección de los compuestos se realizó a 282 nm excitación (Ex) y 360 nm de emisión (Em). El análisis de varianza ANOVA se realizó con el programa IBM SPSS Statistics Subscrition 2017.

#### 4.4 Resultados

# 4.4.1 Inmunocitolocalización del IAA durante la embriogénesis cigótica en *C. chinense*

La tinción con azul de toluidina y los análisis histológicos mediante microscopía de campo claro, mostraron que durante las primeras etapas del desarrollo de la embriogénesis cigótica en *C. chinense* los primeros cambios celulares a nivel morfológico ocurren instantes después de la doble fecundación de la célula huevo y los núcleos polares. Se encontró que a partir de la diferenciación de las células del saco embrionario se desarrollan el embriogénesis cigótica se detectó que el

integumento constituye la mayor parte del óvulo y rodea al endotelio que es el tejido que delimita al endospermo. También se observa el desarrollo de la hipostasis, tejido que interrumpe la continuidad del endotelio y se localiza en el eje de la calaza. En el interior del endospermo, cercano al área del micrópilo se observó al embrión polarizado mostrando el suspensor y las células apicales del embrión (Figura 4.1A). El análisis del patrón de acumulación del IAA durante la etapa pre-globular del embrión cigótico de *C. chinense*, mostró que en las etapas tempranas del desarrollo del embrión y del endospermo se acumula principalmente en las células basales del suspensor, en algunas células del endotelio en el eje del micrópilo, y la hipostasis ubicada en el eje de la calaza (Figuras 4.1B).

La inmunocitolocalización del IAA durante la etapa pre-embriogénica mostró que las concentraciones más altas de IAA, se ubica en las células basales del suspensor advacente al tejido del endotelio del eje del micrópilo (Figura 4.1C). Además, la tinción de los núcleos celulares con DAPI, mostró que en esta etapa el suspensor ha sufrido divisiones longitudinales y transversales, mientras que el embrión per se no ha iniciado su división (Figura 4.1D). En la etapa preembriogénica con dos células, la señal del anticuerpo anti-IAA se acumuló también en las células basales del suspensor, pero la intensidad fue menor a las observadas en la etapa previa. Además, se detectó fluorescencia en las células apicales del embrión (Figura 4.1E). La tinción con el DAPI evidenció los núcleos de las células embrionarias y del endospermo (Figura 4.1 E y F). En la etapa dermal del embrión donde inicia la diferenciación de la protodermis, la fluorescencia se concentró en la última capa de células periféricas de la parte apical del embrión y solamente en algunas células del suspensor, adyacentes al endotelio del eje micropilar (Figura 4.1G). Es de resaltar que en esta etapa y de acuerdo con la tinción de núcleos mediante el DAPI, las células del suspensor aumentaron su número y ahora constaban de tres capas, debido a que se dividieron longitudinalmente (Figura 4.1H).



Figura 4.1 Localización de la auxina en embriones cigóticos durante la embriogénesis cigótica temprana. IAA immunofluorescencia (verde), DAPI fluorescencia (azul). (A) Semilla en desarrollo, embrión en etapa preglobular, embrión (Emb) rodeado por el tejido del endospermo (End), al endotelio (Ent), la hipostasis (Hyp), el micrópilo (Mi), y tejido de mayor tamaño en esta etapa, el integumento (Int). (B) Inmunolocalización del IAA en la semilla, desarrollo temprano de un embrión en la etapa de una célula, muestra la señal máxima localizada en los tejidos de la hipostasis y el suspensor del embrión 40X. (C) Localización del IAA durante el desarrollo del embrión de la misma etapa previa la cual se localiza en las células basales del suspensor y un par de células del endotelio 60X. (D) Tinción con DAPI, detección de algunas capas del suspensor que sufren divisiones longitudinales como se indica en las flechas. (E) Etapa de dos células del embrión, la señal de localización en las células basales del suspensor disminuye y se empieza a localizar en la célula apical del embrión como se muestra en las flechas. (F) Tinción con DAPI, capas del suspensor con al menos una división longitudinal (flechas). (G) Anticuerpo Anti-IAA, se localiza en las células de la protodermis, indicado en la flecha superior, pero las células del suspensor aún emiten señal (flecha inferior). (H) La flecha

#### indica la célula superior del suspensor 60X.

El inicio del desarrollo del endospermo ocurre a partir de la fecundación de la célula polar del núcleo, donde podemos apreciar que en el comienzo las células de este tejido tienen la característica de ser grandes y vacuoladas como las observadas en las primeras etapas de la embriogénesis cigótica (Figura 4.2 A-C). Y durante la etapa pre-embriogénica del embrión unicelular, la inmunodetección con el anti-IAA mostró señal del anticuerpo comienza en el tejido de la hipostasis localizada en el eje de la calaza (Figura 4.2A). El análisis en la etapa embrionaria de 2 células mostró que la señal del anti-IAA que inició en la hipostasis continúa y atraviesan las células adyacentes del endospermo de una manera periférica hasta alcanzar las células embriogénicas, en contraste las células centrales del endospermo emiten menor señal de fluorescencia (Figura 4.2B). En la etapa dermal del embrión, la señal del anti-IAA se produjo una mayor intensidad en las células del endospermo adyacentes al eje de la calaza (Figura 4.2C).



Figura 4.2. Inmunocitolocalización del IAA mediante microscopía de fluorescencia en el endospermo de diferentes etapas pre-embriogénicas cigóticas de *Capsicum chinense* Jacq. Etapa unicelular (A), etapa de dos células (B) y etapa dermal del embrión (C). Las flechas indican la hipostasis (A), las células del endospermo adyacentes a la hipostasis y paralelas al eje de la calaza (B y C), las fotos son con un aumento de 40X.

Análisis histológicos de la etapa globular se observó que el embrión ha incrementado su número de células, se ha diferenciado la protodermis y posee una simetría radial. En esta etapa las células del endospermo son más densas con respecto a las células de las etapas pre-globulares. En esta etapa se distingue claramente la cavidad de corrosión entre el embrión y el endospermo (Figura 4.3 A). El endospermo empieza a ocupar el espacio del integumento, y se empieza a distinguir como un tejido denso, probablemente por la acumulación de compuestos de almacenamiento, posiblemente almidón (Dnyansagar y Cooper, 1960). En esta etapa, el anticuerpo anti-IAA produce una fuerte señal en el embrión globular, en la hipófisis y en las células aledañas a esta estructura celular (Figura 4.3B). En la etapa globular temprana la señal del anti-IAA se detecta en todo el embrión, no obstante, parece haber un gradiente de concentración, dado que la máxima señal se detectó en las células superiores del nivel inferior del embrión, área donde se origina el procambium. La señal de fluorescencia disminuye en las células más externas del protodermis del embrión (Figura 4.3 C). La tinción con DAPI mostró que las células del embrión poseen un núcleo compacto y conspicuo, al igual que ocurre con algunas células del endospermo (Figura 4.3 D). Cuando el embrión alcanza la etapa globular, la señal de inmunodetección del IAA es baja en las células del suspensor e incrementa gradualmente hacia la parte inferior y superior del embrión, con la señal más abundante en el tejido fundamental y menor en el protodermis (Figura 4.3 E). La tinción con DAPI mostró núcleos compactos con las mismas características que los de la etapa previa (Figura 4.3 F). Durante la etapa de transición temprana del embrión, en donde se mostró que este inicia la transición de la simetría de la forma radial a bilateral, se observó que la inmunodetección del IAA se disminuyó mayoritariamente en las células de la zona media del nivel superior del embrión tanto las células de la protodermis como de la capa interna, como también se reduce la señal en las células de la hipófisis. En contraste las células del meristemo fundamental mantienen la señal y el IAA se empieza a acumular en las células del nivel superior (Figura 4.3 G). La tinción con DAPI revela los núcleos de la zona en donde comienza la diferenciación del

dominio apical del embrión, que muestra núcleos conspicuos como en el resto del embrión (Figura 4.3 H).



Figura 4.3. Análisis histológico e inmunodetección del IAA durante la etapa globular del embrión cigótico de *Capsicum chinense* Jacq. Embrión globular teñido con azul de toluidina (A) o inmunodetectado con el anticuerpo anti-IAA (B, C, D, F, G, H). Los sobrelapamientos de las células teñidas con DAPI e inmunodetectadas con anti-IAA se muestran en D, F y H. Los aumentos corresponden a 40X (A, C, D, E, F, G y H) y 20X (B).

En la etapa de corazón del embrión cigótico de *C. chinense* la tinción con azul de toluidina hizo evidente a la protodermis, el meristemo fundamental, el procambium vascular del embrión y al endotelio que rodea a la cavidad de corrosión y al embrión (Figura 4.4 A). La inmunodetección del IAA mostró que se produce la mayor intensidad en el embrión y el endospermo micrópilar, mientras el endotelio solo muestra una señal basal y la mayor parte del endospermo carece de señal (Figura 4.4 B). Un análisis más detallado de la señal del IAA en el embrión mostró que el anticuerpo produjo una señal más intensa en algunas células del protodermis del nivel superior del embrión, el meristemo fundamental, en el procambium del nivel superior del embrión y en las células del meristemo radicular

(Figura 4.4 C). El DAPI tiño los núcleos celulares del embrión corazón (Figura 4.4 D). En una etapa posterior del estadio corazón se detectó que la señal del anti-IAA se concentró en la parte apical del embrión, donde se inicia la diferenciación de los cotiledones, las diversas células del protodermis, así como un par de células del procambium y del meristemo radicular. La caliptra tiene una señal muy tenue (Figura 4.4 E). El DAPI tiñó a los núcleos celulares (Figura 4.4 F).



Figura 4.4 Análisis histológico e inmunológico de secciones de tejido en las etapas de corazón, torpedo y cotiledonar del embrión cigótico de *Capsicum chinense* Jacq. Tinción con Toluidina de secciones de embrión en etapa de corazón (A) o torpedo (G), o de la etapa corazón (B, C, E), torpedo (H, I) y

cotiledonar (K) inmunodetectados con un anticuerpo anti-IAA. Señales sobrelapadas de secciones de embrión de la etapa corazón (D, F), torpedo (J) y cotiledonar (L) teñidas con DAPI e inmunodetectadas con un anticuerpo anti-IAA. Las flechas incidan las zonas de acumulación máxima en los diferentes estados del desarrollo de las secciones del embrión cigótico.

La tinción con azul de toluidina mostró que la etapa torpedo del embrión un grupo de células del procambium inician su diferenciación a tejido vascular, otro grupo de células en el nivel superior de embrión ha originado al menos un cotiledón, las células del suspensor presentan al menos 4 células por capa y la cavidad de corrosión ha incrementado su tamaño con respecto a la etapa anterior del embrión (Figura 4.4 G).

Se aprecia una clara señal de la auxina en el tejido de la hipostasis y las células aledañas del endospermo y endotelio, y empieza a disminuir la intensidad de esta señal en el embrión (Figura 4.4 H). El anticuerpo inmunolocalizó dentro del tejido vascular en el embrión, en el área radicular principalmente en las células del suspensor, en el área en donde se desarrollan los cotiledones y el meristemo apical del brote (Figura 4.4 I y J). En la etapa cotiledonar, la señal de la auxina abarca la mayor parte del tejido vascular hasta la parte interna de los cotiledones; también se puede detectar una acumulación de la señal en el área radicular, de manera conjunta con las células de la protodermis (Figura 4.4 K y L).

#### 4.4.2 Inmunodepleción en la embriogénesis cigótica.

El análisis de las secciones de tejido por microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC) mostró al embrión pre-globular con su suspensor (Figura 4.5 A), al embrión globular (Figura 4.5 D) y al embrión en etapa torpedo rodeado de endospermo (Figura 4.5 G). El uso del anticuerpo anti-IAA, incubado previamente con 5 mg.ml<sup>-1</sup> de IAA (Sigma-Aldrich), en secciones de embriones de la etapa preglobular (Figura 4.5 B), globular (Figura 4.5 E) y torpedo (Figura 4.5 H) no

mostró señal fluorescente, confirmando entonces la especificidad del anticuerpo por su antígeno. La tinción con DAPI de esas mismas secciones de tejido y el posterior sobrelapamiento de las imágenes produjo un patrón de tinción nuclear del embrión de la etapa pre-globular (Figura 4.5 C), globular (Figura 4.5 F) y torpedo (Figura 4.5 I), así como de las células del endotelio, el endospermo y algunas células del integumento.



Figura 4.5. Análisis por microscopia de contraste diferencial de interferencia

(DIC) y microscopía confocal de fluorescencia de la especificidad del anticuerpo anti-IAA. Se realizaron ensayos de inmunodepleción incubando el anticuerpo *in vitro* con IAA y luego usado esa reacción sobre secciones de embriones en diferentes etapas de la embriogénesis cigotica de *Capsicum chinense* Jacq. Análisis por DIC en la etapa pre-globular (A), globular (D) y torpedo (G) y por microscopía de fluorescencia en secciones pre-globulares (B), globulares (E) y torpedo (H), inmunodectadas con el anti-IAA o sobrelapamiento de las secciones pre-globulares (C), globulares (F) o torpedo (I) inmunodetectadas con el anti-IAA y teñidas con DAPI.

En todos los ensayos de inmunodepleción del IAA no se detectó señal de inmunofluorescencia (controles negativos), lo que indica que en los ensayos en el embrión en etapa pre-globular, en la etapa globular y en la etapa torpedo de la embriogénesis cigótica el anticuerpo efectivamente revela la presencia del IAA libre en los tejidos (Figura 4.5).

# 4.4.3 Cuantificación del IAA por HPLC

Para cuantificar el IAA en los embriones de las diferentes etapas se usó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En el extracto de los óvulos de 3 DPAs donde se localiza el embrión pre-globular no se detectó presencia de IAA (Figura 6 A y B). En contraste, en las etapas correspondientes a los embriones de las etapas globular-corazón (5 DPAs), torpedo-cotiledonar (10 DPAs), embriones en elongación (20 DPAs), elongación-maduración (30 DPAs) y embriones maduros (40 DPAs); se observó un incremento gradual de la concentración de IAA, hasta alcanzar un máximo en la etapa de embrión en elongación-maduración (30 DPAs) y luego decreció en el embrión maduro (40 DPAs) (Figura 4.6 A y B). En conjunto estos resultados confirman la dinámica del IAA durante la embriogénesis cigótica de *Capsicum chinese* Jacq.



Figura 4.6. Cuantificación de la concentración de auxina endógena (IAA) durante las diferentes etapas del desarrollo de la embriogénesis cigotica. Las etapas pre-globular, globular-corazón, torpedo-cotiledonar, elongación, elongación-maduración y maduración del desarrollo dependiendo a los días post antesis (DPA) (A). Concentración del IAA endógeno en los extractos obtenidos de los 3, 5, 10, 20, 30 y 40 DPA cuantificado por medio de HPLC (B). Barra de error: 95 % CI.

4.4.4 Inmunocitolocalización del IAA durante la embriogénesis somática en *C. chinense* 

Se usaron segmentos de hipocótilo de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq., germinadas *in vitro* (Figura 4.7 A), como explante inicial en el proceso de inducción de la embriogénesis somática (día 0). En el análisis histológico de los en cortes longitudinales se observan la epidermis (ep), el cortex (co), la endodermis (en), el periciclo (pc) y la estela (st) (Figura 4.7 B). El análisis con el anticuerpo anti-IAA produjo señal fuerte en los cloroplastos y una débil señal en el interior de las células de la epidermis, cortex, endodermis, periciclo y de la estala (Figura 4.7 C). **En** la tinción con DAPI se observó señal en que algunos núcleos de las células de la estela (Figura 4.7 D). Para confirmar que la señal de inmunodetección del IAA ocurrió en los cloroplastos, un ensayo de autofluorescencia de la clorofila y al combinar ambas señales se observó la colocalización de las señales en los cloroplastos de la epidermis, cortex, periciclo (Figura 4.7 E).



Figura 4.7. Explante inicial para la embriogénesis somática de *Capsicum chinense* Jacq., se analiza por microscopía y las características morfohistológicas y de distribución de IAA previo al inicio de la inducción de la embriogénesis somática *in vitro*. (A) plántula germinada *in vitro* indicando el área del hipocótilo. (B) distribución tisular del explante. (C) señal de fluorescencia del anti-IAA en los diferentes tejidos del explante. (D) señal producida por DAPI o por (E) clorofila, y (D) sobreposición de las señales emitidas por el anti-IAA, la clorofila y el DAPI.

El análisis visual de los explantes de hipocótilo 10 días después de la inducción con 13.57 µM de la auxina Dicamba (13.57), mostró que los segmentos han sufrido cambios morfológicos que aparentan un incremento en el tamaño de los explantes (Figura 4.8 A). El análisis histológico por microscopía de campo claro reveló que las células del cortex aumentaron su volumen y perdieron homogeneidad en su estado de desarrollo. Además, se pudo apreciar un aumento en el número de células de los tejidos de la endodermis, el periciclo y la estela vascular (Figura 4.8 B). La inmunodetección con el anti-IAA mostró un aumento diferencial en la señal, pues fue más intensa en las células en división de la endodermis y el periciclo, en comparación con la señal observada en las células del cortex y del cilindro vascular (Figura 4.8 C). La zona con alta tasa de división celular correspondientes a la endodermis y la protodermis presentan células con núcleos densos, tal como se observó durante el sobrelapamiento de la señal del anticuerpo Anti-IAA y el DAPI (Figura 4.8 D).



Figura 4.8. Caracterización histológica e inmunológica del comportamiento intracelular de las auxinas durante la inducción de la embriogénesis somática en explantes de hipocótilo de *Capsicum chinense* Jacq. Análisis visual de los explantes a los 10, 15 y 30 días (A, E I) e histológico en microscopía de campo claro (B, F, J) o de fluorescencia para el Alexa 488 (C, G, K) y sobrelapamiento de las imágenes generadas con el anti-IAA y la tinción con DAPI (D, H, L). La flecha superior indica las células del cortex, la flecha intermedia se localiza en la zona de alta tasa de división celular que presentan las células del periciclo y la endodermis, la flecha inferior señala a las células de la estela (haces vasculares) (C). La flecha indica la formación de células pequeñas con núcleos grandes (D). La flecha nos muestra las células que presentan una mayor intensidad de señal del anticuerpo anti-IAA

siendo células pequeñas un citoplasma denso localizadas en las zonas más expuestas al medio de cultivo (G). La flecha superior indica la capa externa de la estructura globular en donde se aprecia un escaso diferenciación de la protodermis; la flecha intermedia e inferior indican las zonas en donde se concentra la máxima señal del anticuerpo que son las primeras capas de células internas (K).

Después de 15 días en cultivo con el tratamiento de 13.57 µM de Dicamba se retiró la capa de células correspondientes a la epidermis y el cortex en los explantes y se dejó en cultivo solo la capa celular generada a partir de los tejidos de la endodermis y el periciclo (Figura 4.8 E). El análisis por microscopía de campo claro mostró que dichos tejidos están en una etapa de alta tasa de división celular (Figura 4.8 F), y la inmunodetección del IAA fue más intensa en las células más externas como células nucleadas con un citoplasma denso en comparación con las células ubicadas cerca del haz vascular (estela) que presentan vacuolas más grandes (Figura 4.8 G). El sobrelapamiento de la señal del anticuerpo anti-IAA y la tinción con DAPI mostró la presencia de núcleos compactos en todas las células de esta capa (Figura 4.8H). El desarrollo de las estructuras globulares observada en los explantes de 30 días de cultivo in vitro (Figura 4.8 I) se favoreció cuando a los explantes se les redujo a los 15 días la concentración de la auxina Dicamba a 1.1 µM. El análisis histológico por microscopía de campo claro mostró que las estructuras globulares no diferencian correctamente la protodermis (Figura 4.8 J). El IAA en la capa periférica de células de la estructura globular es menor con respecto a la observada en las células de las capas internas tanto superior como inferior (Figura 4.8 K). El sobrelapamiento de las señales anti-IAA y DAPI muestra que la capa celular de la protodermis son células vacuoladas y en su mayoría carecen de núcleos. Similarmente, las células centrales en el nivel inferior de la capa interna también son vacuoladas y comienzan a alargarse (Figura 4.8 L).

A los 45 días de cultivo *in vitro* se encontraron embriones somáticos en etapas globular, corazón y torpedo (Figura 4.9 A, D, G); dichos embriones se colectaron

del medio de cultivo y se analizaron de forma histológica e inmunológica. Los embriones globulares no presentan una diferenciación celular en la última capa de células donde debería estar formada la protodermis (Figura 4.9 A). En dichos embriones, la señal de la auxina se localizó de manera homogénea en las células del tejido de la capa interna y además que son células con citoplasma denso (Figura 4.9 B). La tinción con DAPI de las células del embrión globular mostró que pocas células de la capa externa son nucleadas; en contraste, la mayoría de las células internas son nucleadas (Figura 4.9 C). Los embriones en la etapa de corazón presentaron una mayor diferenciación en la protodermis pero aun algunas de sus células permanecen vacuoladas. También se observó que algunas células empiezan la diferenciación del meristemo radicular (Figura 4.9 E). La tinción con DAPI mostró núcleos densos en todas las capas celulares del embrión en el estadio corazón (Figura 4.9 F). En las estructuras que corresponde a la etapa torpedo (Figura 4.9 G), la señal del anti-IAA se detectó con mayor intensidad en las capas celulares intermedias y disminuyó hacia el área central y externa (Figura 4.9 H). Es de resaltar que en el área central es donde ocurrió la diferenciación del tejido vascular y que en la capa más externa no avanzó la diferenciación dela protodermis. La tinción con DAPI mostró que los núcleos de la zona central del embrión somático en estadio torpedo presentan una forma alargada, mientras que las células son largas y vacuoladas (Figura 4.9 I).


Figura 4.9. Caracterización morfológica e inmunológica de los embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq. en diferentes estadios de desarrollo. Análisis visual de la morfología de los embriones en etapa globular, corazón y torpedo (A, D, G) e inmunolocalización del IAA mediante el anticuerpo anti-IAA acoplado al fluoróforo Alexa-Flour 488 (B, E, H) y sobreexposición de las

imágenes producidas por la tinción con DAPI y la señal del anti-IAA (C, F, I) en los embriones somáticos de las tres etapas de desarrollo. La flecha superior muestra la capa interna del embrión globular con células compactas, la flecha inferior señala las células vacuoladas de la capa externa las cuales no presentan diferenciación de la protodermis (B). La flecha superior muestra las áreas de la protodermis que no se han diferenciado, la flecha inferior muestra el área de diferenciación del meristemo apical de raíz (E). La flecha superior indica la capa de células externas, en donde se aprecia un poco diferenciación de la protodermis, la flecha intermedia nos muestra las células de la capa interna en donde se acumula la mayor señal de auxina y la flecha inferior señala las células alargadas en el centro de la capa interna del embrión en estado torpedo (H).

# 4.4.5 Evaluación de la especificidad del anticuerpo anti-IAA mediante inmunodepleción con IAA

Para corroborar que las señales obtenidas con el anticuerpo anti-IAA corresponden realmente a la presencia de IAA en los tejidos, se determinó la especificidad del reconocimiento y unión del anticuerpo por el IAA mediante ensayo de inmunodepleción. El anticuerpo anti-IAA fue incubado con IAA (anti-IAA-saturado) y luego fue utilizado para detectar la señal del IAA endógeno en secciones de tejidos de diferentes etapas del proceso de inducción de la embriogénesis somática. El análisis por microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC) mostró que un corte longitudinal del explante inicial (hipocótilo), poseía la epidermis y el cortex (Figura 4.10 A). La incubación con el anti-IAAsaturado no produjo señal de IAA endógeno en ninguna de sus células (Figura 4.10 B), la tinción con DAPI produjo señal en un núcleo celular (Figura 4.10 C), dicho resultado no es de extrañar debido a que las células de ese tejido son altamente vacuoladas y con núcleos no fácilmente detectables, aun con DAPI. Análisis por DIC en secciones de tejido de hipocótilo mantenidos por 10 días en inducción con 13.57 µM de Dicamba mostró que el cortex se puede localizar en la parte superior, seguido de la endodermis y el periciclo donde se observaron zonas

de activa división celular y en la parte inferior se observa el tejido de la estela donde se localizan los haces vasculares (Figura 4.10 D). El análisis por DIC de un embrión somático globular de 30 días en el proceso de inducción mostró escasa diferenciación de la protodermis (Figura 4.10 G). La incubación de las secciones de tejido del explante inicial (Figura 4.10 B), el explante de 10 días de inducción (Figura 4.10 E) y del embrión globular (Figura 4.10 H) con el anti-IAA-saturado no produjo señal contra el IAA endógeno. La sobreposición de las señales de la tinción de los núcleos con DAPI y la generada con el anti-IAA-saturado mostró solo la presencia del patrón de núcleos en la zona de alta división celular en los hipocótilos de 10 días de inducción (Figura 4.10 F) y del embrión somático globular (Figura 4.10 I). Los resultados anteriores confirman que la señal observada con el anti-IAA reflejan la localización del IAA en los tejidos analizados.



Figura 4.10 Inmunodepleción del IAA durante la embriogénesis somática de

### Capsicum chinense Jacq.

## 4.4.5 Cuantificación del IAA por HPLC de la embriogénesis somática.

El explante inicial hipocótilo al día 0 solo contiene una concentración basal de IAA (Figura 4.11). El contenido de IAA en las muestras de los días 1 y 10 de la inducción en 13.57  $\mu$ M de Dicamba mostró un incremento en la concentración de IAA, que se mantuvo hasta el día 15 (Figura 4.11). Las muestras de la etapa de desarrollo correspondiente a 45 días (presencia de estructuras globulares-corazón y torpedo-cotiledonar) y mantenidas en 1.1  $\mu$ M de Dicamba mostraron una disminución en la concentración endógena de IAA (Figura 4.11).



Cuantificación de IAA (ng.µL-1) en los días posteriores a la inducción



Figura 4.11 Cuantificación de la concentración de auxina endógena (IAA) durante las diferentes etapas del desarrollo de la embriogénesis somática. Barra de error: 95 % CI.

#### 4.5 Discusión

# 4.5.1 Inmunocitolocalización del IAA durante la embriogénesis cigótica y somática de *C. chinense*

La concentración de la auxina IAA y su transporte son factores importantes desde las primeras etapas del desarrollo de las plantas (Petrášek and Friml, 2009). En este trabajo se determinó que durante la diferenciación celular, particularmente durante el desarrollo temprano de la semilla de *C. chinense* Jacq., la señal de la auxina se concentró en las células basales del suspensor. Dicha estructura celular se originó a partir del establecimiento de la polaridad celular y su posterior división del cigoto. El suspensor se localiza en la parte basal del embrión, pegado al micrópilo y tiene la función de conducir nutrientes o factores de crecimiento al embrión a partir del tejido materno (Yeung. 1995). Esta característica funcional está en concordancia con la hipótesis propuesta en *Arabidopsis thaliana*, donde se postula que en el suspensor de dicha especie se localizan las proteínas YUC4, YUC9 y TAA1 involucradas en la biosíntesis de IAA (Robert et al., 2013).

En *A. thaliana*, la detección de la expresión del indicador molecular de la actividad auxínica, DR5-GUS, en la célula apical del embrión, justo después de que ha ocurrido la primera división anticlinal del cigoto, puede deberse al transporte del IAA proveniente de las células del suspensor. Ese transporte puede ser el resultado de la actividad de PIN7. Dicha interpretación es apoyada por el hecho de que embriones mutantes en pin7 presentan defectos en estadios tempranos en la división celular (Petrášek and Friml, 2009). Por otra parte, en nuestro trabajo con el anti-IAA, se obtuvieron indicios de distribución diferencial o gradiente durante la ontogenia del embrión cigótico, ya que en las etapas tempranas del desarrollo del suspensor y conforme transcurren los eventos celulares, dicho reconocimiento disminuye, apreciándose una baja intensidad de la señal en la célula en el suspensor y un aumento en las células apicales del embrión. Tal comportamiento apoya el hecho de que la auxina y su correcta distribución son requeridas para la correcta diferenciación celular en las etapas tempranas.

En el caso de los explantes de hipocótilo de *C. chinense* sometidos al proceso de inducción de embriogénesis somática, la inmunocitolocalización del IAA con el anticuerpo monoclonal anti-IAA mostró un aumento en la señal del anticuerpo en las células que se encuentran en rápida división celular, particularmente en las células de la endodermis y el periciclo del hipocótilo. Este resultado es similar al descrito por Fehér *et al.* (2002), quienes describieron que las células del mesófilo sometidas a altas concentraciones de 2,4-D sufren una completa reorganización celular que involucra su fisiología, metabolismo y la expresión de genes convirtiéndolas en células que continúan por la vía embriogénica. Las estructuras celulares proembrionarias detectadas en este estudio mostraron incrementos diferenciales en la distribución de IAA, sugiriendo que durante la inducción y reprogramación del desarrollo embrionario, los requerimientos del IAA son progresivos y correlacionan con la ocurrencia y diferenciación de los diferentes tipos celulares del proembrión.

Otro resultado obtenido que se destaca durante los eventos iniciales de diferenciación de la semilla de *C. chinense* Jacq., fue la acumulación de la señal del anticuerpo anti-IAA de una manera intensa en el tejido de la hipostasis y su expansión a las células aledañas del endospermo. Se cree que esta estructura celular es fuente de reguladores de crecimiento y nutrientes durante el desarrollo del endospermo, tal como se ha sugerido en *Theobroma cacao* (Hasenstein and Zavada, 2001). Nuestros resultados sugieren la participación de la hipostasis en *Capsicum* como fuente del IAA durante las primeras etapas del desarrollo del endospermo. Asimismo, Forestan *et al.* (2010) describieron que durante la formación del endospermo de *Zea mays* se requiere de altas concentraciones de IAA y que tal aporte podría provenir de fuentes endógenas, cuyo origen aún se desconoce.

El objetivo principal del proceso embriogénico tanto cigótico como somático en plantas, de manera general, es dar originen a tres tejidos esenciales; la epidermis, el tejido fundamental y el tejido vascular; en cada tejido, la diferenciación de sus células permite la realización de diferentes funciones celulares (Möller *et al.,* 

2017). El primer evento histogénico del embrión ocurre en divisiones celulares periclinales consecutivas que dan origen a la formación de la protodermis, el tejido precursor de la epidermis (Raghavan, 2004). En este estudio se observó que en C. chinense, durante la diferenciación de la protodermis ocurrió una acumulación máxima diferencial del IAA con respecto a las células subepidermicas, de acuerdo con la señal producida por el anti-IAA en la ontogenia del embrión cigótico. En A. thaliana se ha demostrado la participación de la proteína PIN1 en el transporte del IAA durante la formación de la epidermis (Furutani et al., 2011). Análisis durante la embriogénesis cigótica de Nicotiana tabacum L., mostraron que el anticuerpo anti-IAA produjo resultados similares a los obtenidos en C. chinense, pues el anticuerpo se acumuló en las células del embrión en etapa globular temprana (Chen et al., 2010). Durante el análisis de la acumulación de los embriones somáticos, se pudo corroborar una escasa diferenciación de la protodermis durante las primeras etapas del desarrollo, en contraste en la embriogénesis cigótica, las células internas de los embriones somáticos mantuvieron una señal intensa y homogénea en la mayoría de sus células internas en las diferentes etapas del desarrollo.

En cuanto a los eventos de transición del estadio globular a corazón cigótico, en este trabajo ocurre una acumulación de la señal del anticuerpo anti-IAA en la zona de diferenciación del tejido fundamental, que es el segundo tejido esencial que se forma y que es la base para la generación de la endodermis y del córtex en la raíz (Möller *et al.*, 2017). Este gradiente de acumulación incrementa la señal hacia las células apicales del nivel superior del embrión en la etapa corazón. En esta dinámica de localización de la auxina pudieran estar involucradas las proteínas PIN1 de la familia de las proteínas PIN-FORMED (PIN) y PGP19 (MDR1/ABCB19) que pertenece a las proteínas transportadoras tipo ABC y fosfoglicoproteinas (PGPs), ambas proteínas funcionan en forma coordinada en *Arabidopsis thaliana* (Mravec *et al.*, 2008). Así mismo, en la etapa de corazón se inició la diferenciación de los meristemos apical del tallo y de la raíz en los embriones cigóticos, tal como ocurre en otros modelos de angiospermas (Kepinski y Leyser, 2003). En este trabajo se observó la acumulación del IAA en las células apicales, lugar donde

iniciará la formación de los cotiledones; dicho resultado es similar a lo descrito en *Arabidopsis* y *Nicotiana* (Benková *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2010). El análisis de la distribución del IAA durante las etapas de maduración del embrión, después de que se han formado los cotiledones y el tejido vascular mostró un incremento de la señal en la capa interna de los cotiledones y se expandió hacía el tejido vascular y a la zona radicular. Resultado similares han sido descritos en *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2010). Por consiguiente, el tercer tejido fundamental que se formó es el procambium, precursor de los tejidos vasculares. En *C. chinense* este tejido se identificó en los últimos estadios de la etapa de corazón en la embriogénesis cigótica y se pueden apreciar hasta la etapa torpedo en la embriogénesis somática.

En resumen, los hallazgos de este trabajo son un aporte a conocimiento básico acerca de los eventos histomorfogénicos y a la distribución diferencial del IAA durante la ontogenia de la embriogénesis cigótica o la inducción e histodiferenciación de la somática en *C. chinense.* Se espera que los avances de este estudio constituyan a resolver el problema de recalcitrancia que se presenta de manera recurrente en el género *Capsicum*.

### 4.6 Referencias

- Adamowski M & Friml J (2015) PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. The Plant cell 27(1):20-32 doi:10.1105/tpc.114.134874
- Alfred JP, Haskins EF & Ingrith D-O (1982) Toluidine Blue: A Simple, Effective Stain for Plant Tissues. The American Biology Teacher 44(8):487-489 doi:10.2307/4447575
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertová D, Jürgens G & Friml J (2003) Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. Cell 115(5):591-602 doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3
- Chen D, Ren Y, Deng Y & Zhao J (2010) Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in Nicotiana tabacum L. and correlated with ABP1 and PM H+-ATPase activities. Journal of Experimental Botany doi:10.1093/jxb/erq056
- Cheng Y, Dai X & Zhao Y (2007) Auxin Synthesized by the YUCCA Flavin Monooxygenases Is Essential for Embryogenesis and Leaf Formation in Arabidopsis. The Plant Cell 19(8):2430-2439 doi:10.1105/tpc.107.053009
- Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, DuBois J, Ballou D & Zhao Y (2013) The Biochemical Mechanism of Auxin Biosynthesis by an Arabidopsis YUCCA Flavin-containing Monooxygenase. The Journal of Biological Chemistry 288(3):1448-1457 doi:10.1074/jbc.M112.424077
- Davies PJ (2010) The plant hormones: their nature, occurrence, and functions Plant hormones. Springer, p 1-15
- Dnyansagar VR & Cooper DC (1960) Development of the Seed of Solanum phureja. American Journal of Botany 47(3):176-186 doi:10.2307/2439247
- Fehér A, Pasternak T & Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell Tiss Organ Cult 74(3):201-228 doi:10.1023/A:1024033216561
- Fischer-Iglesias C, Sundberg B, Neuhaus G & Jones AM (2001) Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. The Plant Journal 26(2):115-129 doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01013.x
- Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R & Jurgens G (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apicalbasal axis of Arabidopsis. Nature 426(6963):147-153 doi:http://www.nature.com/nature/journal/v426/n6963/suppinfo/nature02085\_S1.ht ml
- Furutani M, Sakamoto N, Yoshida S, Kajiwara T, Robert H, Friml J & Tasaka M (2011) Polar-localized NPH3-like proteins regulate polarity and endocytosis of PIN-FORMED auxin efflux carriers, vol 138,
- Gil P, Dewey E, Friml J, Zhao Y, Snowden KC, Putterill J, Palme K, Estelle M & Chory J (2001) BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis. Genes & Development 15(15):1985-1997 doi:10.1101/gad.905201
- Hadfi K, Speth V & Neuhaus G (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. Development 125(5):879-887

- Hakman I, Hallberg H & Palovaara J (2009) The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during Picea abies somatic embryo development. Tree Physiology 29(4):483-496 doi:10.1093/treephys/tpn048
- Hasenstein KH & Zavada MS (2001) Auxin modification of the incompatibility response in *Theobroma cacao*. Physiologia Plantarum 112(1):113-118 doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1120115.x
- Hou Z-X & Huang W-D (2005) Immunohistochemical localization of IAA and ABP1 in strawberry shoot apexes during floral induction. Planta 222(4):678-687 doi:10.1007/s00425-005-0014-1
- Kepinski S & Leyser O (2003) An axis of auxin. Nature 426:132 doi:10.1038/426132b
- Kothari SL, Joshi A, Kachhwaha S & Ochoa-Alejo N (2010) Chilli peppers A review on tissue culture and transgenesis. Biotechnology Advances 28(1):35-48 doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.08.005
- Krouk G, Lacombe B, Bielach A, Perrine-Walker F, Malinska K, Mounier E, Hoyerova K, Tillard P, Leon S, Ljung K, Zazimalova E, Benkova E, Nacry P & Gojon A (2010) Nitrate-Regulated Auxin Transport by NRT1.1 Defines a Mechanism for Nutrient Sensing in Plants. Developmental Cell 18(6):927-937 doi:<u>https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008</u>
- Liu C, Xu Z & Chua NH (1993) Auxin Polar Transport Is Essential for the Establishment of Bilateral Symmetry during Early Plant Embryogenesis. The Plant Cell 5(6):621-630 doi:10.1105/tpc.5.6.621
- Ljung K (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development 140(5):943-950 doi:10.1242/dev.086363
- Möller B & Weijers D (2009) Auxin Control of Embryo Patterning. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 1(5) doi:10.1101/cshperspect.a001545
- Möller BK, Ten Hove CA, Xiang D, Williams N, López LG, Yoshida S, Smit M, Datla R & Weijers D (2017) Auxin response cell-autonomously controls ground tissue initiation in the early Arabidopsis embryo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114(12):E2533-E2539 doi:10.1073/pnas.1616493114
- Mravec J, Kubes M, Bielach A, Gaykova V, Petrášek J, Skůpa P, Chand S, Benková E, Zazímalová E & Friml J (2008) Interaction of PIN and ABCB transport mechanisms in auxin distribution-dependent development, vol 135,
- Nakurte I, Keisa A & Rostoks N (2012) Development and Validation of a Reversed-Phase Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Indole-3-Acetic Acid, Indole-3-Pyruvic Acid, and Abscisic Acid in Barley (Hordeum vulgare L.). Journal of Analytical Methods in Chemistry 2012:103575 doi:10.1155/2012/103575
- Ochoa-Alejo N & Ramirez-Malagon R (2001) In vitro chili pepper biotechnology. In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 37(6):701-729 doi:10.1007/s11627-001-0121-z
- Pasternak TP, Prinsen E, Ayaydin F, Miskolczi P, Potters G, Asard H, Van Onckelen HA, Dudits D & Fehér A (2002) The Role of Auxin, pH, and Stress in the Activation of Embryogenic Cell Division in Leaf Protoplast-Derived Cells of Alfalfa. Plant Physiology 129(4):1807-1819 doi:10.1104/pp.000810

- Pérez-Pastrana J, Islas-Flores I, Bárány I, Álvarez-López D, Canto-Flick A, Canto-Canché B, Peña-Yam L, Muñoz-Ramírez L, Avilés-Viñas S, Testillano PS & Santana-Buzzy N (2018) Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (Capsicum chinense Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-esterification. Journal of Plant Physiology 230:1-12 doi:<u>https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.005</u>
- Petrášek J & Friml J (2009) Auxin transport routes in plant development. Development 136(16):2675-2688 doi:10.1242/dev.030353
- Raghavan V (2004) Role of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. American Journal of Botany 91(11):1743-1756 doi:10.3732/ajb.91.11.1743
- Robert HS, Grones P, Stepanova AN, Robles LM, Lokerse AS, Alonso JM, Weijers D & Friml J (2013) Local auxin sources orient the apical-basal axis in Arabidopsis embryos. Curr Opin Plant Biol 23
- Rodríguez-Sanz H, Manzanera J-A, Solís M-T, Gómez-Garay A, Pintos B, Risueño MC & Testillano PS (2014) Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, Quercus suberL. BMC Plant Biology 14(1):224 doi:10.1186/s12870-014-0224-4
- Rodríguez-Sanz H, Solís M-T, López M-F, Gómez-Cadenas A, Risueño MC & Testillano PS (2015) Auxin Biosynthesis, Accumulation, Action and Transport are Involved in Stress-Induced Microspore Embryogenesis Initiation and Progression in Brassica napus. Plant and Cell Physiology 56(7):1401-1417 doi:10.1093/pcp/pcv058
- Sachs T (1991) Cell polarity and tissue patterning in plants. Development 113(Supplement 1):83-93
- Santana-Buzzy N, Canto-Flick A, Barahona-Pérez F, Montalvo-Peniche MdC, Zapata-Castillo PY, Solís-Ruiz A, Zaldívar-Collí A, Gutiérrez-Alonso O & Miranda-Ham MdL (2005) Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. HortScience 40(6):1829-1831
- Savaldi-Goldstein S, Baiga TJ, Pojer F, Dabi T, Butterfield C, Parry G, Santner A, Dharmasiri N, Tao Y, Estelle M, Noel JP & Chory J (2008) New auxin analogs with growth-promoting effects in intact plants reveal a chemical strategy to improve hormone delivery. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(39):15190-15195 doi:10.1073/pnas.0806324105
- Steinmann T, Geldner N, Grebe M, Mangold S, Jackson CL, Paris S, Gälweiler L, Palme K & Jürgens G (1999) Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. Science 286(5438):316-318 doi:10.1126/science.286.5438.316
- Testillano PS, Solís M-T & Risueño MC (2013) The 5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development. Physiologia Plantarum 149(1):104-113 doi:doi:10.1111/ppl.12015

Vanneste S & Friml J (2009) Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. Cell 136(6):1005-1016 doi:<u>http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001</u>

- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, Guédon Y, Armitage L, Picard F, Guyomarc'h S, Cellier C, Parry G, Koumproglou R, Doonan JH, Estelle M, Godin C, Kepinski S, Bennett M, De Veylder L & Traas J (2011) The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. Molecular Systems Biology 7(1) doi:10.1038/msb.2011.39
- Yeung EC (1995) Structural and Developmental Patterns in Somatic Embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) In Vitro Embryogenesis in Plants. Springer Netherlands, Dordrecht, p 205-247

#### **DISCUSIÓN GENERAL**

Los estudios relacionados con el crecimiento y desarrollo de los embriones en plantas superiores han sido por mucho tiempo motivo de interés para la comunidad científica. El veloz desarrollo tecnológico en las áreas de la microscopía, las técnicas bioquímicas, genéticas, moleculares y de cultivo *in vitro*, han permitido un acercamiento más preciso y dirigido en la descripción de los cambios morfo-anatómicos y genéticos y un rápido avance en el entendimiento de la embriogénesis. El objetivo principal de la presente investigación fue comparar la acumulación y localización del ácido 3 indolacético (IAA) durante el proceso embriogénico tanto *in vitro* como *in vivo* en *Capsicum* spp. Esto con la finalidad de obtener información relevante para el entendimiento de la recalcitrancia, fenómeno que enfrentan las especies del género *Capsicum* y que impide la conversión eficaz de los embriones somáticos en plantas. Los datos obtenidos durante los eventos del desarrollo de la embriogénesis cigótica y somática son útiles para dirigir futuras investigaciones para profundizar en el estudio de la embriogénesis.

Por otra parte, se describe la recalcitrancia del género Capsicum a partir de experimentos clásicos de dosis-respuesta, evaluando diferentes auxinas como inductores de embriogénesis somática en explantes de hipocótilo de Capsicum. Después del tratamiento se corroboró la gran plasticidad y capacidad de respuesta del género Capsicum hacia las diferentes auxinas; tales hallazgos evidencian que el 2,4-D puede ser sustituido por otras auxinas para la inducción de la embriogénesis somática. Además, se encontró que no obstante la diversidad en los patrones de diferenciación de los embriones somáticos, un punto en común fue la presencia de deformaciones en el eje apical, lo cual compromete el correcto desarrollo del meristemo apical. Algunos de los fenotipos observados en los embriones somáticos obtenidos fueron similares a los reportados cuando se interfirió con el transporte polar de la auxina durante la embriogénesis en Brassica juncea o en las mutantes de pin1 de Arabidopsis thaliana. Esos resultados sugieren que durante la inducción de la embriogénesis somática en C. chinense, puede estar alterado el transporte polar de la auxina y por ende también la localización celular del IAA endógeno.

Posteriormente se realizó un análisis histo-morfológico del desarrollo del óvulo y la semilla de Capsicum chinense Jacq., para lo cual se recolectaron botones florales en diferentes etapas de desarrollo y semillas con diferente grado de maduración. Se obtuvo información fundamental de las estructuras que conforman la semilla en la especie, y por primera vez, se detectó la dinámica del grado de esterificación de la pectina en la pared celular de los embriones cigóticos por medio de inmunocitolocalización. Varios reportes han establecido que el grado de esterificación de la pectina desempeña un papel clave en la diferenciación celular, durante los procesos de desarrollo de la planta. La embriogénesis cigótica se tomó como el modelo del desarrollo normal del embrión en la especie Capsicum chinense. Nuestros hallazgos sugieren un papel vital en la coordinación de la división y diferenciación en las células embrionarias. Es posible que dicha investigación pueda ser enriquecida haciendo una comparación con los cambios celulares que ocurren en la embriogénesis somática. La caracterización histológica completa desde megasporogenesis hasta la embriogénesis estableció un punto de partida para la toma de decisiones de la continuación futura de la comparación entre la embriogénesis cigótica y la somática; y además se seleccionaron las etapas clave del proceso embriogénico.

Por último, se abordó un análisis comparativo de la distribución y acumulación del IAA en la embriogénesis somática y cigotica. Se obtuvieron evidencias de la distribución en forma de gradiente de esta fitohormona, durante la ontogenia del embrión cigótico. Esto se dedujo porque en las etapas tempranas del desarrollo del embrión, el anticuerpo anti-IAA reacciona fuertemente con las células basales del suspensor y conforme transcurren los eventos celulares, la señal disminuye en el suspensor y aumenta en las células apicales del embrión. Tal comportamiento apoya el hecho de que la auxina y su correcta distribución son requeridas para la correcta diferenciación celular en las etapas embrionarias tempranas. Con respecto a la embriogénesis somática, las estructuras celulares pre-embrionarias mostraron incrementos diferenciales en la distribución de IAA, sugiriendo que durante la inducción y reprogramación del desarrollo embrionario los requerimientos del IAA son progresivos y correlacionan con la ocurrencia y

diferenciación de los diferentes tipos celulares del proembrión. Los resultados en ambos procesos difieren en la localización del IAA detectado con el anti-IAA en las diferentes etapas del desarrollo, confirmando parcialmente el hecho que durante la formación de los embriones somáticos los gradientes de acumulación del IAA se ven alterados. Este hecho estaría afectando el correcto desarrollo de los embriones y en consecuencia originando malformaciones en el embrión somático. Sin embargo, es necesario realizar más análisis para confirmar o descartar que el transporte polar de la auxina y su distribución celular es el elemento clave en la ocurrencia de la embriogénesis somática correcta. Tal análisis se podría realizar estudiando la distribución de las proteínas PIN mediante inmunolocalización para determinar si hay una correlación entre la localización de dichas proteínas y la acumulación del IAA.

Además, técnicas como la hibridación *in situ* serían útiles para entender el control de la actividad génica relacionada con las auxinas durante los diferentes eventos del desarrollo embrionario. Así como la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la auxina y la relación que tienen con el desarrollo de la planta. Es relevante inhibir el transporte polar de la auxina usando los inhibidores como el ácido 2,3,5 tri-iodobenzoico (TIBA), el ácido N-1 naftiltalámico (NPA) y 2-cloro-9-hidroxifluorene-9-carboxílico (HFCA), para establecer el efecto del transporte polar de la Androgénesis de *Capsicum* dado que existen diversos reportes que muestran que las microesporas son otra alternativa para la obtención de embriones con capacidad para convertirse en planta. Dado ese potencial, entonces la androgénesis pudiera utilizarse como modelo de estudio para tratar de entender el fenómeno de la recalcitrancia de *Capsicum*.