



Centro de Investigación Científica de Yucatán,
A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA CONVERSIÓN EN
PLANTA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE
Capsicum chinense Jacq.**

Tesis que presenta

GEMA PIJEIRA FERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2020

*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 de **Gema Pijeira Fernández** titulado “**Análisis de la expresión de genes involucrados en la conversión en planta de embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq.**” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **Dra. Nancy Santana Buzzy**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 8 de Julio de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Nombre: Lic. Gema Pijeira Fernández

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 del género *Capsicum*: estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile *in vitro*” (Ciencia Básica CONACyT, CB60170) en el que participé bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mis padres Marta y Luis, por apoyarme en cada paso del camino, por estar siempre para mi e inspirarme a ser mejor cada día. Porque no existe meta más importante que hacerlos sentir orgullosos.
- ❖ A mi gran familia, porque nunca me han faltado las palabras de aliento, los buenos consejos y los abrazos fuertes en cada momento que los necesito. La distancia no existe para las personas que se aman.
- ❖ A mi hermana Patricia, por ser mi persona y asumir todo lo que eso implica.
- ❖ A mi familia de amigos, porque me han hecho sonreír el corazón en los momentos más difíciles, por adoptarme, ayudarme y hacerme sentir como en casa.
- ❖ A mis ángeles Isabel y Julio, por ser como son, por su incondicionalidad y su amor.
- ❖ A la Dra. Nancy, por creer en mi desde el primer momento, por acogerme como parte de su grupo y de su familia. Por su apoyo incondicional y toda su preocupación, nunca serán suficientes las palabras para agradecerle por todo.
- ❖ A la Dra. Daisy, por enseñarme tanto, por abrirme las puertas y poner a mi disposición a todo su equipo, por todos sus consejos, por esa energía que contagia y que motiva a grandes logros.
- ❖ A la Dra. Susana, que me mostró la magia de la embriogénesis y que está siempre, cuando la necesito para ayudarme.
- ❖ A la M.C. Adriana, por su apoyo crucial en la logística del proceso, por su interés y su disposición para apoyarme en lo posible.
- ❖ A todos mis compañeros de laboratorio: mis paisanas Yaritza y Argelys, a Liliana, Laura, Irene, Adolfo y Jacobo. Porque he aprendido de cada uno, por las risas y los buenos momentos.
- ❖ Al Dr. Anuar, por adoptarme más que ayudarme, por enseñarme todo lo que sé de

Biología Molecular. Gracias por todo el tiempo dedicado, por la paciencia y por la amistad.

- ❖ Al IQI. Alberto, por implicarse en este proyecto y aportarme tantos conocimientos, por alegrarme la estancia en el laboratorio y buscar siempre la solución a todo.
- ❖ A mi comité de titulación: Dra. Daisy Pérez, Dra. Lourdes Iglesias, Dra. Sara Nahuat, Dr. Javier Mijangos por su aporte significativo a la realización de esta tesis y la premura con la que han respondido a todas mis solicitudes.
- ❖ A la Dra. Renata Rivera, Coordinadora de la Opción Bioquímica y Biología Molecular del Posgrado en Ciencias Biológicas , por su apoyo en los múltiples trámites para la titulación.
- ❖ A la UBBMP y al Centro de Investigación Científica de Yucatán por brindar sus instalaciones para poder realizar el trabajo.
- ❖ A CONACyT por el apoyo otorgado con la beca.

DEDICATORIAS

A mis padres, que han sido y serán siempre mi fuerza y mi mayor inspiración para alcanzar todas mis metas. Porque siempre están conmigo, no importa la distancia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. IMPORTANCIA AGRONÓMICA DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i> ; DEFINIDO. MARCADOR NO	ERROR!
2. MEJORAMIENTO GENÉTICO Y CULTIVO DE TEJIDOS	4
3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA <i>IN VITRO</i>	5
3.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO <i>Capsicum</i>	6
3.2. ESPECIFICIDADES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN LA ESPECIE <i>Capsicum chinense</i>	7
3.3. GENES INVOLUCRADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>Capsicum</i> <i>chinense</i>	8
4. GENES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y EL TRANSPORTE DE AUXINAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS.....	9
4.1. <i>BABY BOOM</i>	10
4.2. <i>LEAFY COTHYLEDON</i>	11
4.3. <i>PIN FORMED</i>	11
HIPÓTESIS	14
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
CAPÍTULO II	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1. CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	17
2.2. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	17
2.3. OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.	17
2.4. EXTRACCION DE ARN DE EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i>.....	18
2.5. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO.....	18
2.6. DISEÑO DE CEBADORES	18
2.7. DETERMINACIÓN DEL MEJOR GEN DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.....	19
2.8. ANÁLISIS DE TRANSCRITOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL.....	20
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
CAPÍTULO III	22
3. RESULTADOS	22
3.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	22
3.2. EXTRACCIÓN DE ARN DE EMBRIONES DE <i>C. chinense</i>.....	22
3.3. SELECCIÓN DEL GEN DE REFERENCIA.....	22
3.4. PRUEBA DE CEBADORES PARA PCR EN TIEMPO REAL.....	25

3.5. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN EMBRIONES DE <i>Capsicum chinense</i>	26
3.5.1 <i>BBM</i> Y <i>LEC</i>	28
3.5.1 <i>PIN1</i> Y <i>PIN7</i>	29
4. DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	36
3.1. CONCLUSIONES	36
3.2. PERSPECTIVAS	36
BIBLIOGRAFÍA	37

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Red transcripcional involucrada en la regulación de la homeostasis de auxinas en <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
Figura 1.2. Predicción de la estructura de las proteínas PIN. La secuencia que se muestra se deriva de AtPIN7. Las posiciones marcadas en amarillos son invariables en secuencia en la subfamilia mayor PIN. Las posiciones marcadas en rojo son invariables en secuencia en todos los PIN	12
Figura 1.3. Diagrama de flujo de trabajo para el análisis de expresión de los genes <i>BBM</i> , <i>LEC</i> y <i>PIN</i> (1 y 7) en embriones cigóticos y somáticos de <i>C. chinense</i>	14
Figura 3.1. Embriogénesis somática en <i>Capsicum chinense</i> A) Hipocotilo de <i>C. chinense</i> a los 30 días de inducción de la embriogénesis B) Hipocotilo a los 60 días post-inducción. C) Embrión deformado con forma de alfiler.	19
Figura 3.2. Extracción de ARN total de embriones somáticos y cigóticos de <i>C. chinense</i> . EST: Embrión somático en estadio temprano; ESA: Embrión somático en estadio avanzado; ECT: Embrión cigótico fruto verde (Temprano); ECA: Embrión cigótico fruto maduro (Avanzado); N: Método de extracción normal; C: Método de extracción con doble cloroformo	20
Figura 3.3. Curva de disociación de los genes candidatos de referencia <i>ACT</i> , <i>GAPDH</i> , β - <i>TUB</i> , y <i>UBI3</i>	21
Figura 3.4. Curva de disociación de los fragmentos putativos de los genes <i>LEC</i> , <i>BBM</i> , <i>PIN1</i> y <i>PIN7</i> de <i>Capsicum chinense</i> en muestras de embrión somático y cigótico	24
Figura 3.5. Geles de agarosa de los productos de la PCR en tiempo real para los genes <i>LEC</i> , <i>BBM</i> , <i>PIN1</i> y <i>PIN7</i> con muestras de embrión somático y cigótico de <i>Capsicum chinense</i>	25
Figura 3.6. Cuantificación relativa de transcritos de <i>LEC</i> y <i>BBM</i> en embriones cigóticos y somáticos de <i>C. chinense</i> en estadios tempranos y avanzados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores promedio representados (n=4; p<0.05).....	26

Figura 3.7. Cuantificación relativa de transcritos de *PIN1* y *PIN7* en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* en estadios tempranos y avanzados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores promedio representados ($n=4$; $p<0.05$)..... 27

ABREVIATURAS

CTV: Cultivo de Tejidos Vegetales

ES: Embriogénesis somática

ESs: Embriones somáticos

EC: Embriones cigóticos

EST: Embrión somático en estadio temprano

ESA: Embrión somático en estadio avanzado

ECT: Embrión cigótico en estadio temprano

ECA: Embrión cigótico en estadio avanzado

RC: Regulador de crecimiento

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Ax: Auxinas

FT: Factor de transcripción

CR: Cantidades relativas

ER: Expresión relativa

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ARN: ácido ribonucleico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

BBM: Gen *BABY BOOM*

LEC: Gen *LEAFY COTHYLEDON*

PIN: Gen o proteína *PIN FORMED*

ACT: Gen Actina

β-TUB: Gen Beta- tubulina

UBI3: Gen Ubiquitina 3

GAPDH: Gen Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

RESUMEN

Los embriones somáticos de la especie *Capsicum chinense* Jacq. presentan anomalías en su desarrollo, lo cual impide que se conviertan en plantas. Aunque la naturaleza de este fenómeno no ha sido completamente dilucidada, diversos estudios a nivel molecular han revelado que el proceso está gobernado por una intrincada red genética, en la que los genes son regulados en respuesta a señales hormonales, destacándose el rol de las auxinas durante todo el proceso. Conociendo la función de los factores de transcripción *BABY BOOM (BBM)* y *LEAFY COTYLEDON (LEC)* en la inducción de la embriogénesis y la regulación de la síntesis de auxinas durante esta, así como la de los genes *PIN FORMED (PIN1 y PIN7)* que codifican para transportadores de esta fitohormona, en el presente estudio se analizó el patrón de expresión de estos genes. Los resultados mostraron que el patrón de *BBM*, *LEC* y de *PIN1* en los ES fue completamente opuesto al de EC, mientras que *PIN7* mostró el mismo patrón con una mayor acumulación de transcritos en ECs, lo cual implica que existen afectaciones en el establecimiento de la homeostasis de auxinas en embriones somáticos que pueden dar lugar a las malformaciones observadas en estas estructuras en *Capsicum chinense* Jacq

ABSTRACT

Somatic embryos of *Capsicum chinense* Jacq. present anomalies in their development, which prevents them from becoming plants. Although the nature of this phenomenon has not been fully elucidated, various studies at the molecular level have revealed that the process is governed by an intricate genetic network, in which genes are regulated in response to hormonal signals, highlighting the role of auxins during the whole process. Knowing the role of transcription factors *BABY BOOM* (*BBM*) and *LEAFY COTYLEDON* (*LEC*) in the induction of embryogenesis and the regulation of auxin synthesis during it, as well as that of the *PIN FORMED* genes (*PIN1* and *PIN7*) that code for transporters of this phytohormone, in the present study the it was analyzed the expression pattern of these genes. The results indicate that the pattern of *BBM*, *LEC* and *PIN1* in the ES are completely opposite than those observed in the ZE, while the *PIN7* shows the same pattern with a greater accumulation of transcripts in the ZE, which implies that there are affectations in the establishment of the auxin homeostasis in somatic embryos that can give rise to the malformations observed in these structures in *Capsicum chinense* Jacq.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* goza de gran popularidad a nivel mundial. Sus frutos, conocidos como pimientos o chiles, son altamente consumidos en la gastronomía por sus propiedades organolépticas características de cada especie (do Rego, 2016). Estos presentan un alto contenido de compuestos antioxidantes, vitaminas, antimicrobianos y anticancerígenos, así como de carotenoides, flavonoides y capsaicinoides (Whayuni *et al.*, 2013; Antonio *et al.*, 2018). Dichas características hacen de *Capsicum* un género de gran importancia económica, muy demandado por las industrias alimenticia, farmacológica y cosmética (Kim *et al.*, 2014). *Capsicum chinense* (chile habanero) es una de las 5 especies más cultivadas de este género debido a su aromaticidad y pungencia conferida por el alto contenido de capsaicinoides (Canto-Flick *et al.*, 2008; Sosa-Moguel *et al.*, 2017). México es uno de los principales productores de chile habanero en América Latina, destacándose la península de Yucatán como centro de diversidad genética de esta especie (Tun-Dzul, 2001). Contradictoriamente, los cultivares de habanero de esta región presentan un bajo rendimiento, frutos pequeños y una alta variabilidad en sus poblaciones (Santana-Buzzy *et al.*, 2016). Además, su producción está seriamente afectada por la incidencia de plagas y enfermedades virales (Berny-Mier *et al.*, 2013).

Estas deficiencias que afectan el rendimiento, así como la gran demanda de este fruto han impulsado la creación de programas de mejoramiento genético encaminados a la obtención de variedades más productivas (Latournerie *et al.*, 2002; Santana-Buzzy *et al.*, 2016). Las técnicas basadas en cultivo de tejidos vegetales (CTV) representan una alternativa eficaz para la micropropagación de las plantas mejoradas. Entre los procesos morfogénicos que se dan en el CTV, destaca la embriogénesis somática (ES) como uno de los métodos más eficientes para la producción masiva de plantas *in vitro* (Avilés-Viñas *et al.*, 2013). La ES en este género fue descrita por primera vez en *C. annum* con una baja eficiencia en la inducción y poca reproducibilidad de la técnica (Harini y Sita, 1993). Para *C. chinense*, se han reportado varios trabajos de ES por vía directa e indirecta con una alta producción de embriones y buena reproducibilidad (Loyola-Vargas, 2016). Sin embargo, este género se caracteriza por la baja tasa de conversión de los embriones en plantas, dado por anomalías en el proceso de histodiferenciación que conducen a la deformación del meristemo apical (Steinitz *et al.*, 2003; Zapata-Castillo *et al.*, 2007; Kothari *et al.*, 2010). Este problema limita

la utilización de la ES para la propagación de variedades *in vitro*, por lo que su estudio se ha vuelto de especial interés para la ciencia.

La transición de células somáticas a células embriónicas competentes implica la reprogramación genética extensiva en respuesta a señales de inducción. Aunque no se conocen por completo las bases moleculares de este proceso, se sabe que la inducción de la embriogénesis es un proceso multifactorial regulado por una intrincada red de genes (Valle-Gough *et al.*, 2015). Muchas investigaciones se han enfocado en la identificación de genes clave en este proceso para varias especies (Valle-Gough *et al.*, 2015; Regla-Márquez *et al.*, 2019). Sus resultados han mostrado que la respuesta a la embriogénesis puede ser dependiente del genotipo, por lo que es preciso estudiar las diferentes respuestas a la inducción para comprender su naturaleza.

Las auxinas son una de las fitohormonas más importantes en el proceso de embriogénesis. La acumulación de auxinas en áreas específicas está asociada a zonas de división celular activa, así como con la reprogramación celular, estos eventos se reflejan en la reorganización de la cromatina en células sujetas a su acción. Sin embargo, las altas concentraciones del regulador del crecimiento en el medio de cultivo (especialmente 2,4-D) o prolongada exposición al mismo, puede bloquear el desarrollo normal del embrión (Vondráková *et al.* 2011), debido a desajustes en la regulación de la expresión de algunos genes. Recientemente se ha reportado que factores de transcripción pertenecientes a las familias *BABY BOOM* y *LEAFY COTYLEDON*, actúan en la regulación de una misma red transcripcional ejerciendo su control sobre la expresión de genes implicados en la síntesis de auxinas en *Arabidopsis* (Horstman *et al.*, 2017). Otro factor determinante en el proceso de embriogénesis es el establecimiento de un transporte polar de auxinas, en el que juegan un papel primordial los transportadores de la familia PIN (Krecek *et al.*, 2009).

Debido a esto, el propósito del presente estudio fue determinar los niveles de transcritos de los genes *BBM*, *LEC*, *PIN1* y *PIN7* en embriones somáticos y cigóticos en *Capsicum chinense* y analizar sus diferencias y semejanzas. Esto puede contribuir a un mejor entendimiento del proceso de ES a nivel molecular, así como proporcionar algunas pistas de la influencia de estos genes en la incapacidad de regeneración de esta especie.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. IMPORTANCIA AGRONÓMICA DEL GÉNERO *Capsicum*

El género *Capsicum*, pertenece a la familia Solanaceae y es uno de los más cultivados y consumidos a nivel mundial. Los representantes del género son plantas herbáceas, diploides, autógamas o con bajos niveles de polinización cruzada, de las cuales se consume el fruto popularmente conocido como pimiento o chile (Kim *et al.*, 2014). Este presenta un alto contenido de compuestos antioxidantes, vitaminas, antimicrobianos y anticancerígenos, así como de carotenoides, flavonoides y capsaicinoides, que le dan propiedades organolépticas singulares (Kantar *et al.*, 2016; Hulse-Kemp *et al.*, 2016). Estas características hacen de *Capsicum* un género de gran importancia económica, muy demandado por las industrias alimenticia y farmacológica principalmente (Antonio *et al.*, 2018; Mestre Moreno *et al.*, 2017). El contenido de nutrientes, así como el perfil químico general del fruto, su tamaño y color, varían entre las diferentes especies del género e incluso entre las variedades de una misma especie, dándole propiedades únicas que han dotado a algunos cultivares de mayor popularidad (Kantar *et al.*, 2016; Hyano-Kanashiro *et al.*, 2016; Antonio *et al.*, 2018). El género comprende alrededor de 26 especies, con una amplia variación genética. De estas, *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum pubescens* L. y *Capsicum chinense* Jacq. son las más cultivadas a nivel mundial (Roy *et al.*, 2016; Hulse-Kemp *et al.*, 2016).

El chile habanero *Capsicum chinense* Jacq. es una de las especies de mayor interés agrícola dentro del género. La popularidad de esta especie se debe a su aroma y pungencia, que está dada por el alto contenido de capsaicinoides del fruto (Sosa-Moguel *et al.*, 2017). Este chile es altamente demandado no solo para consumo en fresco, sino también por la industria alimenticia nacional e internacional para la elaboración de salsas, sazones, encurtidos, entre otros productos. Además, tiene propiedades medicinales conferidas por la capsaicina, las cuales son muy explotadas en el tratamiento de enfermedades como el asma, anomalías gastrointestinales, dolores musculares, artritis, sobrepeso, problemas cardiovasculares, diabetes y cáncer. También ha sido empleado para la elaboración de productos de defensa personal (Roy *et al.*, 2016).

México se encuentra entre los principales productores de chile habanero, y su producción y consumo están estrechamente ligados a la cultura y tradiciones del país. Entre los estados mexicanos que lo producen se destacan los que conforman la Península de Yucatán, que ha sido considerada centro de diversidad genética de esta especie (Latournerie *et al.*, 2001). Las variedades cultivadas en este territorio poseen un aroma, olor y sabor característico, atributos que le permitieron calificar en 2010 para la Denominación de Origen de Chile Habanero de la Península de Yucatán. Contradictoriamente, los cultivares de habanero de esta región presentan un bajo rendimiento, frutos pequeños y una alta variabilidad en sus poblaciones. La creciente demanda de chile habanero producido en esta región ha convertido el mejoramiento de este cultivo en una cuestión imperativa (Santana-Buzzy *et al.*, 2016).

2. MEJORAMIENTO GENÉTICO Y CULTIVO DE TEJIDOS

El objetivo del fitomejoramiento es alterar o modificar la herencia de los caracteres deseados de las plantas para obtener cultivares (variedades o híbridos) mejor adaptados a condiciones específicas, de mayores rendimientos y de mejor calidad que las variedades nativas o criollas (Vallejo y Estrada, 2002). Esta práctica está enfocada específicamente hacia la introducción en los cultivares mejorados de alelos que confieren resistencia a enfermedades y plagas (Tamiru *et al.*, 2015); tolerancia a sequía, salinidad, temperaturas extremas y otros tipos de estrés abiótico (Blum *et al.*, 2018) y/o rasgos determinantes de calidad (Panguluri *et al.*, 2016). Las técnicas tradicionales de mejoramiento se basan en la transferencia vertical de genes a través del cruzamiento de especies compatibles. Por otra parte, en las últimas décadas la transferencia horizontal de genes a través de la transgénesis, la hibridación somática, la intragénesis y la cisgénesis ha sido ampliamente utilizadas para la introducción de genes de interés en especies incompatibles (Clemens *et al.*, 2016).

El mejoramiento genético emplea técnicas como el cultivo *in vitro*, los marcadores moleculares y la transformación genética para lograr resultados favorables en más corto tiempo. En el caso del cultivo de tejidos vegetales se emplea para la obtención y regeneración de híbridos y plantas transformadas, así como para la propagación general de variedades mejoradas. Adicionalmente, la mutagénesis *in vitro* y la variación somaclonal/gametoclinal en los cultivos de tejidos generan variabilidad genética y también

constituyen herramientas para la obtención de nuevas variedades (Wedzony *et al.*, 2014). La obtención de plantas completas en el cultivo de tejidos ocurre a través de dos procesos morfogénicos principales: la organogénesis y la embriogénesis somática. La organogénesis se trata de la obtención de órganos (tallos, raíces, flores) a partir de células que tienen la propiedad de mantenerse en división activa (Phillips, 2004). Por su parte, la embriogénesis somática es un proceso en el cual se desarrollan estructuras bipolares, que carecen de conexión vascular con el tejido del que se originan (Jiménez, 2005). Los embriones somáticos (ESs) se asemejan morfológicamente a los EC e igualmente tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación. La diferencia radica en que la formación del embrión cigótico es un proceso de reproducción sexual antecedido por la fertilización (fusión de gametos), mientras que los ESs se forman a partir de células somáticas que adquieren competencia embriogénica como resultado de estímulos, físicos o químicos, que disparan la transición del estado vegetativo al estado embriogénico (Avilés-Vinas *et al.*, 2013).

Los ESs son utilizados en numerosos estudios fisiológicos de desarrollo embrionario. Sin embargo, su mayor importancia se debe a su aplicación práctica en la propagación de plantas a gran escala mediante el uso de biorreactores. Otra de sus ventajas es que pueden ser criopreservados, posibilitando el establecimiento de bibliotecas de genes. Además, los cultivos embriogénicos son también un blanco atractivo para la modificación genética utilizando diversos sistemas de transformación (Von Arnold *et al.*, 2002).

3. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *IN VITRO*

La embriogénesis somática (ES) es un proceso que puede ocurrir de forma natural como respuesta de determinadas plantas al estrés ambiental y como método de reproducción para garantizar el mantenimiento de la especie, por lo que algunas especies presentan cierta predisposición genética (Zavattieri *et al.*, 2010). Este proceso puede ser inducido *in vitro* exponiendo al explante a la acción de reguladores de crecimiento (RC) adicionados al medio de cultivo y/o sometiénolo a condiciones de estrés, estímulos que determinan que las células somáticas adquieran competencia embriogénica. Los estudios a nivel molecular apoyan la correlación de los RC con el control de la remodelación de la cromatina y la expresión de genes durante la inducción de ES (Méndez-Hernández *et al.*, 2019). Las auxinas se consideran los RC más importantes que regulan la inducción de ES. El contenido endógeno y la aplicación exógena son factores determinantes durante esta fase (Thomas y Jiménez, 2005). El ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D) es la auxina sintética más utilizada para este fin (García *et al.*, 2019).

La histodiferenciación es la fase que precede a la inducción *in vitro*. Es de gran importancia ya que durante esta se forman los tejidos vasculares de la planta y adquiere polaridad el embrión. El desarrollo de embriones somáticos implica etapas similares a las de la embriogénesis cigótica. En el caso de plantas dicotiledóneas estas son: estadio globular y corazón (estadios tempranos), torpedo y cotiledonares (estadios avanzados) (Winkelmann, 2016). Sin embargo, se debe considerar que los embriones cigóticos se nutren a través del tejido del floema, mientras que los embriones somáticos utilizan un suministro exógeno de carbohidratos y sus etapas morfológicas se producen sin conexión con tejido vascular (Quinga *et al.*, 2018), por lo que el éxito de esta etapa estará dado por el correcto balance de componentes, principalmente de RC, del medio de cultivo.

Una vez que los embriones somáticos alcanzan la etapa torpedo, inicia la maduración durante la cual ocurre básicamente una elongación celular, sin división y se comienza a diferenciar el ápice caulinar del brote dando lugar a los cotiledones. Entre los estímulos que hacen posible la maduración se encuentra la acción del ácido abscísico. La germinación requiere de estímulos como la luz, ácido giberélico o citocininas, para que continúe el proceso de elongación y ocurra una reactivación metabólica del embrión somático maduro para convertirse en una plántula (Pérez *et al.*, 1999).

El proceso morfogénico es muy complejo y está influenciado por la interacción de diversos factores como son las condiciones de incubación, composición del medio de cultivo, las concentraciones de RC, el tipo de explante, la edad y el genotipo de la planta madre y su estadio fisiológico. Todos estos factores pudieran estar involucrados en la dificultad o incapacidad de algunos géneros vegetales de responder a la morfogénesis en cualquiera de sus etapas, lo que se denomina recalcitrancia y puede ser de naturaleza fisiológica, genética o epigenética (Gaj, 2004).

3.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *Capsicum*

La ES en el género *Capsicum* fue descrita por primera vez en *C. annum* con una baja eficiencia en la inducción y poca reproducibilidad de la técnica (Harini y Sita, 1993). Posteriormente ha sido documentada por otros autores como un proceso severamente

recalcitrante, lo cual se manifiesta en la baja eficiencia de los protocolos de regeneración, alto índice de embriones deformados y el bajo porcentaje de germinación y conversión de ESs en plantas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo *et al.*, 2016). Diversos autores han estudiado la naturaleza de este fenómeno probando el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en el medio (Steinitz *et al.*, 2003), adición de vitaminas y minerales, así como otros suplementos (Kintzios *et al.*, 2001). Se han probado también diferentes explantes, entre los más utilizados están los embriones cigóticos (Kaparakis y Alderson, 2008). Sin embargo, en la mayoría de los protocolos los embriones somáticos regenerados exhiben anomalías morfológicas como ausencia de cotiledones, cotiledones únicos o deformes y supresión del brote. Este problema limita la utilización de la ES para la propagación de variedades de este género *in vitro*, por lo que su estudio se ha vuelto de especial interés para la ciencia.

3.2 ESPECIFICIDADES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN LA ESPECIE *Capsicum chinense*

El primer protocolo de embriogénesis somática en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) fue reportado por López-Puc *et al.*, (2006), en el cual, aunque se obtuvo un número significativo de embriones, el porcentaje de germinación fue bajo debido a anomalías en la diferenciación y desarrollo retardado. El estudio de la ontogénesis de la ES realizado por Santana-Buzzy *et al.* (2009) permitió observar estas deformaciones a nivel de tejidos, constituyendo la caracterización histológica más completa de embriones somáticos del género *Capsicum* hasta el momento. En dicho artículo se discute que estas anomalías pudieran deberse a la exposición continua del explante al regulador decrecimiento 2,4-D, por lo que se plantea la necesidad de optimizar los protocolos de embriogénesis en la especie. En este sentido, en el trabajo realizado por Avilés-Viñas *et al.* (2013) se evaluó el efecto de diferentes tratamientos que incluían la reducción de la concentración del RC alternando los tiempos de exposición. Aunque se formuló un protocolo altamente eficiente para la obtención de embriones somáticos con una mejor morfología, se observó que la eliminación total del 2,4-D del medio de histodiferenciación implicó que un menor número de embriones alcanzara el estadio cotiledonar. Igualmente se observaron anomalías en la diferenciación de la protodermis del ápice caulinar, y aunque se reportó un mayor porcentaje de germinación no se logró regenerar plantas completas a partir de estos embriones.

Por otra parte, se han desarrollado diversos estudios que han puesto en evidencia la naturaleza multifactorial de la recalcitrancia, con la intención de lograr un mayor

entendimiento en cuanto a los factores que limitan la conversión de los ESs en plantas. Lecona-Guzmán *et al.* (2012) reportaron diferencias notables entre los perfiles de proteínas de los embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense*, en los que se observó una disminución gradual del contenido de proteínas totales con el avance en estadio de desarrollo, lo cual difiere de lo reportado para otras especies. Regla-Márquez *et al.* (2015), detectaron la presencia de cadaverina como una poliamina que se encuentra comúnmente tanto en embriones somáticos como cigóticos de chile habanero, pero que es raramente encontrada en plantas. Además, observaron niveles notablemente mayores de poliaminas en ESs, influenciado por factores ambientales como la presencia de etileno en el medio de cultivo.

3.3 GENES INVOLUCRADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Capsicum chinense*

Muchas investigaciones se han enfocado en la identificación de genes maestros de la embriogénesis, revelando la complejidad de este proceso controlado por una intrincada red genética. La embriogénesis cigótica depende de un sofisticado programa morfogénico en el que varios genes, principalmente aquellos que codifican los factores de transcripción (FT), regulan todo el proceso desde la formación del cigoto hasta la maduración del embrión. Los embriones cigóticos y somáticos muestran varias similitudes en el programa morfogénico que los controla, por lo que pueden ser comparados en cuanto a la expresión de genes en un mismo estadio de desarrollo (García *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta este aspecto, en el trabajo de Valle-Gough *et al.* (2015) en *C. chinense*, se reportaron diferencias al comparar los patrones de expresión de los genes *WUS*, *WOX1*, *WOX3* pertenecientes a la familia WUSCHEL homeobox, la cual está directamente involucrada en la determinación de los dominios apical y basal en diferentes especies, principalmente en la formación del meristemo apical del brote y cotiledones. Estudios anteriores relacionan estas deformaciones en el meristemo apical del brote con alteraciones en el transporte de auxinas durante el desarrollo embrionario. Se conoce que los genes de esta familia interactúan con genes responsivos a auxinas (Busch *et al.*, 2010) y están involucrados en el establecimiento del transporte de auxinas por su interacción con *PIN1* (Su *et al.*, 2009). Las alteraciones observadas en su patrón de expresión sugieren que existe una distorsión en la distribución de auxinas causada por una desregulación en la expresión de transportadores de la familia *PIN FORMED*, lo cual se confirma en el estudio realizado por Regla-Márquez *et al.* (2019),

al reportar que el patrón de expresión del gen *PIN1* es completamente opuesto en ESs y EC, mientras que en el caso del transportador *PIN7* existe una sobreacumulación en ESs. En ese trabajo también se evaluó la expresión de los genes implicados en la diferenciación del meristemo apical de las familias *WUSCHEL (WUS)*, *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, los genes de la familia *CUP SHAPED COTYLEDON* y *NO APICAL MERISTEM (NAM)*. Los resultados mostraron que el patrón de *STM* y de *PIN1* en los ES fue completamente opuesto al de EC, mientras que *NAM* y *PIN7* mostraron una sobreacumulación de transcritos en ESs, comparados con el patrón de expresión de estos genes en ECs.

4. GENES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y EL TRANSPORTE DE AUXINAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

La distribución de la auxina (Ax), 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 la auxina endógena establece una distribución heterogénea entre las células de un tejido y resulta en un gradiente en espacio-tiempo. La acumulación de la auxina en áreas específicas está asociada a zonas de división celular activa, 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).

La aplicación de Ax exógena en el medio de cultivo puede cambiar el equilibrio de los niveles de Ax en las células modificando el metabolismo de AIA. Esto es importante para la inducción de la ES (Fraga *et al.*, 2012). Aunque este proceso no ha sido completamente dilucidado, se sabe que es necesario el establecimiento de una distribución irregular de auxinas en la célula para iniciar la formación del embrión. Sin embargo, la exposición a altas concentraciones del regulador del crecimiento (especialmente 2,4-D) o exposición prolongada puede bloquear el desarrollo normal del embrión (Vondráková *et al.*, 2011). Por lo tanto, el 2,4-D se ha relacionado con la formación anormal de SE, porque en altas concentraciones interrumpe los procesos genéticos y fisiológicos normales en las células tratadas (García *et al.*, 2019).

La síntesis y el transporte de auxinas igualmente se encuentra regulado por una red genética compleja, en la que se destaca el papel de algunos factores de transcripción en la regulación del proceso. Algunos de estos se han identificado como genes marcadores de la embriogénesis en estadios tempranos. Recientemente se ha reportado que FT

pertencientes a las familias *BABY BOOM* y *LEAFY COTYLEDON*, y actúan en la regulación de una misma red transcripcional ejerciendo su control sobre la expresión de genes implicados en la síntesis de auxinas en *Arabidopsis* (Horstman *et al.*, 2017) (Figura 1.1).

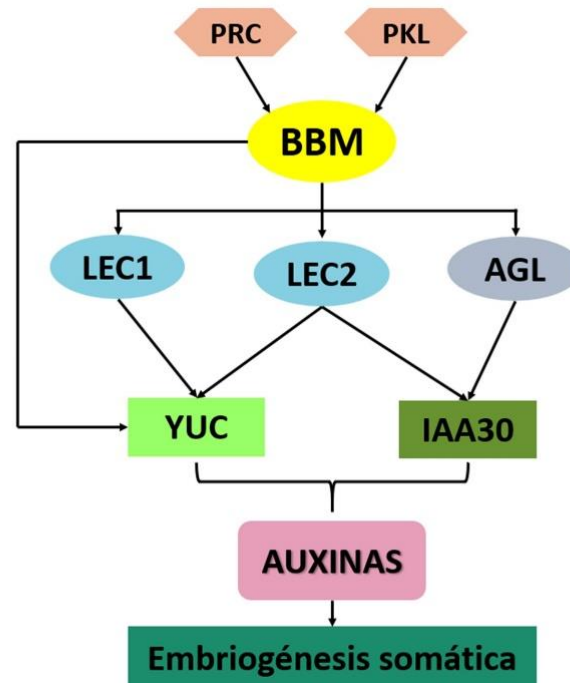


Figura 1.1 Red transcripcional involucrada en la regulación de la homeostasis de auxinas en *Arabidopsis thaliana* (Modificado de Jha y Kumar, 2018).

4.1 *BABY BOOM*

El análisis de expresión de *BABY BOOM* (*BBM*) en ESs de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* L., mostró que es expresado desde las etapas tempranas de la embriogénesis (Ouakfaoui *et al.*, 2010; Boutilier *et al.*, 2002). Durante el desarrollo de los embriones cigóticos en *B. napus*, *BBM* se expresa durante las diferentes etapas en todo el embrión mientras que en *Arabidopsis* sólo es detectado en el tejido provascular y en las células del centro quiescente en la etapa de corazón (Kulinska-Lukaszek *et al.*, 2012). Irikova *et al.* (2012), detectaron por primera vez en *Capsicum annuum* el factor de transcripción *BBM*. Al comparar las secuencias parciales revelaron una alta similitud entre las secuencias aisladas y aquellas registradas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Al realizar una traducción *in silico*, el BLAST de la proteína *BBM* en la

base de datos del NCBI, reveló la presencia de un dominio funcional tipo AP2. Mediante la RT-PCR se detectaron altos niveles de expresión de *BBM* en las etapas tempranas de desarrollo de los embriones provenientes del cultivo de anteras, y en todos los estadios de los embriones somáticos. Al analizar diferentes variedades de *C. annuum* de baja y alta capacidad embriogénica no se pudo relacionar como un marcador para el desarrollo de embriones como lo es para *B. napus*.

4.2 LEAFY COTYLEDON

Estos genes codifican factores de transcripción involucrados en la regulación de la síntesis de auxinas durante la embriogénesis (Jha y Kumar, 2018). Esta función explica su importancia en la señalización del proceso embriogénico por lo que son considerados genes marcadores de la embriogénesis y esenciales para el desarrollo correcto de los embriones. *LEC1* ha sido propuesto como un regulador clave para la identidad embrionaria, los embriones mutantes de *lec1* tienen una morfología anormal, con tricomas en los cotiledones, además no tienen tolerancia a la desecación. Su expresión ha sido observada en las semillas en desarrollo, y la expresión ectópica induce la formación de estructuras parecidas a embriones (Ledwon y Gaj, 2011). *LEC2* regula muchos aspectos de la embriogénesis somática y codifica un factor de transcripción con un dominio B3, una región de unión al ADN solo encontrada en plantas (Shivani *et al.*, 2017). Durante las fases tempranas de la embriogénesis somática en la cual se establece el diseño básico del cuerpo del embrión es, las mutaciones en *LEC2* afectan el mantenimiento del destino de la célula embrionaria y la especificación de la identidad del cotiledón. Más tarde en la embriogénesis, en las mutantes *lec2* las puntas de los cotiledones no acumulan reservas de almacenamiento, indicando defectos en la iniciación y/o mantenimiento de la fase de maduración (Karami *et al.*, 2009).

4.3 PIN FORMED

El transporte polar de auxinas requiere de la activación de las proteínas transmembrana de la familia *PIN-FORMED* (*PIN*), que permiten que el transporte de estas fitohormonas se realice de manera direccional, como resultado de la localización polar de los transportadores *PIN* (Adamowski and Friml, 2015; Ljung, 2013). Los primeros miembros de la familia *PIN*, identificados y asociados con el transporte de auxinas se describieron en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, con 8 genes *PIN* anotados que se dividen en dos

subfamilias (Okada *et al.*, 1991). La principal característica estructural de la subfamilia mayor (*PIN1-PIN4* y *PIN7* y *PIN* canónicos) es la presencia de una región distintiva central de lazo hidrofílico que separa dos dominios hidrofóbicos de alrededor de cinco regiones transmembrana cada uno (Figura 1.2). La organización intrón/exón de los genes *PIN* es altamente conservada, presentando seis exones en su secuencia. El primer exón corresponde al extremo amino-terminal del segmento transmembrana y gran parte del lazo hidrofílico central. El segundo exón abarca el resto de la región variable del lazo y el extremo carboxi-terminal del dominio transmembrana. A continuación, hay 4 exones conservados que codifican para el resto del segundo dominio transmembrana. El lazo hidrofílico es la región más divergente de las proteínas *PIN* y en base a la homología de secuencia aminoacídica en este dominio estos transportadores se pueden dividir en siete grupos (1,2 y 4-8). Estos grupos difieren en la regulación de su expresión, localización y actividad más que en su función general como transportadores de auxinas. Aunque existen diferencias marcadas en la composición del lazo (loop) entre grupos, los genes *PIN* pueden ser clasificados como ortólogos con base en la similitud de secuencia de las regiones transmembrana (Krecek *et al.*, 2009).

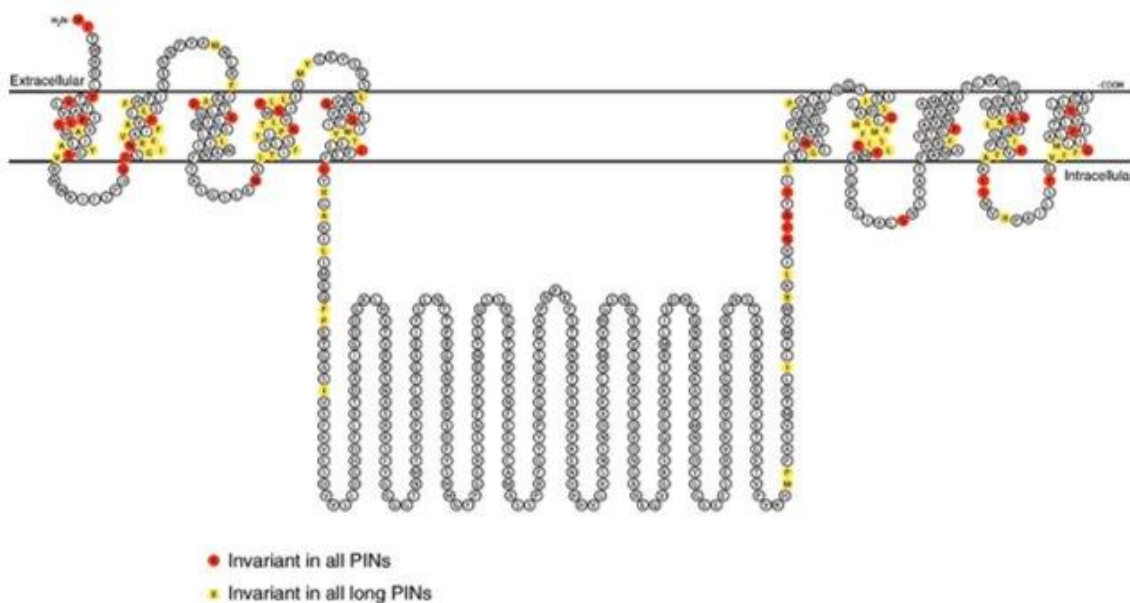


Figura 1.2 Predicción de la estructura de las proteínas PIN. La secuencia que se muestra se deriva de AtPIN7. Las posiciones marcadas en amarillos son secuencias conservadas en la subfamilia mayor PIN. Las posiciones marcadas en rojo son invariantes en secuencia en todos los PIN. Tomado de Krecek *et al.* (2009).

En las plantas las proteínas PIN actúan como reguladores clave en múltiples eventos de desarrollo que van desde la embriogénesis a través de la morfogénesis y la organogénesis hasta las respuestas de crecimiento a los estímulos ambientales. Las proteínas *PIN* están restringidas a caras particulares de la célula, por lo tanto, pueden mediar los flujos direccionales de auxina dentro de los tejidos y generar gradientes que influyen en procesos de desarrollo específicos (Pérez-Pastrana, 2019).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la baja eficiencia de conversión de los embriones somáticos de *C. chinense* por las anomalías en el proceso de histodiferenciación, es necesario conocer las bases genéticas de este fenómeno. Por lo que una evaluación de la expresión de genes clave en la regulación de la síntesis y transporte de auxinas como *BABY BOOM (BBM)*, *LEAFY COTILEDON (LEC)* y *PIN FORMED (PIN)*, pudiera arrojar datos valiosos que mejoren la comprensión de este proceso.

HIPÓTESIS

El patrón de expresión de los genes *BBM*, *LEC1* y *PIN* (1 y 7) difiere del observado en los embriones cigóticos de *Capsicum chinense*, lo que pudiera estar relacionado con la incapacidad de regeneración de esta especie.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el patrón de expresión de los genes *BBM*, *LEC*, *PIN1* y *PIN7* en embriones somáticos con la expresión de los mismos en embriones cigóticos de *Capsicum chinense*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar y cuantificar la acumulación de transcritos de los genes *BBM*, *LEC* y *PIN1* y *PIN7* en estadio temprano y avanzado de embriones somáticos.
- Detectar y cuantificar la acumulación de transcritos de los genes *BBM*, *LEC* y *PIN1* y *PIN7* en estadio temprano y avanzado de embriones cigóticos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

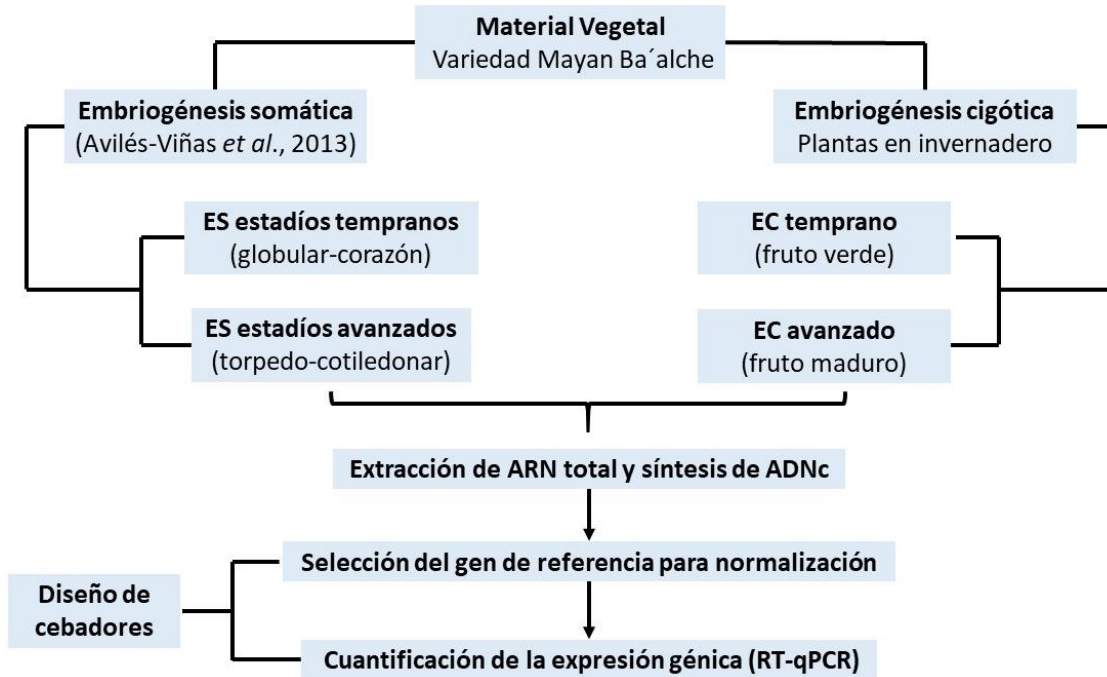


Figura 1.3 Diagrama de flujo de trabajo para el análisis de expresión de los genes *BBM*, *LEC* y *PIN* (1 y 7) en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense*.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES

Para la germinación de semillas se utilizó el medio de cultivo MS semisólido. Se distribuyeron a 25 mL por frasco, en frascos de vidrio tipo Gerber de 100 mL. La inducción de embriogénesis somática y el proceso de histodiferenciación se llevó a cabo en medio MS líquido, colocando 50 mL de medio en matraces de 250 mL. La esterilización de medios y materiales de cultivo se llevó a cabo en autoclave a 121 °C y 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 15 minutos. El pH de los medios se ajustó antes de la esterilización a 5.8 con NaOH 1N y HCl 1N. Las siembras se realizaron en campana de flujo de aire laminar horizontal.

2.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de la variedad Mayan Ba'alché (CHL-012-291110) procedentes del banco de germoplasma de *C. chinense* Jacq. del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Para la desinfección superficial de las semillas se sumergieron en cloro comercial al 100% durante 10 min y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Para la germinación se colocaron 15 semillas/frasco en medio semisólido adicionado con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y 1.5 µM de ácido giberélico. Se incubaron en la oscuridad por 15 días y posteriormente se transfirieron a condiciones de 24 h luz a una temperatura de 25 ± 2 °C durante 15 días. Los embriones cigóticos fueron extraídos de semillas de la misma variedad provenientes de frutos verdes (estadios tempranos) y maduros (estadios avanzados).

2.3 OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

La inducción de la embriogénesis somática se realizó siguiendo el protocolo descrito por Avilés-Vinas *et al.* (2013). Se tomaron segmentos de hipocótilos de las plántulas de *C. chinense* germinadas in vitro y se sembraron en medio MS, con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (9.05 µM), sacarosa (30 g.L⁻¹) y gelrite (2.2 g.L⁻¹). Los explantes se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C y a una intensidad lumínica de 40 - 50 µM.m². s⁻¹. Los hipocótilos se transfirieron 30 días post-inducción a medio líquido de

histodiferenciación con sales MS, 2,4-D (4.5 μM) y sacarosa (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se incubaron en agitación (100 rpm) en condiciones de luz continua a la misma temperatura e intensidad lumínica utilizadas para la inducción. A los 30 días se transfirieron a medio fresco. Se tomaron muestras de ES en etapa globular, corazón, torpedo y cotiledonar a los 60 días de cultivo *in vitro*. Las muestras de ESs se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. EXTRACCIÓN DE ARN DE EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE *C. chinense*

La extracción de ARN total se hizo utilizando 1 mL del reactivo TRIzol siguiendo la metodología de Chomczynsky y Sacchi (1987). Las muestras se pesaron previamente y se siguió el protocolo partiendo de 50, 100 y 200 mg de ESs en estadios tempranos y avanzados. En el caso de embriones cigóticos se probaron cantidades de 500 y 200 mg utilizando el método de extracción normal (de Chomozynsky y Sacchi; 1987) y una variante de este método en la que se repite el paso de adición de cloroformo, al que se hará referencia en adelante como método de doble cloroformo. Las muestras de ARN se trataron con DNasa I (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó en geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X a 130V teñido con bromuro de etidio ($60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las muestras se cuantificaron en NanoDrop TM de la marca Thermo Scientific y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

La síntesis de ADNc se realizó utilizando 1 μL de Oligo-dT (Invitrogen) y 1 μL de dNTP (10 mM), agregando agua libre de nucleasas a un volumen final de 10 μL . A esta mezcla se le agregó 2 μL de ARN (70 $\text{ng}/\mu\text{L}$), se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min e inmediatamente se transfirió a hielo 1 min. Posteriormente se agregó 2 μL de dTT (0.1 M), 4 μL de First-Strand Buffer 5x, 1 μL de RNasa OUT y 1 μL de RT-SuperScript-111 (Invitrogen). La mezcla se calentó $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (40 min) y la reacción se finalizó a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (15 min).

2.6. DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores para *BBM* (HM345995), *LEC* (HM345996) y *PIN3* (XM_016717266.1) fueron diseñados a partir de las secuencias de ADN de estos genes en *Capsicum annum* disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)

con los números de acceso señalados. El diseño se realizó en los programas Primer3 y NCBI Primer Tool utilizando los parámetros recomendados para PCR cuantitativa: longitud de 20-25 pb, con un contenido de GC del 50% y amplicones de 90-200 pb. Posteriormente se analizaron con la herramienta de PCR *in silico* (Genome Compiler) para verificar su especificidad y el OligoAnalyzer (IDT Technologies) para comprobar que no formaran heterodímeros. Para la amplificación de *PIN1* y *PIN7* se utilizaron cebadores reportados por Regla-Márquez *et al.* (2019). analizados en OligoAnalyser (IDT Technologies) para confirmar que no formaran heterodímeros (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Cebadores utilizados para la amplificación de *BBM*, *LEC*, *PIN1* y *PIN7*.

Gen	Directo 5´-3´	Directo 5´-3´	Tm (°C)	Tamaño del fragmento
<i>BBM</i>	GTTGCACACTTGAGAAGG	CTAGCTTGCCATCTACCA	58	98 pb
<i>LEC</i>	CCGATAGCCAACGTGATTC	GAACCTCGGACACGCATTC	60	102 pb
<i>PIN1</i>	TTTACTCAATGGTTGCTGGTG	TGATTTCCCACTTTCTCCTC	60	126 pb
<i>PIN7</i>	ACCTGCACCTACTAATGCTG	GTCCAATGCCAAGCTCATTACC	60	194 pb

2.7. DETERMINACIÓN DEL MEJOR GEN CANDIDATO DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

Para la selección de los genes candidatos de referencia a evaluar se tomaron en cuenta los resultados reportados por Wan *et al.* (2011) para *Capsicum annuum*, así como el estudio realizado por Bin *et al.* (2012). En el Cuadro 2.2 se describen los cebadores utilizados para amplificar los genes de referencia seleccionados.

Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para la amplificación de los genes de referencia *ACT*, β -*TUB*, *UBI3* y *GAPDH*.

Gen	Directo 5´-3´	Reverso 5´-3´	Referencia
<i>ACT</i>	TGTTATGGTAGGGATGGGTC	TTCTCTCTATTTGCCTTGGG	Wan <i>et al.</i> , 2011
β-<i>TUB</i>	GAGGGTGAGTGAGCAGTTC	CTTCATCGTCATCTGCTGTC	
<i>UBI3</i>	TGTCCATCTGCTCTCTGTTG	CACCCCAAGCACAATAAGAC	
<i>GAPDH</i>	ATGATGATGTGAAAG CAGCG	TTTCAACTGGTGGCTGCTAC	Bin <i>et al.</i> , 2012

Los genes candidatos se evaluaron con todas las muestras (embriones somáticos y cigóticos en estadios tempranos y tardíos) y se seleccionó en cada caso el más adecuado para cada tratamiento. La especificidad de amplificación de los cebadores se verificó por medio del análisis de la curva de fusión. Para la selección de los mejores genes candidatos a genes de referencia, se utilizaron las herramientas informáticas *Bestkeeper* v1 (Pfaffl *et al.*, 2004), *geNorm* 3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002) y *Normfinder* (Andersen *et al.*, 2004).

2.8. ANÁLISIS DE TRANSCRITOS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Se utilizaron los cebadores previamente descritos de los genes de interés *BBM*, *LEC*, *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* así como de los genes constitutivos: Ubiquitina-3 (*UBI-3*) y beta-Tubulina (β -*TUB*) y Actina (*ACT*). La expresión relativa se procesó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores de los Ct y el análisis de expresión relativa de los genes bajo estudio, se estimó usando el software Applied Biosystems StepOne™. El nivel de transcripción del gen fue expresado como Cantidades Relativas (CR), a partir del análisis del gen de referencia (ecuación 1) y de la Expresión Relativa (ER) del gen de interés (ecuación 2). Los datos fueron cuantificados con respecto al control según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

$$\text{Ecuación (1) CR} = 2^{-\Delta CtE}$$

$$\text{Ecuación (2) ER} = 2^{-\Delta\Delta CtE}$$

Las reacciones de PCR tanto para los genes de referencia como para los de interés, se hicieron en un volumen final de 25 μ L, que contenía 1X de master mix Maxima SYBR Green/Rox qPCR (ThermoScientific, California, USA), 0.3 μ M de cada iniciador y 2 μ L de ADNc (100 ng/ μ L), en un termociclador Applied Biosystems StepOne™ (California, USA). Las condiciones de amplificación, para ambos casos fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial a 95 °C por 20 s, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 3 segundos, y un alineamiento a 60 °C durante 60 s, con una curva de fusión con incrementos de 0.5 °C cada 5 s, en un gradiente lineal de 65 a 95 °C.

2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se empleó el Software STATISTICA 13.0. Primeramente se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas para comprobar si los datos se ajustan a una distribución normal. Posteriormente se realizó un ANOVA De clasificación simple seguido de una Prueba de comparación de medias de Tuckey para aquellos datos que

tenían distribución normal. Los datos que no seguían una distribución normal fueron transformados usando logaritmo natural y analizados con el mismo procedimiento.

CAPÍTULO III**3. RESULTADOS****3.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

Con la aplicación del protocolo establecido por Avilés-Viñas *et al.* (2013), se obtuvieron embriones de forma directa del hipocótilo (Figura 3.1A). A los 60 días de inducido el proceso, se observó una frecuencia de formación de embriones de aproximadamente 100 ESs por explante, pudiendo distinguirse los diferentes estadios de desarrollo de los embriones: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. La mayoría de los embriones en estadios avanzados presentaron deformaciones (Figura 3.1B). Entre estas deformaciones, las más frecuentes fueron: la forma de alfiler (pin shaped) (Figura 3.1C), ausencia de cotiledones y fusión de cotiledones.

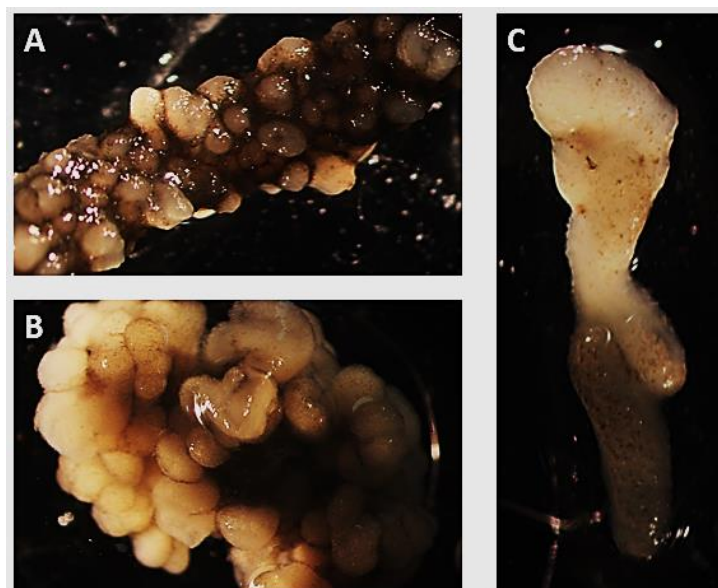


Figura 3.1 Embriogénesis somática en *Capsicum chinense* **A)** Hipocotilo de *C. chinense* a los 30 días de inducción de la embriogénesis **B)** Hipocotilo a los 60 días post-inducción. **C)** Embrión deformado con forma de alfiler.

3.2 EXTRACCIÓN DE ARN DE EMBRIONES DE *C.chinense*

Se extrajo el ARN total de ESs y ECs en ambos estadios. Se verificó la integridad del ARN mediante la observación de las subunidades ribosomales 28S y 18S por electroforesis (Figura 3.2). Las muestras de 200 mg de embrión somático (EST200 y ESA200) tuvieron los mejores resultados en cuanto a cantidad de ARN extraído y su pureza, tanto para

estadios tempranos como avanzados (Cuadro 3.1). Por ello, para estudios posteriores, en EC, se propone utilizar preferencialmente el método de extracción normal partiendo de 200 mg (ECV200N) de semilla, proveniente del fruto verde y 500 mg de semilla del fruto maduro (ECM500N). Aunque, con la extracción con doble cloroformo se obtuvo mayor pureza de la muestra, esta afectó considerablemente la concentración del ARN total extraído.

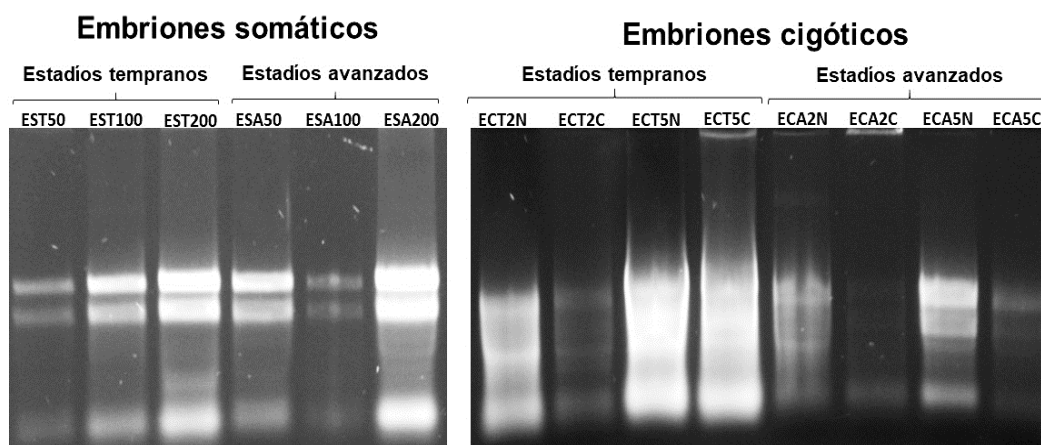


Figura 3.2 Extracción de ARN total de embriones somáticos y cigóticos de *C. chinense*. EST: Embrión somático en estadio temprano; ESA: Embrión somático en estadio avanzado; ECT: Embrión cigótico fruto verde (Temprano); ECA: Embrión cigótico fruto maduro (Avanzado); N: Método de extracción normal; C: Método de extracción con doble cloroformo.

Cuadro 3.1 Cuantificación y rango de absorbancia 260/280 de las muestras de ARN de embriones somáticos (ES) y cigóticos (EC) de *C. chinense*

	ID de muestra	C _{ARN} (ng/μl)	Abs 260/280
Embrión somático	EST 50	82.1	1.89
	ESA 50	276.0	2.03
	EST 100	307.9	2.08
	ESA 100	185.7	2.03
	EST 200	514.4	2.07
	ESA 200	600.6	2.08
Embrión cigótico	ECT2N	617.9	2.04
	ECT2C	706.5	2.09
	ECT5N	1195.0	2.14
	ECT5C	1450.4	2.07
	ECA2N	493.3	2.04
	ECA2C	737.4	1.75
	ECA5N	402.0	2.01
	ECA5C	570.0	2.03

3.3. SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA

En el tejido del embrión somático sometido a tratamiento hormonal, los valores de Ct de los tres genes de referencia evaluados estuvieron en un rango de 16 (para el gen *GAPDH*) a 32 (para el gen *ACT*), mientras que, en el tejido del embrión cigótico, oscilaron entre 19 (para el gen *GAPDH*) a 34 (para los genes *ACT* y β -*TUB*). Las curvas de disociación de cada gen (Figura 3.3) muestran un único pico de amplificación en todas las muestras evaluadas, confirmando la especificidad de los cebadores empleados. La eficiencia de la amplificación de la qPCR para estos genes varió de 90.1% a 97%. De acuerdo a los valores de eficiencia de la reacción, los tres genes presentaron una buena amplificación para las muestras analizadas, lo que fue validado por los diferentes programas estadísticos que analizan la estabilidad de los genes candidatos de referencia y que fueron utilizados como se describe en materiales y métodos.

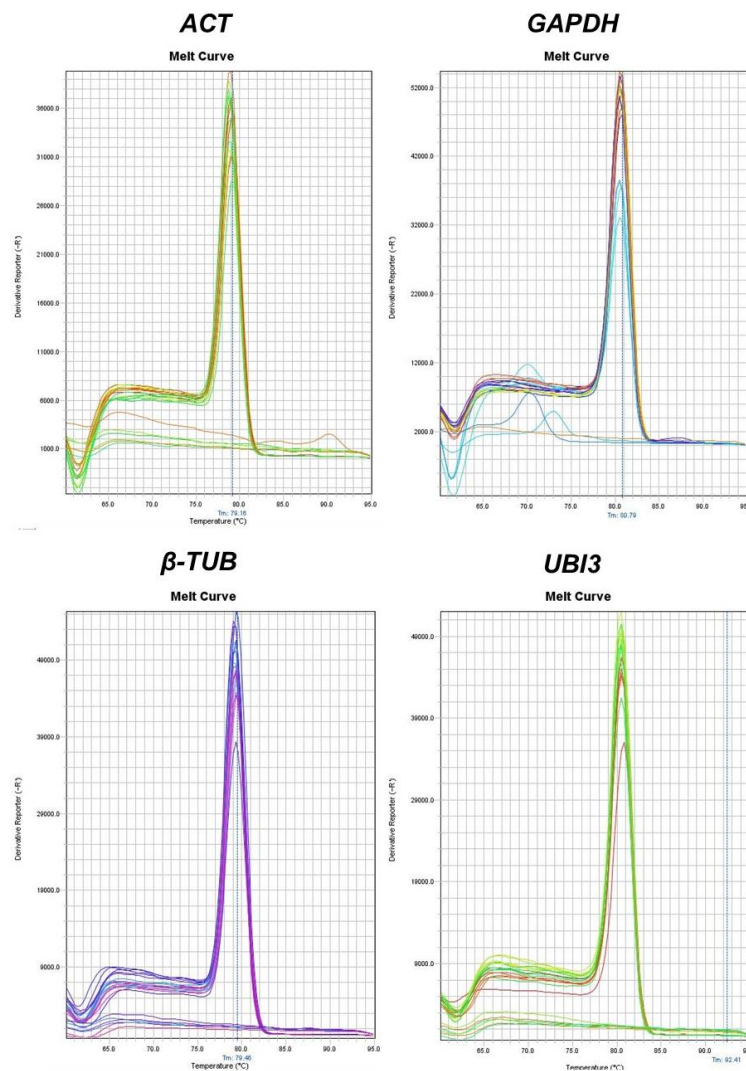


Figura 3.3 Curva de disociación de los genes candidatos de referencia *ACT*, *GAPDH*, β -*TUB*, y *UBI3*.

En el Cuadro 3.2 se muestran los valores estadísticos indicadores de estabilidad calculados por los programas *Genorm*, *NormFinder* y *BestKeeper* para cada uno de los genes candidatos a gen de referencia en muestras de embrión somático y cigótico en estadio temprano y avanzado.

Cuadro 3.2 Parámetros estadísticos indicadores de estabilidad calculados por los programas *Genorm*, *NormFinder* y *BestKeeper* para los genes candidatos de referencia en muestras de embrión somático y cigótico

Muestras	Genes	<i>Genorm</i> (M)	<i>NormFinder</i>	<i>BestKeeper</i>	
				DE (\pm Ct)	CV (%Ct)
Embriones somáticos	<i>ACT</i>	1.275	0.992	0.91	2.98
	<i>β-TUB</i>	1.23	0.898	0.74	2.38
	<i>GAPDH</i>	1.983	0.854	1.06	6.03
	<i>UBI3</i>	1.09	0.423	0.26	0.96
Embriones cigóticos	<i>ACT</i>	0.0585	0.646	0.87	2.58
	<i>β-TUB</i>	0.0700	0.146	0.95	2.84
	<i>GAPDH</i>	0.901	1.876	5.47	21.16
	<i>UBI3</i>	0.0520	0.245	0.89	3.07

SD [\pm CP]: desviación estándar de CP; CV [%CP]: coeficiente de variación expresado como porcentaje del nivel CP

El rango de valores del índice de estabilidad M calculado por *Genorm* difirió significativamente entre los tejidos de embriones somáticos y cigóticos. En tejidos de embrión somático los valores de este parámetro estuvieron en un rango entre 1.09 (*UBI3*) y 1.983 (*GAPDH*), mientras que, en embriones cigóticos, este parámetro presentó escasa variación entre los genes analizados, con valores en un rango de 0.052 (*UBI3*) a 0.901 (*GAPDH*). En ambos grupos de muestras coincidió que el gen *UBI3* presentó el menor valor de M y por tanto tiene la mayor estabilidad. Por otra parte, el gen *GAPDH* fue el de menor estabilidad para embrión somático y cigótico.

El análisis estadístico con la herramienta *NormFinder* arrojó valores de estabilidad entre 0.992 (*ACT*) y 0.423 (*UBI3*) en embriones somáticos y en cigóticos entre 1.876 (*GAPDH*) y 0.146 (*β -TUB*). Sin embargo, en embrión cigótico fue *β -TUB* el gen más estable. Para ambos tejidos evaluados el gen *GAPDH* presentó el mayor valor del parámetro estadístico calculado por *NormFinder*, por lo que presenta la menor estabilidad de expresión entre los genes evaluados en ambos tejidos.

El análisis de resultados del Software *BestKeeper* se realizó tomando en cuenta los parámetros estadísticos de desviación estándar DE ($\pm Ct$) y coeficiente de varianza CV (%Ct) como se muestra en el Cuadro 3.2. En embrión somático los genes candidatos analizados en conjunto tuvieron un coeficiente de variación de 3.61 y una desviación estándar de 1.06. *UBI3* (DE=0.26; CV=0.96) fue el gen más estable y *GAPDH* (DE: 1.06; CV: 6.03) el de menor estabilidad, ya que presentan los menores y mayores valores de estos parámetros respectivamente. Para este tejido sólo el gen *GADPH* se considera inestable, ya que es el único gen que no cumple con la condición $DE \leq 1$ (Pfaffl *et al.*, 2009). Lo mismo ocurre con este gen en tejidos de embrión cigótico. En contraste, los resultados señalan que *ACT* (DE: 0.87; CV: 2.58) es el gen más estable, seguido por *UBI3* (DE: 0.89; CV: 3.07) con valores muy cercanos.

El análisis integral de los resultados obtenidos en cada programa (Cuadro 3.2), refleja que la expresión de los genes constitutivos evaluados es más estable en embrión cigótico que en el somático, si se comparan los parámetros indicadores de estabilidad para un mismo gen en ambas muestras.

Tomando en cuenta los resultados de cada una de las herramientas utilizadas en este trabajo, se seleccionó el gen de referencia *UBI3* para la cuantificación relativa de la expresión génica, ya que los análisis realizados en *Genorm*, *BestKeeper* y *NormFinder* coinciden en señalar que el gen *UBI3* fue el más estable en embrión somático. Aunque para embrión cigótico, cada herramienta señaló un gen diferente, de igual manera se seleccionó *UBI3* como gen de referencia, teniendo en cuenta que es el gen más estable según *Genorm* y el segundo gen más estable según *NormFinder* y *Bestkeeper*, presentando en este último caso valores muy cercanos a los del gen más estable.

3.4 PRUEBA DE CEBADORES PARA PCR EN TIEMPO REAL

Se probaron los cebadores de los genes *LEC*, *BBM*, *PIN1* y *PIN7* con todas las muestras de embrión somático y cigótico en estadio temprano y avanzado. La curva de disociación confirmó la especificidad de los mismos, ya que se observó un único pico de amplificación en todas las muestras analizadas (Figura 3.4).

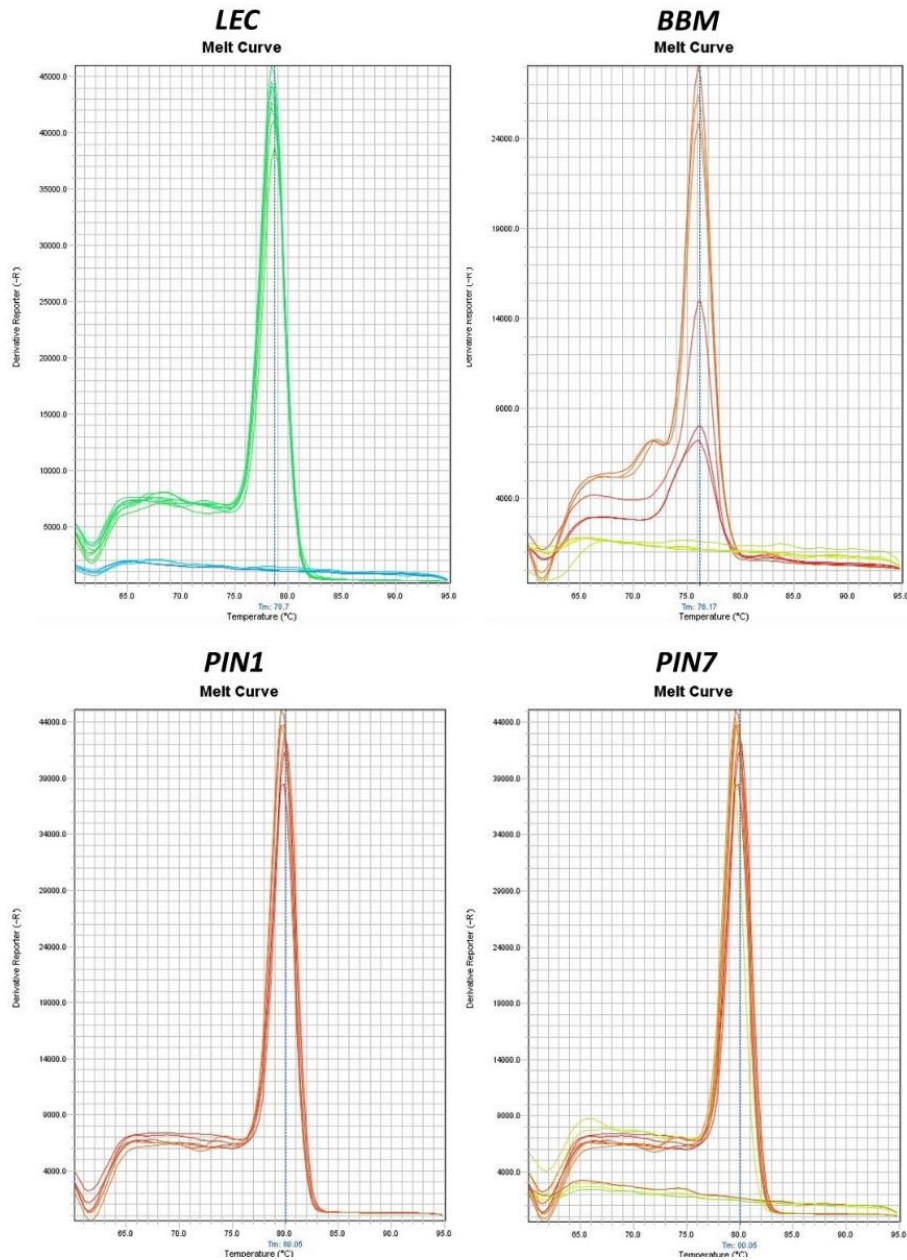


Figura 3.4 Curva de disociación de los fragmentos putativos de los genes *LEC*, *BBM*, *PIN1* y *PIN7* de *Capsicum chinense* en muestras de embrión somático y cigótico.

La especificidad de la amplificación también se comprobó por electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 3.5 se observa la presencia de una única banda en todas las muestras, que corresponde con el tamaño del amplicón esperado para cada gen, confirmando la especificidad de los cebadores empleados para la PCR.

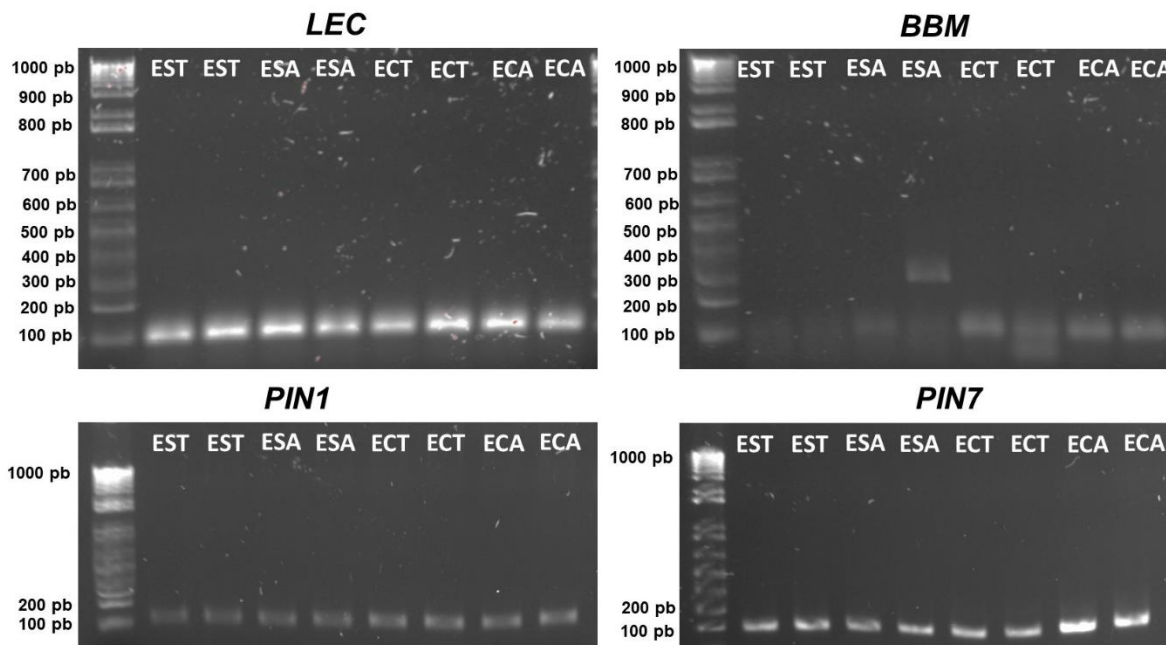


Figura 3.5 Geles de agarosa de los productos de la PCR en tiempo real para los genes *LEC*, *BBM*, *PIN1* y *PIN7* con muestras de embrión somático y cigótico de *Capsicum chinense*.

3.5 CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN EMBRIONES DE *Capsicum chinense*

3.5.1. *BBM* y *LEC*

Al analizar la acumulación de transcritos de *BBM* (Figura 3.6), se destacó que la muestra del embrión cigótico en estadios tempranos tuvo el máximo valor de expresión relativa, el cual es significativamente mayor en comparación con las demás muestras analizadas. El valor mínimo de expresión relativa se registró en embriones somáticos en estadio temprano, mientras que, los niveles de expresión en ambos tipos de embriones en estadio avanzado no presentaron diferencias significativas entre sí.

La mayor acumulación de transcritos de *LEC* se detectó en embriones somáticos en estadios tempranos y fue significativamente menor en estadios avanzados, donde se observaron los valores mínimos de expresión relativa (Figura 3.6). En embriones cigóticos el patrón de expresión es totalmente opuesto al que se registró en embriones somáticos, ya que hubo una acumulación de transcritos, significativamente mayor, en estadios avanzados que en estadios tempranos.

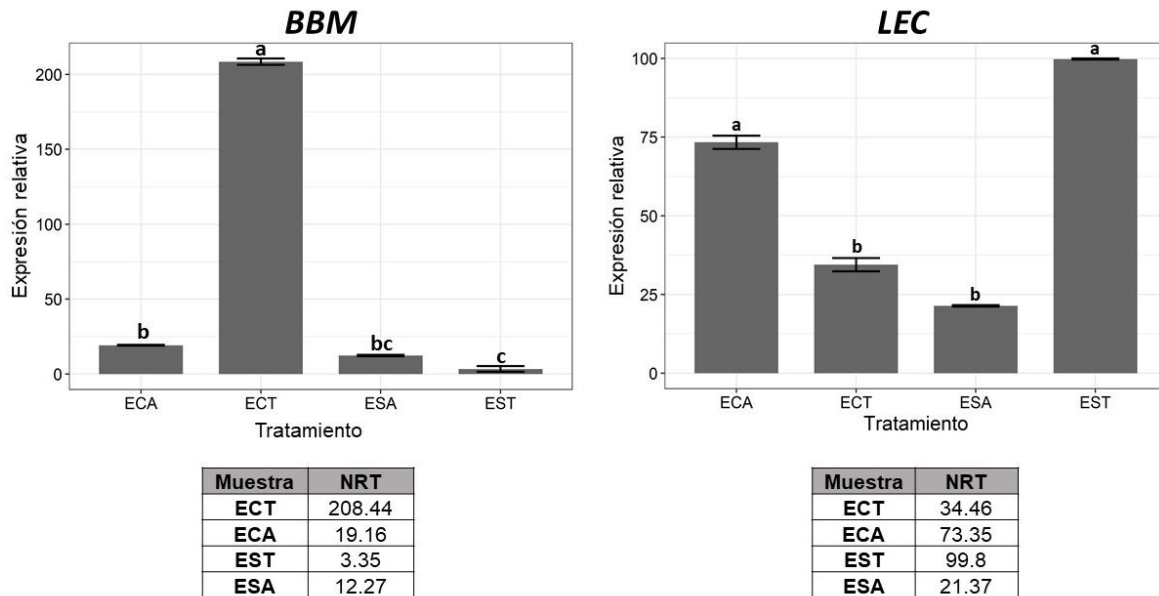


Figura 3.6 Cuantificación relativa de transcritos de *LEC* y *BBM* en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* en estadios tempranos y avanzados. (Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores promedio representados. n = 4; p <0.05)

3.5.2 *PIN 1 y 7*

Para el gen *PIN1* (Figura 3.7), la mayor acumulación de transcritos se detectó en embriones somáticos en estadios avanzados, mientras que en estadios tempranos fue significativamente menor. La más baja expresión se registró en embriones cigóticos en estadio avanzado, sin embargo, ésta no presentó diferencias significativas con la acumulación registrada en embriones cigóticos tempranos. Se destacan los altos niveles de transcritos acumulados en embriones somáticos avanzados en relación con los demás tejidos embrionarios analizados.

La expresión relativa de *PIN7* fue significativamente mayor en embriones cigóticos, que en embriones somáticos (Figura 3.7). La muestra de embrión cigótico avanzado presentó el valor máximo de transcritos acumulados, mientras que en embriones somáticos tempranos se registró el valor mínimo. El patrón de expresión de este gen se comporta de igual manera en ambos tipos de embriones: hay una menor acumulación de transcritos en estadios tempranos y un aumento de estos en estadios avanzados. Sin embargo, en embriones cigóticos existen diferencias significativas entre los niveles de expresión de ambos estadios,

lo cual no ocurre en embriones somáticos, donde se observan valores muy cercanos en ambos estadios.

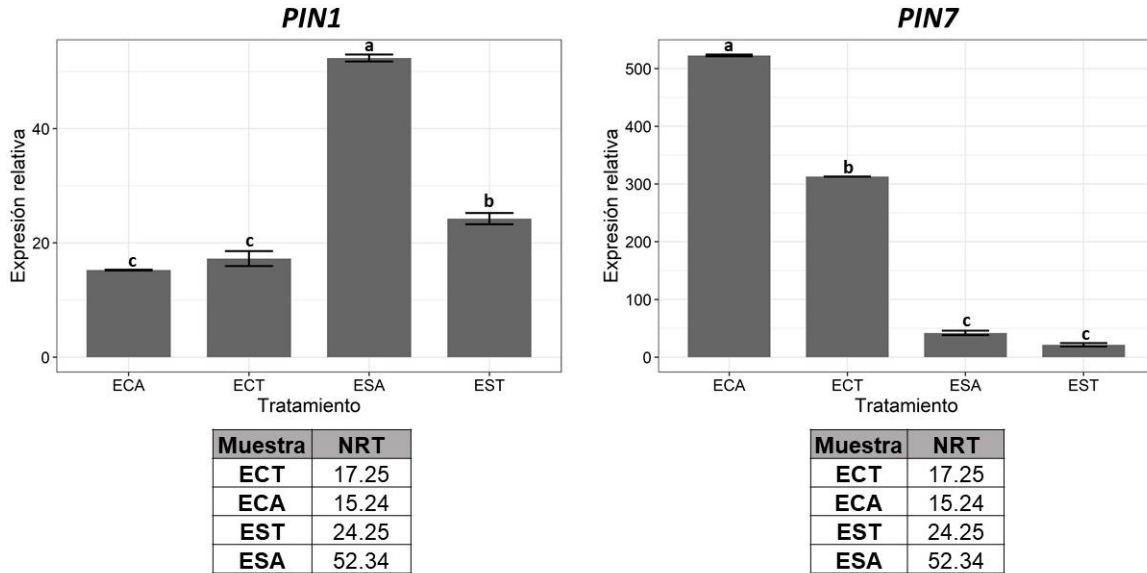


Figura 3.7 Cuantificación relativa de transcritos de *PIN1* y *PIN7* en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* en estadios tempranos y avanzados. (Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores promedio representados. n = 4; p <0.05)

DISCUSIÓN

Los estudios de cuantificación relativa de genes requieren de la selección de un gen de referencia cuya expresión sea estable en las condiciones experimentales establecidas. Los genes comúnmente utilizados como genes de referencia son los genes de expresión constitutiva (housekeeping), cuya expresión no está influenciada por el ambiente. Entre estos genes destacan *ACT*, α -*TUB*, β -*TUB*, *GAPDH*, *UBI*, 18S rRNA como los más frecuentemente estudiados (Li *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha demostrado que estos genes se expresan de forma variable en diferentes tejidos de una misma planta o en respuesta a diferentes tratamientos, por lo que es recomendable realizar una validación sistemática específica para cada conjunto de factores a analizar (Gutiérrez *et al.*, 2008).

En el género *Capsicum*, específicamente en la especie *Capsicum annuum*, se ha analizado la estabilidad de expresión de genes candidatos bajo diferentes condiciones (Wan *et al.*, 2011; Bin *et al.*, 2012); sin embargo, no se han realizado estudios de este tipo en la especie *Capsicum chinense*. En este trabajo, las tres herramientas de análisis empleadas señalan que *UBI3* es el gen con la expresión más estable en tejidos de embrión somático, también con valores estadísticos dentro del rango considerado estable en embrión cigótico. Estos resultados coinciden con los reportados por Wan *et al.* (2011), que señalan que *UBI3* fue el gen más estable entre los grupos de muestras analizados (diferentes estreses abióticos, tratamientos hormonales y diferentes tejidos), presentando valores mínimos de los parámetros estadísticos de Genorm y NormFinder en tejidos sometidos a tratamientos hormonales. En contraste, en ese estudio también se destaca *GAPDH* como gen de expresión estable, mientras que en este caso resultó ser el menos estable en todas las muestras evaluadas. Esto se corresponde con los resultados de Bin *et al.* (2012), donde se encontró que el gen *GAPDH* fue el menos estable dentro de un grupo de 10 genes evaluados en muestras de *C. annuum* de diferentes tejidos, sometidas a tratamientos hormonales o bajo estrés abiótico. Estos autores también señalan que existen diferencias en cuanto a la determinación del gen más estable entre los diferentes programas empleados, como las que se observaron en este estudio en tejidos de embrión cigótico.

Según lo planteado por García *et al.* (2019) los estadíos de la embriogénesis cigótica y somática son comparables en una misma especie, ya que los embriones transitan por las mismas etapas durante la diferenciación hasta su conversión en planta, por lo que es válido

comparar su comportamiento a nivel molecular. Los estudios transcriptómicos recientes indican que la regulación de la embriogénesis cigótica y somática es bastante diferente en algunas especies, con un patrón de expresión en embriones somáticos muy similar al que se observa en semillas en maduración (Hofmann *et al.*, 2019). Se conoce que ambos tipos de embriogénesis se regulan epigenéticamente, por lo que el patrón de metilación del ADN es determinante para el correcto desarrollo del embrión. El 2,4-D es el regulador de crecimiento más utilizado para la inducción de embriogénesis somática, sin embargo, muchos estudios relacionan su uso con el desarrollo anormal de embriones somáticos (Hashemloian *et al.*, 2008; Vila *et al.*, 2010; García *et al.*, 2019). Estas anomalías están asociadas con desórdenes fisiológicos y/o variaciones somaclonales, donde las mutaciones y los cambios epigenéticos influyen en la formación y maduración de las estructuras embrionarias. Se ha comprobado que esta auxina sintética constituye un estímulo inductor de enzimas remodeladoras de la cromatina que generan cambios de metilación, los cuales favorecen la expresión de factores de transcripción involucrados en la inducción de ES como son *BBM* y *LEC* (Karim *et al.*, 2018; Pasternak *et al.*, 2019). Diversos estudios plantean que en algunas especies como *Arabidopsis thaliana*, estos genes pertenecen a una misma red transcripcional, regulando la expresión de genes codificadores de enzimas de síntesis de auxinas y otras fitohormonas clave para la inducción de la embriogénesis somática (Jha y Kumar, 2018). Sin embargo, el tiempo de exposición al 2,4-D y la subsecuente acumulación de este en estadios globulares, interrumpe el transporte polar de auxinas e interfiere en el establecimiento del gradiente endógeno que se debe formar para dar lugar a la polarización de estas estructuras y la adquisición de su simetría bilateral (Venkatesh *et al.*, 2009; Landey *et al.*, 2015). Por estas razones y teniendo en cuenta las anomalías observadas en el desarrollo de embriones somáticos de *Capsicum chinense* en este trabajo se decidió analizar los patrones de expresión de los genes *BBM* y *LEC* dada su posible implicación en la deformación de los embriones somáticos que limita la conversión en plantas.

Los factores de transcripción *BBM* y *LEC* son considerados marcadores de la embriogénesis somática (Gaj *et al.*, 2005; Nowak *et al.*, 2016) y su expresión ectópica es capaz de inducir procesos de desdiferenciación celular que llevan a la formación de embriones incluso en tejidos de especies recalcitrantes (Florez *et al.*, 2015). Muchos autores han demostrado la presencia de transcritos de estos genes en tejidos embriogénicos, mientras que su expresión en tejidos no embriogénicos es nula (Boutilier *et al.*, 2002; Malik *et al.*, 2007; Alemanno *et al.*, 2008). Estos genes fueron identificados por

primera vez en el género *Capsicum* en embriones somáticos obtenidos a partir de cultivo de anteras de *Capsicum annuum* (Irikova *et al.*, 2012). Como resultado de los análisis de expresión en ese trabajo se observó una acumulación significativa de transcritos de estos genes en todos los estadíos de la embriogénesis, así como no se detectó su expresión en bolsillos de anteras ni en tejidos maduros de la planta. Hasta el momento no se ha analizado la expresión de estos genes en embriones de la especie *Capsicum chinense* Jacq.

En el presente estudio se observó que los niveles de transcritos del gen *BBM* fueron significativamente mayores en embrión cigótico en estadíos tempranos, lo cual puede deberse a que este gen desempeña un rol fundamental en el proceso de proliferación celular, por lo que se expresa preferencialmente en tejidos jóvenes en activa división (Jha y Kumar, 2018). Muchos estudios han demostrado que la expresión de este factor de transcripción está regulada por un mecanismo epigenético, en el cual las auxinas desempeñan un rol fundamental como activadores de enzimas modificadoras de la cromatina (Karim *et al.*, 2018; Kumar y Van Staden *et al.*, 2017; Heidmann *et al.*, 2015). Este hecho puede explicar la disminución en el nivel de expresión de este gen en el tejido de embrión cigótico avanzado con respecto al temprano, ya que se conoce que durante el desarrollo del embrión cigótico ocurre una acumulación paulatina de auxinas en estadíos tempranos, la cual se redistribuye y va disminuyendo a medida que avanza el desarrollo del embrión (Pérez-Pastrana, 2019).

En las muestras de embrión somático en estadíos tempranos la cuantificación de transcritos del gen *BBM* resultó ser muy baja, con un aumento poco significativo en estadíos avanzados, evidenciándose un patrón de expresión opuesto al que se observó en embriones cigóticos. Rupps *et al.* (2016) reportó un aumento en la expresión de este gen al analizar la acumulación de transcritos en embriones somáticos en diferentes estadíos de la especie dicotiledónea *Larix decidua*. Sin embargo, en ese estudio no se observó el mismo comportamiento en el patrón de expresión en embriones cigóticos. En cambio, varios estudios reportan altos niveles de expresión de *BBM* en estadíos tempranos de la embriogénesis somática (Wang *et al.*, 2010; Kulinska-Lukaszek *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). *BBM* se expresa preferencialmente en presencia de estímulos generadores estrés, activando vías de transducción de señales que permiten la inducción de células somáticas diferenciadas y la formación de embriones somáticos (Boutilier *et al.*, 2002). Esta baja expresión del gen en embriones somáticos de *C. chinense* puede estar relacionada con la

baja eficiencia en el protocolo que reporta Avilés-Viñas *et al.* (2013) al suprimir el 2,4-D del medio de cultivo, ya que en ausencia de este estímulo la expresión del gen puede ser muy poca o nula.

En cuanto a la cuantificación de transcritos del gen *LEC* se observó una menor acumulación de estos en estadios tempranos de embriones cigóticos que aumentó significativamente en estadios avanzados. Estudios previos han confirmado que, aunque los transcritos de este gen son detectables en estadios tempranos de la morfogénesis cigótica, estos tienden a acumularse hacia la fase de maduración de los embriones (Braybrook y Harada, 2008).

En los análisis de expresión llevados a cabo en embriones somáticos de especies como *Arabidopsis thaliana* (Ledwon y Gaj, 2011) y *Mussa* (Shivani *et al.*, 2017) la expresión de *LEC* aumenta a medida que avanza el desarrollo del embrión. Sin embargo, se observó un patrón de expresión opuesto en embriones somáticos, donde la acumulación de transcritos de este gen fue significativamente mayor en estadios tempranos. La expresión de los FT de la familia *LEAFY COTHYLEDON* provoca un aumento en los niveles de auxina endógena ya que actúan como activadores de los genes *YUCCA*, que codifican para enzimas encargadas de la síntesis de esta fitohormona. Consecuentemente, aumenta la expresión de genes como *WUSCHEL*, *SERK*, *CLF* y *SHOOT MERISTEM*, implicados en los cambios fisiológicos propios del desarrollo normal de los embriones (Elhiti *et al.*, 2013). Por tanto, este patrón inusual de expresión puede estar relacionado con las anomalías en el desarrollo que presentan los embriones de *Capsicum chinense* ya que se ha comprobado que, en plantas mutadas en este gen, se observan defectos en la morfología de los cotiledones y problemas en la maduración (Guo *et al.*, 2013). Esto a su vez puede explicar la afectación en la síntesis de auxina endógena reportada para embriones somáticos de *Capsicum chinense* por Pérez-Pastrana (2019).

En embriones cigóticos, una vez que se induce la síntesis de auxina endógena a través de la expresión de los genes *YUC*, comienzan a expresarse genes que codifican para transportadores de auxinas, como son los genes de la familia *PIN FORMED* (Fehér, 2019). *PIN1* y *PIN7* actúan directamente en el establecimiento de un transporte apical basal de Ax en estadios tempranos de la embriogénesis. Aunque su expresión y localización juegan un rol fundamental en el correcto desarrollo de los embriones, estudios con mutantes de estos genes en *Arabidopsis* muestran que se presentan algunas anomalías en la formación de estas estructuras, que se revierten a medida que avanza el desarrollo. Esto se le atribuye

a la redundancia funcional que presentan los genes *PIN* (Friml *et al.*, 2003; Palovaara and Hakman, 2009).

En el presente trabajo no se detectaron diferencias significativas entre los niveles de transcritos de *PIN1* en embriones cigóticos en estadio temprano y avanzado, con una acumulación levemente mayor en estadios tempranos. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que en este estudio se tomaron como estadios tempranos y avanzados semillas de frutos verdes y maduros respectivamente, ya que, según Hofmann *et al.* (2019), el programa morfogénico de estos es más similar al de los embriones somáticos. Sin embargo, no se estudiaron estadios previos de formación del embrión cigótico en los que se reporta la mayor acumulación de transcritos de este gen. Por otra parte, los niveles de transcritos en ambos estadios de embriones somáticos fueron significativamente diferentes, observándose la máxima expresión en estadios avanzados. La mayor acumulación de transcritos de *PIN7* se observó en embriones cigóticos en estadio avanzado, presentando diferencias significativas con lo registrado en estadios tempranos. En embriones somáticos se observó el mismo patrón de expresión, sin embargo, la cuantificación de transcritos fue significativamente menor en comparación con los embriones cigóticos. Este patrón de expresión coincide con el reportado por Regla-Márquez *et al.* (2019) al analizar la acumulación de transcritos de *PIN1* y *PIN7* en embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense* Jacq. Las diferencias al comparar los niveles de transcritos cuantificados en ese trabajo con los que se reportan en el presente estudio, pueden deberse a las modificaciones realizadas en los tiempos de recolección de los embriones y a la mayor exposición de estos al regulador de crecimiento presente en el medio. La morfología de embriones somáticos y cigóticos ha sido asociada con la expresión de los genes *PIN* regulada por la metilación del DNA (Xiao 2006; Fraga *et al.*, 2016). En la embriogénesis cigótica, el estudio de Xiao (2006) demostró que el patrón de metilación del DNA está relacionado con la expresión de *PIN1* en *Arabidopsis*, la cual es necesaria para el establecimiento del transporte de auxinas en el embrión. En contraste, para la inducción de la ES, los niveles de metilación están afectados por la presencia del regulador de crecimiento en el medio de cultivo. En consecuencia, disminuye la transcripción de los genes *PIN* y se afecta el transporte polar de auxinas, impidiendo que la morfogénesis se desarrolle normalmente (Friml, 2003).

3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

Los patrones de expresión de los genes *BBM*, *LEC*, *PIN1* y *PIN7* en embriones somáticos en estadios tempranos y avanzados son opuestos a los que se observaron en embriones cigóticos de *C. chinense*, lo cual indica que la regulación de la síntesis de auxinas durante la embriogénesis somática, así como el transporte polar de esta fitohormona se encuentran afectados, interfiriendo con los procesos de división celular, maduración y diferenciación de estas estructuras e impidiendo su conversión en plantas.

3.2 PERSPECTIVAS

- Los resultados de este trabajo contribuyen al entendimiento del proceso de embriogénesis somática de *C. chinense* a nivel molecular y servirán de base a investigaciones encaminadas a resolver el problema de la recalcitrancia en esta especie por métodos biotecnológicos.
- Resulta fundamental realizar la secuenciación de los genes estudiados ya que es la primera vez que se identifican en la especie *C. chinense*.
- Es importante estudiar la expresión de estos genes bajo diferentes condiciones experimentales, especialmente variando las concentraciones y el tipo de regulador de crecimiento utilizado para los procesos de inducción e histodiferenciación de la embriogénesis somática.
- Sería interesante realizar un estudio a nivel epigenético para conocer el efecto del tratamiento utilizado en el protocolo de embriogénesis sobre los niveles de metilación del ADN, lo cual pudiera arrojar datos valiosos para comprender como las condiciones de cultivo y reguladores de crecimiento pueden afectar la expresión génica durante el proceso.
- Resulta de especial interés estudiar la expresión de otros genes implicados en la red transcripcional que regula la síntesis de auxinas y su transporte, entre estos se encuentran:

- ✓ El factor de transcripción *AGL15*
- ✓ Genes codificadores de enzimas de síntesis de auxinas como *IAA30* y los genes de la familia *YUC*
- ✓ Genes codificadores de enzimas remodeladoras de la cromatina como son *PKL* y *PRC* involucradas en la activación de esta red transcripcional

BIBLIOGRAFIA

- Adamowski, M., & Friml, J. (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The Plant Cell*, 27(1), 20-32.
- Antonio, A. S., Wiedemann, L. S. M., & Junior, V. V. (2018). The genus *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC advances*, 8(45), 25767-25784.
- Alemanno, L., Devic, M., Niemenak, N., Sanier, C., Guilleminot, J., Rio, M., ... & Montoro, P. (2008). Characterization of leafy cotyledon1-like during embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Planta*, 227(4), 853-866.
- Avilés-Viñas, S. A., Lecona-Guzmán, C. A., Canto-Flick, A., López-Erosa, S., & Santana-Buzzy, N. (2013). Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium. *Plant biotechnology reports*, 7(3), 277-286.
- Berny-Mier, J. C., Abdala-Roberts, L., Duran-Yanez, A., & Tut-Pech, F. (2013). Variation in insect pest and virus resistance among Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) in Yucatan, Mexico. *Agrociencia*, 47(5), 471-482.
- Bin, W. S., Wei, L. K., Ping, D. W., Li, Z., Wei, G., Bing, L. J., ... & Feng, C. J. (2012). Evaluation of appropriate reference genes for gene expression studies in pepper by quantitative real-time PCR. *Molecular breeding*, 30(3), 1393-1400.
- Blum, A. (2018). *Plant breeding for stress environments*. CRC press.
- Boutillier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., ... & Custers, J. B. (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737-1749.
- Braybrook, S. A., & Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in plant science*, 13(12), 624-630.
- Busch, W., Miotk, A., Ariel, F. D., Zhao, Z., Forner, J., Daum, G., ... & Haubeiß, S. (2010). Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Developmental cell*, 18(5), 841-853.
- Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Bello-Bello, J. J., Lecona-Guzmán, C., Solís-Marroquín, D., Avilés-Viñas, S., ... & Iglesias-Andreu, L. G. (2008). Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. *HortScience*, 43(5), 1344-1349.

- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Reagent for the single step simultaneous isolation of RNA. *Anal Biochem*, 162, 536-7.
- Clemens, S., & Ma, J. F. (2016). Toxic heavy metal and metalloids accumulation in crop plants and foods. *Annual review of plant biology*, 67, 489-512.
- do Rêgo, E. R., & do Rêgo, M. M. (2016). Genetics and Breeding of Chili Pepper *Capsicum* spp. In *Production and breeding of chilli peppers (Capsicum spp.)* (pp. 57-80). Springer, Cham.
- Elhiti, M., Stasolla, C., & Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(6), 631-642.
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: what these terms mean in the era of molecular plant biology?. *Frontiers in plant science*, 10, 536.
- Florez, S. L., Erwin, R. L., Maximova, S. N., Guiltinan, M. J., & Curtis, W. R. (2015). Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC plant biology*, 15(1), 121.
- Fraga, H. P., Vieira, L. N., Caprestano, C. A., Steinmacher, D. A., Micke, G. A., Spudeit, D. A., ... & Guerra, M. P. (2012). 5-Azacytidine combined with 2, 4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant cell reports*, 31(12), 2165-2176.
- Fraga, H. P., Vieira, L. N., Heringer, A. S., Puttkammer, C. C., Silveira, V., & Guerra, M. P. (2016). DNA methylation and proteome profiles of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze embryogenic cultures as affected by plant growth regulators supplementation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(2), 353-374.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., ... & Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6963), 147-153.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43(1), 27-47.
- Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., & Lemaux, P. G. (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222(6), 977-988.

- Garcia, C., de Almeida, A. A. F., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S., & Marelli, J. P. (2019). Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 193-212.
- Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K. C., Putterill, J., ... & Chory, J. (2001). BIG: a calossin-like protein required for polar auxin transport in Arabidopsis. *Genes & Development*, 15(15), 1985-1997.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., & Van Wuytswinkel, O. (2008). Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7), 1734-1735.
- Guo, F., Liu, C., Xia, H., Bi, Y., Zhao, C., Zhao, S., ... & Wang, X. (2013). Induced expression of AtLEC1 and AtLEC2 differentially promotes somatic embryogenesis in transgenic tobacco plants. *PLoS One*, 8(8).
- Harini, I., & Sita, G. L. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89(1), 107-112.
- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). Wild pepper *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1-11.
- Heidmann, I. A. (2015). *Applied and fundamental aspects of BABY BOOM-mediated regeneration* (Doctoral dissertation, Wageningen University).
- Hofmann, F., Schon, M. A., & Nodine, M. D. (2019). The embryonic transcriptome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant reproduction*, 32(1), 77-91.
- Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4(4), 201-216.
- Hulse-Kemp, A. M., Ashrafi, H., Plieske, J., Lemm, J., Stoffel, K., Hill, T., ... & Van Deynze, A. (2016). A HapMap leads to a *Capsicum annuum* SNP Infinium array: a new tool for pepper breeding. *Horticulture research*, 3(1), 1-10.
- Irikova, T., Grozeva, S., & Denev, I. (2012). Identification of BABY BOOM and LEAFY COTYLEDON genes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genome by their partial gene sequences. *Plant growth regulation*, 67(2), 191-198.
- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2-3), 91-110.
- Jha, P., & Kumar, V. (2018). BABY BOOM (BBM): a candidate transcription

- Karim, R., Tan, Y. S., Singh, P., Khalid, N., & Harikrishna, J. A. (2018). Expression and DNA methylation of SERK, BBM, LEC2 and WUS genes in in vitro cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(5), 741-751.
- factor gene in plant biotechnology. *Biotechnology letters*, 40(11-12), 1467-1475.
- Karami, O., Aghavaisi, B., & Pour, A. M. (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of chemical biology*, 2(4), 177-190.
- Kaparakis, G., & Alderson, P. G. (2008). Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)?. *Journal of plant growth regulation*, 27(2), 110-114.
- Kantar, M. B., Anderson, J. E., Lucht, S. A., Mercer, K., Bernau, V., Case, K. A., ... & Hastings, J. C. (2016). Vitamin variation in *Capsicum* Spp. provides opportunities to improve nutritional value of human diets. *PLoS One*, 11(8), e0161464.
- Kim, J. S., An, C. G., Park, J. S., Lim, Y. P., & Kim, S. (2016). Carotenoid profiling from 27 types of paprika (*Capsicum annuum* L.) with different colors, shapes, and cultivation methods. *Food chemistry*, 201, 64-71.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., & Lymperopoulos, C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant cell, tissue and organ culture*, 67(1), 55-62.
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology advances*, 28(1), 35-48.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J., & Zažímalová, E. (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome biology*, 10(12), 249.
- Kulinska-Lukaszek, K., Tobojka, M., Adamiok, A., & Kurczynska, E. U. (2012). Expression of the BBM gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia plantarum*, 56(2), 389-394.
- Landey, R. B., Cenci, A., Guyot, R., Bertrand, B., Georget, F., Dechamp, E., ... & Etienne, H. (2015). Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 517-531.
- Latournerie, L., Chávez, J. L., Pérez, M., Castañón, G., Rodríguez, S. A., Arias, L. M., & Ramírez, P. (2002). Valoración in situ de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(1), 25-33.

- Ledwoń, A., & Gaj, M. D. (2011). LEAFY COTYLEDON1, FUSCA3 expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, 65(1), 157-167.
- Lecona-Guzmán, C. A., Solís-Marroquín, D., Aviles-Viñas, S., De los Santos-Briones, C., & Santana-Buzzy, N. (2012). Changes in the protein profile of Habanero pepper (*Capsicum chinense* J.) somatic embryos during development. *African Journal of Biotechnology*, 11(47), 10761-10768.
- Li, M. Y., Wang, F., Jiang, Q., Wang, G. L., Tian, C., & Xiong, A. S. (2016). Validation and comparison of reference genes for qPCR normalization of celery (*Apium graveolens*) at different development stages. *Frontiers in plant science*, 7, 313.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140(5), 943-950.
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis. An overview. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 1-8). Springer, Cham.
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Montalvo-Peniche, M. D. C., Barahona-Pérez, F., ... & 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.
- Malik, M. (2008). Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. *Plant cell, tissue and organ culture*, 94(3), 337-345.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J. & Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in plant science*, 10, 77.
- Mestre Moreno, L., Moreno Sánchez, M. A., Fayos Avellán, O., Mignard, P., Mallor Giménez, C., & Garcés Claver, A. (2017). Evaluación de compuestos antioxidantes en especies del género *Capsicum*. Associação Portuguesa de Horticultura (APH).
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

- Nowak, K., & Gaj, M. D. (2016). Transcription factors in the regulation of somatic embryogenesis. In *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications* (pp. 53-79). Springer, Cham.
- Ouakfaoui, S., Schnell, J., Abdeen, A., Colville, A., Labbé, H., Han, S., ... & Miki, B. (2010). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant molecular biology*, *74*(4-5), 313-326
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M. K., Bell, C. J., & Shimura, Y. (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of Arabidopsis floral bud formation. *The Plant Cell*, *3*(7), 677-684..
- Panguluri, S. K., & Kumar, A. A. (2016). *Phenotyping for Plant Breeding*. Springer-Verlag New York.
- Roy, A. (2016). Bhut Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq): a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, *7*(3), 882-89.
- Palovaara, J., Hallberg, H., Stasolla, C., Luit, B., & Hakman, I. (2010). Expression of a gymnosperm PIN homologous gene correlates with auxin immunolocalization pattern at cotyledon formation and in demarcation of the procambium during *Picea abies* somatic embryo development and in seedling tissues. *Tree physiology*, *30*(4), 479-489.
- Pasternak, T., Potters, G., Caubergs, R., & Jansen, M. A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany*, *56*(418), 1991-2001.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, *26*(6), 509-515.
- Phillips, G. C. (2004). In vitro morphogenesis in plants-recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *40*(4), 342-345.
- Quinga, L. A. P., Heringer, A. S., de Freitas Fraga, H. P., do Nascimento Vieira, L., Silveira, V., Steinmacher, D. A., & Guerra, M. P. (2018). Insights into the conversion potential of *Theobroma cacao* L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis. *Scientia Horticulturae*, *229*, 65-76.
- Regla-Márquez, C. F., Canto-Flick, A., Avilés-Viñas, S. A., Valle-Gough, R. E., Pérez-Pastrana, J., García-Villalobos, F. J., & Santana-Buzzy, N. (2016). Cadaverine: a

- common polyamine in zygotic embryos and somatic embryos of the species *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 124(2), 253-264.
- Regla-Márquez, C. F., Avilés-Viñas, S. A., Canto-Flick, A., Muñoz-Ramírez, L. S., Peña-Yam, L. P., Valle-Gough, R. E., ... & Santana-Buzzy, N. (2019). Genes involved in the deformations of the shoot apical meristem in somatic embryos of *Capsicum chinense* Jacq. *Journal of genetics*, 98(3), 70.
- Rupps, A., Raschke, J., Rümmler, M., Linke, B., & Zoglauer, K. (2016). Identification of putative homologs of *Larix decidua* to Babyboom (BBM), leafy cotyledon1 (LEC1), Wuschel-related Homeobox2 (WOX2) and somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta*, 243(2), 473-488.
- Salvo, S. A., Hirsch, C. N., Buell, C. R., Kaeppler, S. M., & Kaeppler, H. F. (2014). Whole transcriptome profiling of maize during early somatic embryogenesis reveals altered expression of stress factors and embryogenesis-related genes. *PLoS One*, 9(10).
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., & Gil, M. A. (2016). 'Mayan Kisin', a High-yielding, Red-fruited, Habanero-type Hot Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Cultivar. *HortScience*, 51(5), 604-605.
- Shivani, P. A., Sharma, V., Kaur, N., Kaur, N., Pandey, P., & Tiwari, S. (2017). Genome-wide analysis of transcription factors during somatic embryogenesis in banana (*Musa* spp.) cv. Grand Naine. *PloS one*, 12(8).
- Sosa-Moguel, O., Pino, J. A., Ayora-Talavera, G., Sauri-Duch, E., & Cuevas-Glory, L. (2017). Biological activities of volatile extracts from two varieties of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *International journal of food properties*, 20(sup3), S3042-S3051.
- Steinitz, C., Arias, H., Bassett, S., Flaxman, M., Goode, T., Maddock, T., ... & Shearer, A. (2003). *Alternative futures for changing landscapes: the upper San Pedro River Basin in Arizona and Sonora*. Island press.
- Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D., & Zhang, X. S. (2009). Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59(3), 448-460.
- Tamiru, A., Khan, Z. R., & Bruce, T. J. (2015). New directions for improving crop resistance to insects by breeding for egg induced defence. *Current Opinion in Insect Science*, 9, 51-55.

- Thomas, C., & Jiménez, V. M. (2005). Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects. In *Somatic Embryogenesis* (pp. 157-175). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tun Dzul, J. (2001). Chile Habanero. Características y Tecnología de Producción. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Centro de Investigación Regional del Sureste. *Mochocá, Yucatán, México*.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034-1.
- Vallejo Cabrera, F. A., & Estrada Salazar, E. I. (2002). *Mejoramiento genético de plantas*. Universidad Nacional de Colombia.
- Valle-Gough, R. E., Avilés-Viñas, S. A., López-Erosa, S., Canto-Flick, A., Gómez-Uc, E., Sáenz-Carbonell, L. A., ... & Santana-Buzzy, N. (2015). Polyamines and WOX genes in the recalcitrance to plant conversion of somatic embryos of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *African Journal of Biotechnology*, 14(7), 569-581.
- Venkatesh, K., Roja Rani, A., Baburao, N., & Padmaja, G. (2009). Effect of auxins and auxin polar transport inhibitor (TIBA) on somatic embryogenesis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Afr J Plant Sci*, 3(12), 288-293.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 69(3), 233-249.
- Vondráková, Z., Eliášová, K., Fischerová, L., & Vágner, M. (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 6(4), 587-596.
- Wan, H., Yuan, W., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Li, Z., ... & Yang, Y. (2011). Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochemical and biophysical research communications*, 416(1-2), 24-30.
- Wang, G., Wang, H., Zhu, J., Zhang, J., Zhang, X., Wang, F., ... & Song, R. (2010). An expression analysis of 57 transcription factors derived from ESTs of developing seeds in maize (*Zea mays*). *Plant cell reports*, 29(6), 545-559.

- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of natural products*, 76(4), 783-793.
- Wędzony, M., Szechyńska-Hebda, M., Żur, I., Dubas, E., & Krzewska, M. (2014). Tissue culture and regeneration: a prerequisite for alien gene transfer. In *Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume 1* (pp. 43-75). Springer, New York, NY.
- Winkelmann, T. (2016). Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* (pp. 25-46). Humana Press, New York, NY.
- Xiao-Ping, S., & Xi-Gui, S. (2006). Cytokinin-and auxin-induced stomatal opening is related to the change of nitric oxide levels in guard cells in broad bean. *Physiologia Plantarum*, 128(3), 569-579.
- identification, molecular evolution, and expression analysis provide new insights into the APETALA2/ethylene responsive factor (AP2/ERF) superfamily in *Dimocarpus longan* Lour. *BMC genomics*, 21(1), 1-20.
- Zapata-Castillo, P. Y., 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.
- Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R., & Arnholdt-Schmitt, B. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 12-13.
- Zhang, S., Zhu, C., Lyu, Y., Chen, Y., Zhang, Z., Lai, Z., & Lin, Y. (2020). Genome-wide identification, molecular evolution, and expression analysis provide new insights into the APETALA2/ethylene responsive factor (AP2/ERF) superfamily in *Dimocarpus longan* Lour. *BMC genomics*, 21(1), 1-20.