



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE
EMBRIOGÉNESIS A PARTIR DE ANTERAS Y
MICROSPORAS DE *Capsicum chinense* Jacq.

Tesis que presenta

GEMA PIJEIRA FERNÁNDEZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Mérida, Yucatán, México

2024

*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 **Establecimiento de un sistema de embriogénesis a partir de anteras y microsporas de *Capsicum chinense* Jacq**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de Biología Celular y del Desarrollo, en el laboratorio 9 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y la codirección de la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Opción Bioquímica y Biología Molecular de este Centro.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández-Stefanoni

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 28 de noviembre de 2024

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: _____



Gema Pijeira Fernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto de Ciencia de Frontera de CONAHCYT titulado “Androgénesis: Una novedosa alternativa no convencional para abordar la recalcitrancia a la regeneración *in vitro* y el mejoramiento genético de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)” en el que participaste bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y la codirección de la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es fruto de muchas manos, corazones y mentes. A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

Agradecimientos especiales:

Agradezco a CONAHCYT por la beca de doctorado No.776462 que me permitió realizar este proyecto y al CICY, por brindarme sus instalaciones y recursos para llevar a cabo mi investigación.

A mis queridas asesoras de tesis:

La Dra. Nancy Santana Buzzy, por confiar en mí desde el primer momento, por abrirme las puertas de su laboratorio, de su casa y de su corazón enorme. Su confianza y apoyo han sido fundamentales en este recorrido. Gracias por tanto Ñuñú, lo logramos.

A la Dra. Daysi Pérez Brito, por cada sabio consejo que me ha brindado y por ser para mí un ejemplo de fortaleza, resiliencia y excelencia profesional. Gracias por recibirme siempre con los brazos abiertos en su laboratorio y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A mis compañeros de trabajo, tanto del Laboratorio 9, como del Laboratorio Gambio, quienes siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y compartir momentos de aprendizaje y crecimiento. Agradezco especialmente a la maestra Adriana Canto, a los ingenieros Adolfo Guzmán y Alberto Cortés, y a la Dra. Ángela Ku, siempre presentes y dispuestos a ayudar.

Un agradecimiento muy especial al Doctor y amigo Anuar Magaña Álvarez, por su amistad incondicional y por su constante compromiso con mi crecimiento profesional. Mijito, eres un ser humano excepcional, gracias infinitas por tantísimos motivos y por llevarme de la mano hacia el cumplimiento de cada objetivo.

A mis amistades de toda la vida, aquellas que me persiguen desde Cuba y han sido mi ancla en los momentos de nostalgia, y a las nuevas amistades, que parecieran haber nacido junto conmigo en esta etapa. Patricia, Isabel, Julio, Wendy, Susi, Adriana, gracias por llenar mi vida de cariño, risas y fortaleza.

AGRADECIMIENTOS

A mis alumnos, a todos los que han sido parte de esta aventura desde el día que comencé a enseñar. Ustedes son inspiración, cada día que siento que ya no puedo más, me paro frente a ustedes y me recuerdan por qué amo lo que hago. Con cada clase, ustedes me reinician la vida, y les debo mucho más de lo que puedo expresar. Gracias por todo.

A mi familia:

A mi compañero de vida, mi Fer, por acompañarme con amor y paciencia en cada paso de este camino y por recordarme siempre que somos un equipo y nos escogemos cada día por encima de todo. Gracias por tu apoyo incondicional, por darme una familia mexicana que también está orgullosa de mi. Este logro también es tuyo.

A los dos amores de mi vida, mis padres:

A mi papá, porque desde el primer día que tuve conciencia quise ser como él. Por su forma tan única de ganarle a las tempestades de la vida, ansío haber heredado su fuerza e inteligencia para ganarle a todo lo que se presente. El relevo está listo Pijeira, seguiremos haciendo historia.

A mi mamá, la constructora de todo lo que soy hoy en día, la que nunca se equivocó en educarme, quien me dio todas las herramientas y de quien fui su mayor proyecto de vida. Porque nunca me cansaré de decirle al mundo que en cada cualidad y cada logro estás tú. Gracias Marta Fernández, por hacerme todo terreno.

DEDICATORIAS

A mis padres Marta y Pijeira, porque no hay pasos en mi camino donde no esté también su huella

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I.....	5
ANTECEDENTES	5
1.1. <i>CAPSICUM CHINENSE</i> COMO ESPECIE REPRESENTATIVA DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i> ..	5
1.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	6
1.3. PARTICULARIDADES DE LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i>	8
1.4. FITOMEJORAMIENTO EN EL GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	9
1.5. CTV COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO EN PLANTAS.....	11
1.6. ESTUDIOS SOBRE LA RECALCITRANCIA A LA REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> EN LA ESPECIE <i>C. CHINENSE</i> JACQ.	13
1.6.1 Estudios genéticos en embriones somáticos de la especie <i>C. chinense</i>	15
1.6.2 Factores fisiológicos determinantes de la respuesta embriogénica en <i>C. chinense</i>	19
1.7. EL CULTIVO DE ANTERAS Y MICROSPORAS COMO RUTA ALTERNATIVA PARA EL ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS EN <i>CAPSICUM</i>	21
1.8. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA ANDROGÉNICA	23
1.8.1. Planta madre	23
1.8.2. Condiciones de cultivo	24
1.8.3. Estadío de desarrollo de la microspora.....	25
REFERENCIAS.....	26

JUSTIFICACIÓN.....	26
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
CAPÍTULO II	38
ESTABLECIMIENTO Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DONANTE PARA EL CULTIVO DE ANTERAS Y MICROSPORAS DE <i>C. chinense</i>	38
2.1 INTRODUCCIÓN.....	38
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.2.1. Establecimiento del material vegetal en condiciones de invernadero.....	39
2.2.2 Establecimiento del protocolo de desinfección	39
2.2.3 Análisis estadístico.....	41
2.3. RESULTADOS.....	41
2.3.1. Establecimiento del material vegetal en condiciones de invernadero.....	41
2.3.2 Establecimiento de un protocolo de desinfección para los botones florales	43
2.4. DISCUSIÓN.....	44
2.5. REFERENCIAS	46
CAPÍTULO III	49

Induction of androgenesis in isolated microspore cultures of habanero pepper (Capsicum chinense Jacq.)	49
ABSTRACT	49
INTRODUCTION	50
MATERIALS AND METHODS	51
Donor plant material	51
Morphological markers of flower buds and anthers	52
Determination of the microspore developmental stage	52
Microspore isolation and viability test	52
Culture conditions	53
Microscopy monitoring	53
Statistical analysis	53
RESULTS	54
Morphological markers related to the specific microspore developmental stages	54
TABLE 1: RELATION BETWEEN FLORAL BUD AND ANTHOR MORPHOLOGICAL MARKERS AND MICROSPORE DEVELOPMENTAL STAGES.	57
Assessment of microspore viability after anther sonication	55
Monitoring the androgenic response in microspore cultures	58
Effect of different treatments with PGRs on embryogenesis induction in isolated microspore cultures	60
NAA: NAPHTHALENEACETIC ACID; 2,4-D: 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID; KIN: KINETIN; RM: RESPONSIVE MICROSPORES; ELS: EMBRYO-LIKE STRUCTURES	61
Regeneration results	61

DISCUSSION	62
REFERENCES	64
CAPÍTULO IV.....	67
First report of embryogenesis induction in <i>in vitro</i> cultured anther and ovary tissues of habanero pepper (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	67
ABSTRACT	67
INTRODUCTION	68
MATERIALS AND METHODS	70
Plant material.....	70
Treatments with PGR and culture conditions.....	70
Culture procedures for embryogenesis induction	71
Temperature treatment	72
Culture monitoring and sample collection.....	72
Gene expression analysis	72
Statistical analysis	74
RESULTS	75
Characterization of the morphogenic response in anther cultures	75
Differential embryo and callus production	77
Effect of heat shock treatment in embryo production	79
Ovule-derived embryo formation in anther-ovary cocultures	79
Somatic embryo obtention	81
Expression of <i>BBM</i> and <i>LEC</i> TFs in morphogenic structures	82
REFERENCES	88

CAPÍTULO V.....	92
DISCUSIÓN GENERAL	92
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	94
CONCLUSIONES	94
PERSPECTIVAS	95

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1. 1:** Datos de producción de chile habanero en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo según datos de SIAP, 2021. Imagen tomada de: Campeche lidera producción de chile habanero en la Península de Yucatán -Fuente: PorEsto..... 6
- Figura 1. 2:** Estructuras reproductivas que conforman el botón floral de la especie *C. chinense*. A) Botón floral en etapa de desarrollo temprano donde se señalan los órganos y células que lo conforman. B) Botón floral pos-antesis característico de *C. chinense*. 7
- Figura 1. 3:** Representación esquemática de los métodos empleados para la producción de progenitores élite en programas de mejoramiento genético..... 10
- Figura 1. 4:** Representación esquemática de los resultados de la inducción de embriogénesis a partir de células somáticas y reproductivas. 12
- Figura 1. 5:** Características morfológicas y ultraestructurales de embriones somáticos de la especie recalcitrante *C. chinense*. (A) Fenotipo en forma de copa. (B) Fenotipo en forma de alfiler. (C) Embriones fusionados. (D, E) Cotiledones deformados. (F-H) Micrografía de secciones histológicas de embriones somáticos con SAM deformado: (F) Formación anormal del SAM en un embrión en forma de copa, (G) Deformaciones del meristemo en embriones fusionados (MDF), (H) Sin formación de meristemo apical entre los cotiledones (Cot). Tamaño del marcador: 50 μm . Modificado de Pijeira-Fernández & Santana-Buzzy, 2024. 14
- Figura 1. 6:** Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la embriogénesis somática, que han sido estudiados en la especie recalcitrante *C. chinense*. Los factores de transcripción en rojo son aquellos cuyos patrones de expresión difieren de los de los embriones cigóticos. Los factores de transcripción en azul son aquellos cuyos patrones de expresión no difieren de los de los embriones cigóticos. AD: Desarrollo apical. LD: Desarrollo lateral..... 18
- Figura 1. 7:** Diferentes alternativas androgénicas para la formación de gametos masculinos. Partiendo de la microsporogénesis y la microgametogénesis (ruta 0, fondo púrpura), un individuo haploide o doble haploide derivado del precursor gametofito masculino puede originarse de tres maneras: (1) formación de gametos, fertilización del óvulo sin fusión nuclear y desmantelamiento del núcleo materno (ruta 1). (2) Desviación de la microspora en estado vacuolado o del grano de polen joven hacia la embriogénesis o, ocasionalmente, hacia la callogénesis, seguida por la organogénesis (ruta 2). (3) Desviación del meiocito hacia la callogénesis, que puede potencialmente llevar a la formación de haploides y dobles haploides, pero también a diploides heterocigotos (ruta 3). Tomada
-

de Segui-Simarro et al., 2010..... 22

Figure 2. 1: Establecimiento de la variedad Mayan K'iiin (*C. chinense*) como material vegetal donante de explante en condiciones de invernadero. A: Germinación de semillas en charolas de unícel con sustrato Sunshine. B: Plántulas germinadas en estadio óptimo para el trasplante a bolsas. C: Establecimiento escalonado del material vegetal en el invernadero. D: Planta con hojas cloróticas y pérdida de turgencia. E: Planta con síntomas de defoliación y aborto floral. F: Planta infectada por el ácaro araña roja (*T. urticae*). G: Hoja con signos de daño causado por plagas. 42

Figure 3. 1: Morphological features of floral buds and anthers at different stages of floral development, and the micropore developmental stage predominant in each group. A: Floral bud from Group 1; A': Anther from the floral bud of Group 1; A'': Microspores in tetrads. B: Floral bud from Group 2; B': Anther from the floral bud of Group 2; B'': Early uninucleated individual microspores. C: Floral bud from Group 3; C': Anther from the floral bud of Group 3; C'': Vacuolated uninucleated microspores. D: Floral bud from Group 4; D': Anther from the floral bud of Group 4; D'': Early binucleated microspores. E: Floral bud from Group 5; E': Anther from the floral bud of Group 5; E'': Mature pollen..... 57

Figure 3. 2: Propidium Iodide Staining for viability assessment. A: Suspension of microspores extracted from the anthers by anther sonication. B, B': Non-viable microspore: bright field image (B) and fluorescence image (B') indicating the stained nucleus (N) of the microspore. C, C': Viable microspores with intact exine wall. D: Fluorescence image of viable microspores showing a single non-viable cell. Each scale bar corresponds to 20 µm in length. N: nucleus; nv: non-viable. Bars indicate 20 µm length. 58

Figure 3. 3: Morphological changes associated with embryogenic reprogramming in the microspore culture of *C. chinense*. A: Untreated microspores viewed in equatorial (I) and polar (II) planes, indicating the exine layer covering them. B: Responsive microspore with a slight increase in size and cytoplasmic changes distinguishing it from others in the visual field. C: Dense multicellular structure confined in the exine wall (ew). D: Multicellular structures emerging through a marked rupture point in the exine layer. E: Rounded multicellular structure with defined edges. F: Irregular multicellular structure. G: Polarized multicellular structure resembling a somatic embryo morphology. H: Irregular multicellular structures with high density. I: Micrograph of a macroscopic structure resembling a callus. Each scale bar corresponds to 20 µm in length..... 60

Figure 3. 4: Morphogenic structures formed in regeneration medium R1. A: Proliferative callus in R1 medium. C, D: abnormal individual structures 62

Figure 4.1: Morphological changes observed in cultured anthers. A-E) Anthers with dehiscent thecae: A) Lobulated opening of thecae; B) Fully open thecae with microspore release into the medium; C) Partial opening of thecae due to internal structure formation; D) Elongated embryo-like structure emerging from within the pollen sac. E-H) Callus formation in anthers: E) Translucent callus emerging from the pollen sac; F) Translucent callus in the central zone of the anther; G) Embryogenic callus covering the anther surface, highlighting globular structure formation. H-M) Embryonic structures: I) Early globular-stage embryo; J) Heart-stage embryo; K) Torpedo-stage embryo; L-M) Advanced-stage embryonic structures emerging from within the anther. N) Field of microspore-derived multicellular structures isolated from responsive anthers. O, P) DAPI-stained microspore-derived multicellular structures..... 77

Figure 4.2: Graphical representation of the different types of morphogenic responses quantified to assess the efficiency of PGR treatments across various culture methods. Each graph is segmented into the five treatment groups corresponding to T0 (no PGR), T1-T4 (NAA/KIN), T5-T8 (2,4-D/KIN), T9-T12 (NAA/ZEA), and T13-T16 (2,4-D/ZEA). Results for each of the three evaluated culture methods are represented with different colored bars. Different letters indicate statistically significant differences among genotypes ($p \leq 0.05$)..... 79

Figure 4.3: Effect of heat shock and exposure periods on the formation of embryo-like structures (A) and callus production (B) in anthers cultured in NN basal medium (T0) and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ NAA/KIN (T2). 79

Figure 4.4: Morphogenic response of ovaries in co-culture with anthers. A) Cross-section of an uncultured ovary. B) Proliferation of translucent callus originating from the ovary walls. C) Induced and elongated ovules attached to the ovary in culture. D-F) Sequence of extraction of a cotyledonary-stage embryo derived from an ovary in culture. D) Elongated embryonic structure protruding from the cultured ovary. E) Embryonic structure extracted along with the embryo sac, showing no vascular connection. F) Cotyledonary-stage embryo with developed radicle and shoot apices. 81

Figure 4.5: Somatic embryos of habanero pepper. A) Ealy somatic embryos proliferating from hypocotyl tissue. B: Abnormally-developed somatic embryo in advance stage of development..... 82

Figure 4.6: Relative quantification of *BBM* and *LEC* transcripts in different samples: ACI: Individually cultured anthers; ACO: Anthers co-cultured with ovaries; OCA: Ovaries co-cultured with anthers; ES: Somatic embryo; EC: Zygotic embryo; AST: Untreated anther; OST: Untreated ovary. Different letters indicate significant differences between mean values represented ($n=4$; $p<0.05$). 83

ABREVIATURAS

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ACI: Anteras cultivadas individualmente

ACO: Anteras cocultivadas con ovarios

AD: Desarrollo apical

ADN/DNA: Ácido desoxirribonucleico

AGL15: AGAMOUS-LIKE15

AgNO₃: nitrato de plata

AIA/IAA: Ácido indolacético

ANA/NAA: Ácido naftalenacético

ANOVA: Análisis de varianza

AST: Anteras sin tratamiento

AUX: Auxinas

BBM: *BABY BOOM*

Cad: Cadaverina

CICY: Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán

CK: Citoquininas

CTV: Cultivo de tejidos vegetales (PTC en inglés)

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole

DH: Doble Haploide

EC/ZE: Embrión cigótico / zygotic embryo

ES/SE: Embrión somático / somatic embryo

FL: Fragment length

F1: Primera generación filial

FT: Factor de transcripción (TF en inglés)

H₂O: agua

KIN: kinetina

KNO₃: Nitrato de Potasio

LD: Desarrollo lateral

LEC: *LEAFY COTYLEDON*

MIP: Manejo integrado de plagas

NaClO: hipoclorito de sodio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NN: Medio de cultivo Nitsch & Nitsch

OST: Ovarios sin tratamiento

PA: Poliaminas

PCR: Reacción en Cadena de la Polymerasa

PI: propidium iodide/ yoduro de propidio

PIN: PIN-FORMED

PTC: Cultivo de tejidos vegetales

Put: Putrescina

RCV/PGR: Regulador de crecimiento vegetal/ Plant growth regulator

SAM: del inglés “shoot apical meristem” – meristemo apical del brote

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM)

STM: SHOOT MERISTEMLESS1

T_m: Melting temperature

WOX: WUSCHEL HOMEBOX

WUS: WUSCHEL

ZEA: zeatina

RESUMEN

La relevancia económica, social y cultural del chile habanero ha consolidado a este cultivo como un emblema de la Península de Yucatán. En este contexto, es fundamental contar con herramientas biotecnológicas que complementen las estrategias convencionales de mejoramiento genético, particularmente aquellas basadas en el cultivo de tejidos, que ofrecen ventajas significativas para la propagación y mejora de plantas *in vitro*. *Capsicum chinense* Jacq. es conocido por su marcada recalcitrancia a la regeneración *in vitro*, y la inducción de embriogénesis a partir de gametos ha sido poco explorada en esta especie. La androgénesis emerge como una técnica prometedora, con el beneficio adicional de permitir la obtención de plantas dobles haploides, de alto valor para el mejoramiento genético convencional. Este trabajo tuvo como objetivo principal establecer un sistema de embriogénesis mediante el cultivo de anteras y microsporas de la variedad Mayan K'íin de *C. chinense*. A través de la optimización de factores clave como la identificación del estadio de desarrollo adecuado de la microspora así como del tipo de medio de cultivo y tratamientos con reguladores de crecimiento, se lograron obtener embriones derivados de microsporas y óvulos en cultivo. Este estudio constituye un avance significativo al presentar el primer éxito documentado en la inducción de androgénesis en cultivos de anteras y microsporas de *C. chinense*, además de la primera inducción de partenogénesis en óvulos no fecundados cultivados *in vitro* dentro de esta especie.

ABSTRACT

The economic, social, and cultural significance of habanero pepper has established this crop as a symbol of the Yucatán Peninsula. In this context, it is essential to develop biotechnological tools that complement conventional breeding strategies, particularly those based on tissue culture, which offer significant advantages for *in vitro* propagation and plant improvement. *Capsicum chinense* Jacq. is known for its pronounced recalcitrance to *in vitro* regeneration, and the induction of embryogenesis from gametes has been scarcely explored in this species. Androgenesis emerges as a promising technique, with the added benefit of enabling the production of double haploid plants, which are highly valuable for conventional breeding programs. This study aimed to establish an embryogenesis system through the culture of anthers and microspores of the *C. chinense* Mayan K'iiin variety. By optimizing key factors such as identifying the appropriate microspore developmental stage, selecting the type of culture medium and appropriated induction treatments, embryos derived from microspores and ovules in culture were successfully obtained. This study represents a significant advance, documenting the first successful induction of androgenesis in anther and microspore cultures of *C. chinense*, as well as the first induction of parthenogenesis in unfertilized ovules cultured *in vitro* in this species.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la Península de Yucatán es reconocido por sus características organolépticas singulares y su alta pungencia. Esta especie tiene un alto valor cultural, gastronómico e industrial, que sumado a su potencial para la exportación lo convierten en un cultivo de interés comercial (Oney-Montalvo *et al.*, 2022). Debido a su importancia económica, se ha impulsado la creación de programas de mejoramiento genético encaminados a la obtención de variedades más productivas, resistentes a enfermedades y con rasgos fenotípicos atractivos (Peña-Yam *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2020; Rodríguez-Llanes *et al.*, 2023). Además, se ha fomentado su explotación biotecnológica enfocada a la propagación clonal de variedades mejoradas, la conservación de germoplasma y la extracción de metabolitos secundarios (Montalvo-Peniche *et al.* 2007; Haque y Gosh, 2018; Humbal y Pathak 2023).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se considera una herramienta esencial para el aprovechamiento biotecnológico de una especie, ya que permite la regeneración de plantas completas a partir de células, tejidos y órganos de una planta madre, conservando sus características genotípicas (Phillips y Garda, 2019). Entre las rutas morfogénicas implementadas, se destaca la embriogénesis somática por sus múltiples ventajas en la micropropagación clonal (Ossai *et al.*, 2024). Sin embargo, la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos en las especies de chile está restringida por la baja tasa de regeneración *in vitro* que presentan las especies de este género (Lozada *et al.*, 2022). Esta incapacidad de conversión se denomina recalcitrancia, y constituye la principal limitante para las aplicaciones biotecnológicas en el género (Benson, 2000). La especie *C. chinense* es reconocida por ser severamente recalcitrante a la embriogénesis somática, lo cual se manifiesta en las múltiples deformaciones que presentan los embriones somáticos en estadio avanzado que impide su conversión en plantas completas.

Este fenómeno se ha estudiado a fondo en la especie tanto a nivel fisiológico como a nivel genético, sin embargo, aún no ha sido posible establecer un protocolo eficiente para la regeneración de embriones somáticos en *C. chinense* (López-Puc *et al.*, 2006; Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Avilés-Viña *et al.*, 2013; Valle-Gough *et al.*, 2015; Regla-Márquez *et al.*, 2019; Pérez-Pastrana *et al.*, 2021). Es por esto que se hace necesaria la exploración de

otras rutas morfogénicas alternativas que permitan obtener plantas regenerantes de manera eficiente.

La androgénesis es una ruta morfogénica que ofrece ventajas alternativas de gran valor para el mejoramiento. Este es un proceso morfofisiológico en el cual se forman embriones haploides partiendo exclusivamente del precursor gametófito masculino (microspora), los cuales son susceptibles a duplicar su genoma en cualquier etapa del proceso. Como resultado se obtienen individuos homocigóticos en una sola generación, lo que supera notoriamente la eficiencia de los programas tradicionales de hibridación empleados en la obtención de líneas puras (Badu *et al.*, 2017; Testillano, 2019; Hale *et al.*, 2022). La inducción de androgénesis *in vitro* depende de un conjunto de factores de naturaleza compleja, entre los que destacan el estadio de desarrollo de la microspora, el genotipo y fisiología de la planta madre, así como las condiciones de cultivo. Por tanto, el éxito de los protocolos está determinado por una búsqueda experimental exhaustiva de las condiciones de inducción óptimas para cada genotipo (Jha *et al.*, 2021).

En la actualidad, existen varios protocolos exitosos de androgénesis en *Capsicum*, a partir del cultivo de anteras o microsporas, los cuales son referentes de las investigaciones subsecuentes (Dumas de Vaultx *et al.*, 1981; Dolcet-Sajuan *et al.*, 1997; Supena *et al.*, 2006; Lantos *et al.*, 2009). Sin embargo, aún hay mucho trabajo por hacer en cuanto a la adaptación y optimización de este proceso para una amplia variedad de genotipos (Pinar *et al.*, 2020; Hale *et al.*, 2022). Hasta el momento, no existen protocolos de androgénesis aplicables a la especie *Capsicum chinense* y las investigaciones al respecto son escasas. A pesar de esto, la androgénesis es una alternativa prometedora para abordar los problemas de regeneración *in vitro* de esta especie, proporcionando además un proceso morfogénico de alto valor para el mejoramiento genético del chile habanero.

Por tanto, el objetivo de esta tesis fue establecer un sistema de embriogénesis a partir del cultivo de anteras y microsporas de dos genotipos de *Capsicum chinense* Jacq, a través de la optimización de los factores determinantes en la androgénesis.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. *Capsicum chinense* como especie representativa del género *Capsicum*

El género *Capsicum* es muy popular a nivel mundial, debido a las características organolépticas de su fruto y su alta pungencia. Este presenta un alto contenido de compuestos antioxidantes, vitaminas, antimicrobianos y anticancerígenos, así como de carotenoides, flavonoides y capsaicinoides, que le dan un sabor y olor característicos. Estas características hacen de *Capsicum* un género de gran importancia económica, muy demandado por las industrias alimenticia y farmacológica principalmente (Duranova *et al.*, 2022). Existe una amplia diversidad genética de chiles, destacando las cinco especies domesticadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum pubescens* L. y *Capsicum chinense* Jacq. son las más cultivadas a nivel mundial (Lal *et al.*, 2023).

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. 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 se ha empleado para la elaboración de productos de defensa personal (Sosa-Moguel *et al.*, 2017).

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. El mayor volumen de producción se concentra hacia el sureste del país, destacando la Península de Yucatán, que ha sido reconocida 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. Sin embargo, la producción de chile habanero en esta región, principalmente en el estado de Yucatán enfrenta varias limitaciones que afectan tanto la cantidad como la calidad del producto (Figura 1.1). Los cultivares de habanero de esta región presentan un bajo rendimiento, frutos pequeños y una alta variabilidad en sus poblaciones. Las condiciones climáticas extremas, como altas temperaturas, sequías prolongadas, lluvias intensas y la calidad del suelo, son factores que limitan el crecimiento óptimo de esta especie. Además, la presencia de enfermedades como la marchitez bacteriana, los virus y el manejo inadecuado de plagas como el rips y la mosca blanca conducen a pérdidas significativas en la producción (Corrales-García *et al.*, 2002). 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).



Figura 1. 1: Datos de producción de chile habanero en los estados de Campeche, Yucatán y Quintana Roo según datos de SIAP, 2021. Imagen tomada de: Campeche lidera producción de chile habanero en la Península de Yucatán -Fuente: PorEsto

1.2. Descripción botánica del género *Capsicum*

Los representantes del género *Capsicum* 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 (Ahn *et al.*, 2014). Las plantas pueden alcanzar de 45 a 150

cm de altura y se describen como un tallo verde, profusamente ramificado, con hojas verdes de ápice agudo o ligeramente acuminado, márgenes enteros y ondulados, base atenuada y una longitud de 10 a 14 cm. Posee una raíz pivotante con formaciones secundarias que profundizan en el suelo entre 0.4 y 1.20m.

Sus flores miden de 2 a 2,5 cm de longitud, con corolas de color blanco o blanco crema y una ligera pigmentación verde clara en estadios tempranos de desarrollo y se producen más de dos flores por nodo. El cáliz es gamosépalo y persistente. Los estambres son epipétalos con anteras basifijas color violeta y filamentos violáceos. Los ovarios se componen de tres lóbulos elipsoidales y presenta un estigma es difuso. Cada botón floral cuenta con 5 anteras y estas varían su coloración de blanco crema a violeta a medida que avanza el estadio de desarrollo del botón. La fruta posee de 4 a 5 lóculos huecos con placentación central y cerca de 25 a 35 semillas arrugadas. Cada fruta de chile pesa entre 5 y 12 g, con una sola planta que produce alrededor de 20 a 140 frutas, dependiendo de la variedad y las condiciones de cultivo (Baruah y Lal, 2020). La Figura 1.1 muestra una imagen descriptiva de las estructuras reproductivas que componen el botón floral en estadio temprano (A) y posantesis (B) de la especie *C. chinense*.

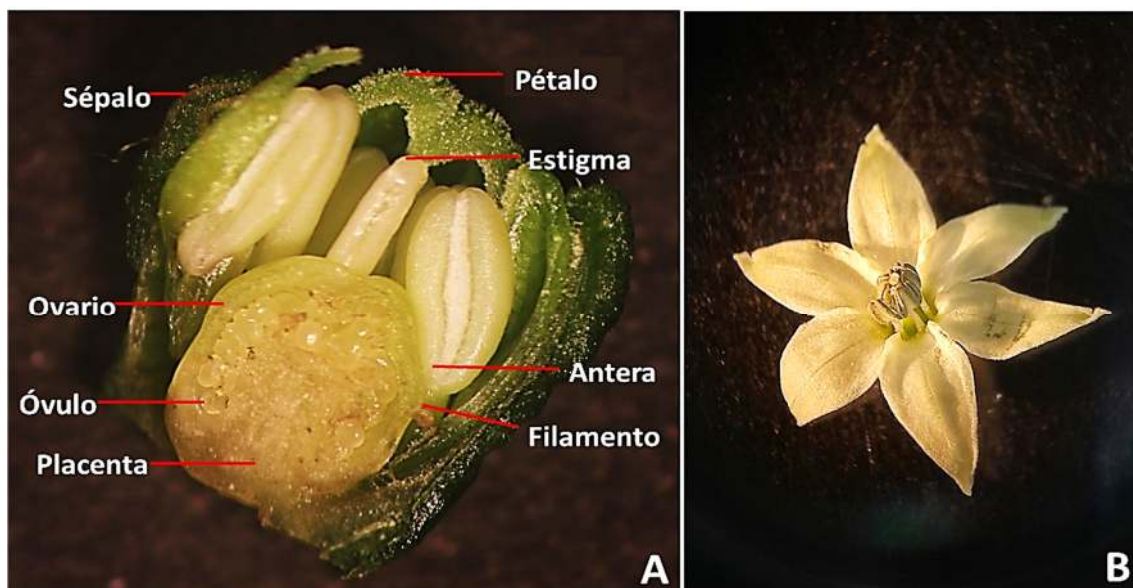


Figura 1. 2: Estructuras reproductivas que conforman el botón floral de la especie *C. chinense*. A) Botón floral en etapa de desarrollo temprano donde se señalan los órganos y células que lo conforman. B) Botón floral pos-antesis característico de *C. chinense*.

1.3. Particularidades de la biología reproductiva de *Capsicum chinense*

El creciente auge del mejoramiento genético de la especie *C. chinense* ha motivado el interés por comprender las particularidades de su biología reproductiva. Los avances más significativos en la producción de híbridos y variedades por métodos convencionales y biotecnológicos se han logrado a través del entendimiento de procesos reproductivos como la antesis, la viabilidad del polen, la receptividad del estigma, las fases de la microgametogénesis y su correspondencia con el desarrollo de los órganos sexuales de la planta, entre otros.

En el trabajo de Pérez-Pastrana *et al.*, 2018 se hace una descripción detallada del desarrollo del óvulo y la semilla de chile habanero. Los estudios inmunohistoquímicos permitieron identificar los diversos estadios asociados a la megasporogénesis y los eventos subsecuentes a la fertilización. Entre los principales descubrimientos de este trabajo está que, en el momento de la antesis, se observa la presencia de óvulos maduros con una organización estructural similar a la que se ha descrito previamente para *C. annuum*. Sin embargo, después de la fertilización se forma un menor número de semillas en *C. chinense*, lo que sugiere una alta tasa de aborto en los óvulos de la especie. Adicionalmente, se identificaron los cambios a nivel histoquímico durante el transcurso de la megasporogénesis y la megagametogénesis.

Peña-Yam *et al.*, 2019 realizó un estudio descriptivo de la biología floral de *C. chinense*. En ese trabajo se plantea que el chile habanero es una planta autopolinizable, hermafrodita, con una estructura floral óptima para los procesos de emasculación y polinización propios del mejoramiento convencional. Los hallazgos de este estudio revelaron que el estigma se encuentra receptivo previo a la antesis, sin embargo, las anteras permanecen cerradas, por lo que la autopolinización no ocurre inmediatamente. En cuanto a la viabilidad del polen, se observó que esta disminuye a medida que avanza el tiempo de conservación, por lo que se recomienda su utilización inmediata después de su recolección. En referencia a la posición del pistilo respecto a las anteras, se concluyó que es un parámetro que varía de acuerdo al genotipo.

A pesar del avance en el entendimiento de los procesos reproductivos del chile habanero, hasta el momento no se han desarrollado estudios relacionados con la formación de los

gametos masculinos o sus precursores. Tampoco se conoce la correlación específica entre el desarrollo de la microspora, la antera y el botón floral en la especie, lo que puede ser de gran interés para los programas de mejoramiento enfocados a la obtención de haploides, dobles haploides y progenitores élite.

1.4. Fitomejoramiento en el género *Capsicum*

La importancia económica del género *Capsicum* ha motivado la creación de múltiples programas de mejoramiento genético convencional, para generar genotipos que puedan enfrentarse a los retos que supone su producción agrícola a gran escala. Entre los rasgos de interés para la mejora genética en el género destacan la productividad, la tolerancia al estrés biótico y abiótico y la potenciación de las características organolépticas. Sin embargo, la obtención de variedades mejoradas mediante estrategias convencionales aún no satisface completamente las demandas de producción en el género (Do Rego *et al.*, 2016).

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. Las técnicas tradicionales de mejoramiento se basan en la transferencia vertical de genes a través del cruzamiento de especies compatibles. Para esto, se seleccionan progenitores con rasgos de interés agronómico que puedan ser transmitidos a la progenie, sin embargo, los resultados de este proceso suelen presentar una alta variabilidad (Ye *et al.*, 2004). Para minimizar la variabilidad inherente a este proceso se producen las líneas parentales endogámicas (o progenitores élite). Estas son líneas de plantas genéticamente homogéneas, con caracteres fijados, que dan lugar a una progenie híbrida F₁ uniforme en cada ciclo de cruzamiento, por lo que su producción es de especial interés para los mejoradores (Figura 1.3) (Labroo *et al.*, 2021).

El proceso convencional de obtención de estas líneas suele ser largo y costoso, ya que implica la realización de varios ciclos de autopolinización, lo que en algunos casos puede llevar a la acumulación de alelos recesivos perjudiciales, reduciendo el vigor y la fertilidad de las plantas (Begna, 2021). En este contexto ha surgido la Tecnología de Producción de

Dobles Haploides (DH), que permite desarrollar líneas homocigotas de manera mucho más rápida y eficiente. Ésta se basa en la duplicación química o espontánea de un genoma haploide producido *in vitro* vía androgénesis, acompañada de procesos de selección asistida por marcadores moleculares. El principal beneficio de la androgénesis como proceso de cultivo de tejidos vegetales (CTV), es que permite la regeneración de tejidos genéticamente fijados, derivados del estado haploide de la microspora y la posterior diploidización del genoma.

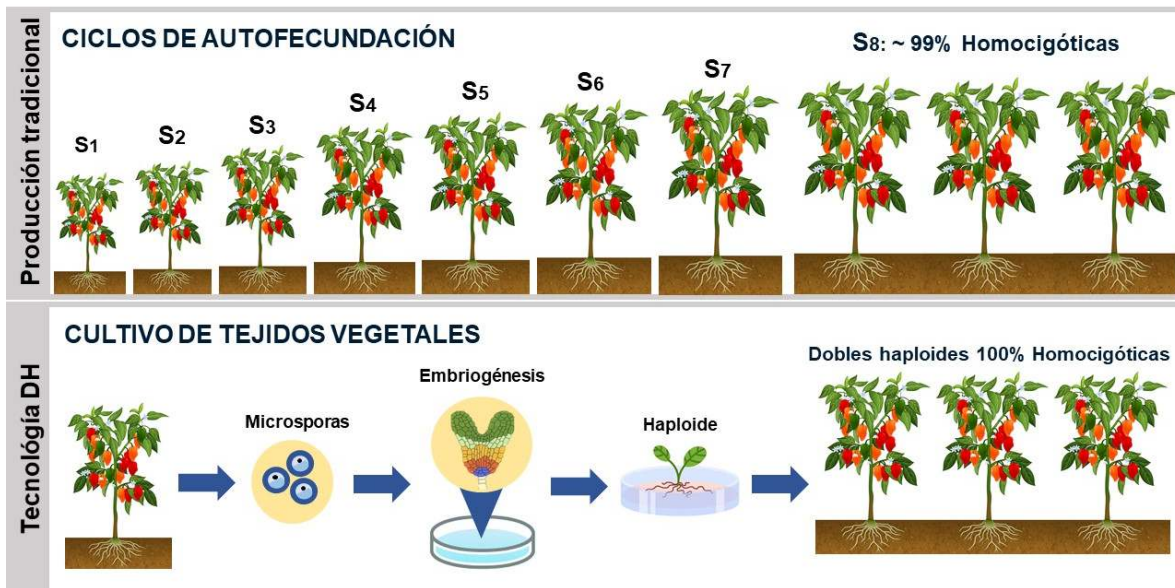


Figura 1. 3: Representación esquemática de los métodos empleados para la producción de progenitores elite en programas de mejoramiento genético.

Esta tecnología ya ha sido ampliamente utilizada para el mejoramiento de diversos cultivos de interés agronómico, incluidos cultivos hortícolas del género *Capsicum* (Hale *et al.*, 2022). Existen protocolos ampliamente difundidos para la obtención de DH a partir de diferentes genotipos de *C. annuum* (de Vaulx *et al.*, 1981; Supena *et al.*, 2006a; Lantos *et al.*, 2012a). Sin embargo, muchos estudios han señalado la ineficiencia y baja reproducibilidad de los protocolos disponibles para la inducción de androgénesis en diferentes genotipos de Chile (Seguí-Simarro, *et al.*, 2011; Ari *et al.*, 2016; Doğangüzel *et al.*, 2021). Hasta el momento, no existen reportes sobre la aplicación de esta tecnología con resultados satisfactorios en la especie *C. chinense*.

1.5. CTV como herramienta para el mejoramiento genético en plantas

El CTV es un conjunto de técnicas que permiten el crecimiento y manipulación de células, tejidos y órganos vegetales y la regeneración de plantas completas en condiciones controladas y asépticas. Las condiciones controladas implican el suministro de todos los nutrientes y el agua necesarios para la supervivencia del explante, así como el ajuste en las condiciones óptimas de incubación. Adicionalmente, se puede manipular el desarrollo de los tejidos mediante la adición de reguladores de crecimiento en dependencia del objetivo del cultivo. Los tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento utilizados actúan como señales químicas para la inducción de diferentes procesos morfogénicos *in vitro* (Philips *et al.*, 2019). Esta herramienta desempeña un papel crucial en la biotecnología moderna, siendo ampliamente utilizado en estudios fisiológicos, análisis del funcionamiento génico, micropropagación y generación de plantas transformadas con rasgos industriales y agronómicos específicos. Además, permite la obtención de material vegetal aséptico y saludable, así como la preservación de genotipos vegetales. También se emplea en la producción de metabolitos secundarios de interés comercial, entre otras aplicaciones industriales (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Una de las aplicaciones más explotadas es la micropropagación, una herramienta de clonación para obtener plantas genéticamente uniformes e idénticas al genotipo de la planta madre. Sin embargo, actualmente se reconoce que también puede ser una fuente de variabilidad debido a procesos como la variación somaclonal, las mutaciones inducidas por reguladores de crecimiento y los cambios epigenéticos (Bednarek y Orłowska, 2020).

Las técnicas de CTV están basadas en el principio de totipotencia celular, que plantea que cualquier tipo celular vegetal, bajo condiciones ambientales específicas tiene la capacidad de transicionar hacia un estado proliferativo no diferenciado (callo) y/o cambiar hacia otros programas de desarrollo diferentes al original. Alternativamente, se puede inducir la expresión del programa embriogénico (embriogénesis), capaz de transformar tanto células vegetativas como células reproductivas en estructuras similares a cigotos funcionales que eventualmente se convertirán en embriones a través de diferentes procesos. La androgénesis es el proceso de obtención de embriones a partir de las células precursoras del gameto masculino (microsporas), produciendo plantas haploides que pueden duplicarse para obtener líneas homocigóticas (Seguí-Simarro *et al.*, 2010). La partenogénesis,

involucra el desarrollo de embriones a partir de óvulos no fecundados en cultivo, resultando en plantas que solo contienen material genético materno (Salehian *et al.*, 2024). La embriogénesis somática, implica la formación de embriones a partir de células somáticas no reproductivas provenientes de diferentes órganos de la planta, permitiendo la clonación de plantas genéticamente idénticas a la planta donante de explante (Elhiti y Stasolla, 2022) (Figura 1.4).

Posterior a la obtención de las estructuras embrionarias en estadio avanzado, los pasos de regeneración involucran una nueva reprogramación celular hacia el desarrollo de estructuras especializadas que permitan la obtención de una planta completamente funcional (Phillips *et al.*, 2019). Esta etapa limita la utilidad del CTV en múltiples genotipos vegetales, los cuales tienden a presentar anomalías en el desarrollo de las estructuras morfológicas, impidiendo la regeneración de plantas completas. A esta incapacidad de respuesta al cultivo se le denomina recalcitrancia y puede presentarse en todas las etapas del proceso (Benson, 2000). La recalcitrancia se puede manifestar también en la poca respuesta del explante a los estímulos inductores, la pérdida de totipotencialidad o competencia morfológica, tasas de regeneración bajas o nulas, y dificultades en la germinación (Patel *et al.*, 2022).

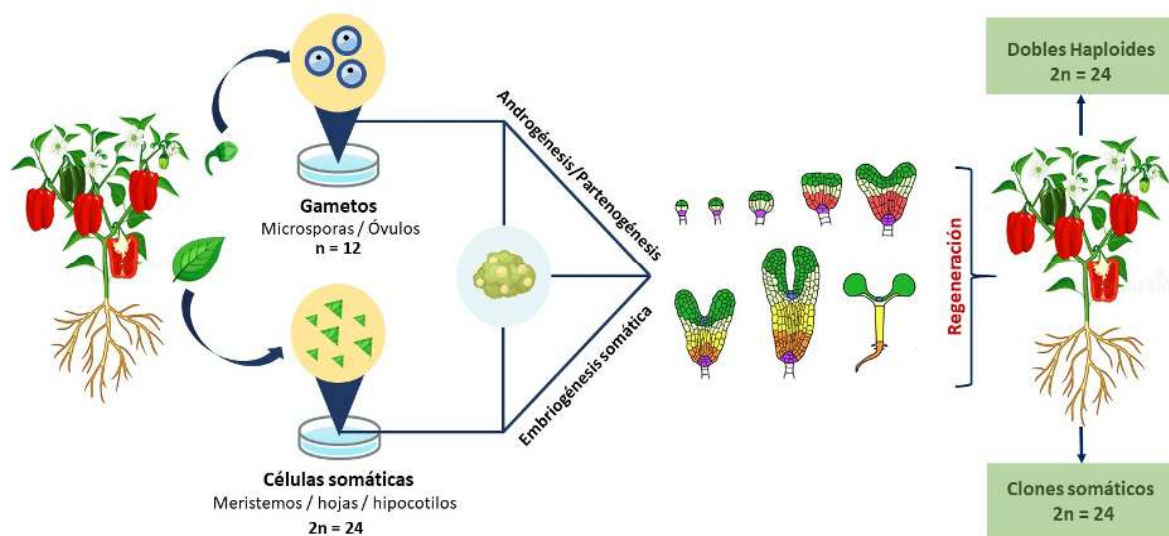


Figura 1. 4: Representación esquemática de los resultados de la inducción de embriogénesis a partir de células somáticas y reproductivas.

Capsicum es reconocido como un género recalcitrante al CTV y, especialmente, a la regeneración *in vitro*. Su escaso potencial de regeneración *in vitro* se manifiesta en la alta frecuencia de deformación de los embriones obtenidos en cultivo. Varios estudios han reportado la formación de numerosas estructuras que no lograron desarrollar correctamente el meristemo apical aéreo del brote (SAM: del inglés “shoot apical meristem”), lo que limita su conversión en plantas completas (Phillips y Hubstenberger, 1985; Steinitz *et al.*, 2003; Supena *et al.*, 2006; Avilés-Viñas *et al.*, 2013; Ayzenshtat *et al.*, 2023). Este fenómeno se ha reportado en diferentes genotipos del género entre los que destacan variedades de las especies *C. chinense* (López-Puc *et al.*, 2006; Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Avilés-Viñas *et al.*, 2013), *C. baccatum* (Venkataiah *et al.*, 2016) y *C. annum* (Binzel *et al.*, 1996; Steinitz *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la severidad de la recalcitrancia puede variar entre especies del mismo género, o incluso entre variedades de la misma especie (Cheng *et al.*, 2013; Haque *et al.*, 2018; Martínez-López *et al.*, 2021; Shafiq *et al.*, 2022; Shu *et al.*, 2022). En este sentido, la inducción de androgénesis ha mostrado resultados prometedores en el género, ya que ha permitido la obtención de embriones de morfología normal derivados de microsporas, los cuales se han logrado convertir exitosamente en plantas completas (Dumas de Vaultx *et al.*, 1981; Supena *et al.*, 2006; Lantos *et al.*, 2009). Sin embargo, la eficiencia de los protocolos es baja y no han sido reproducibles en otros genotipos del género. Es importante resaltar que, hasta el momento, no existe un protocolo de embriogénesis que permita la regeneración de plantas completas de la especie de interés agrícola *C. chinense*.

1.6. Estudios sobre la recalcitrancia a la regeneración *in vitro* en la especie *C. chinense* Jacq.

El fenómeno de la recalcitrancia a la regeneración de embriones somáticos se ha estudiado a fondo en la especie *C. chinense*. El primer protocolo de embriogénesis somática en chile habanero 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 tisulares.

La Figura 1.5 muestra algunas de las deformaciones características observadas en embriones somáticos de la especie a nivel morfológico y ultraestructural. Estas

observaciones coincidieron con las realizadas por Steinitz *et al.* (2003), quienes describieron embriones con morfología en forma de copa (Figura 1.5 A), embriones en forma de alfiler (Figura 1.5 B), embriones fusionados (Figura 1.5 C), desarrollo de un único cotiledón deformado (Figura 1.5 D) y embriones cotiledonares sin formación de meristemo apical (Figura 1.5 E). Estas coincidencias sugieren que se trata de una manifestación clásica de la recalcitrancia en el género *Capsicum*, independientemente del genotipo en cuestión. Un análisis ultraestructural SEM realizado por Avilés-Viñas *et al.* (2013), reveló que el tratamiento de inducción con la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) promueve una intensa división mitótica en las células provasculares del hipocótilo de *C. chinense*, dando origen a las células proembriogénicas, que posteriormente evolucionaron en embriones somáticos independientes. Sin embargo, el análisis histológico de embriones en estadios avanzados reveló un desarrollo anormal del ápice caulinar (Figura 1.5 F-H).

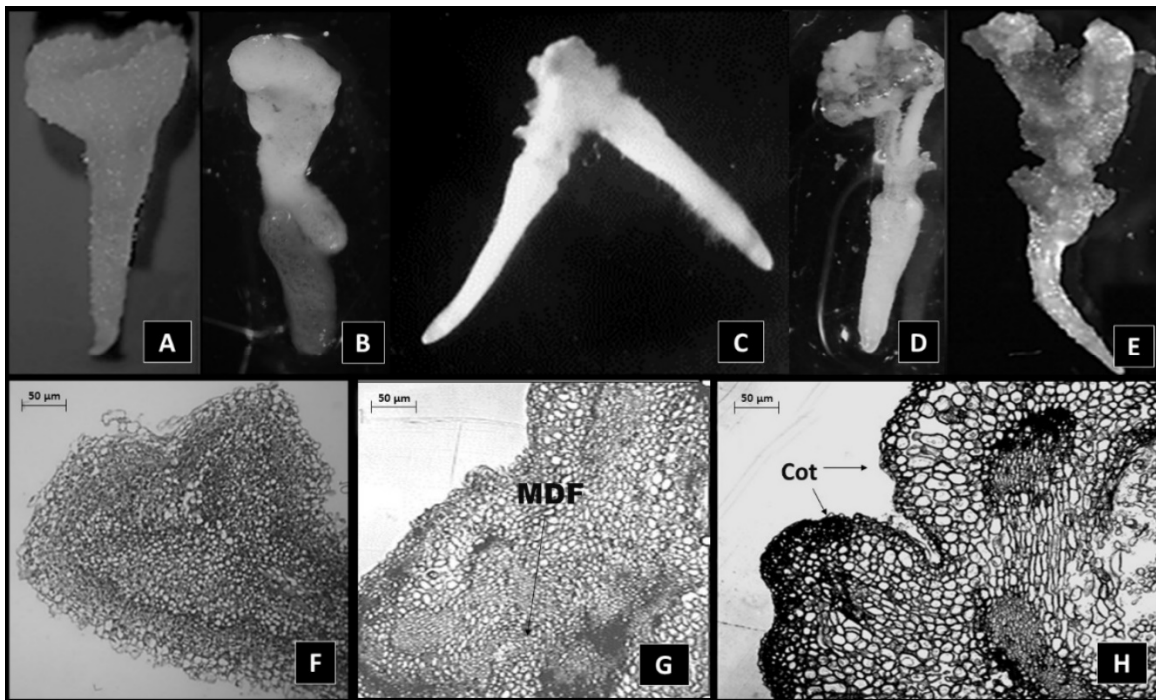


Figura 1. 5: Características morfológicas y ultraestructurales de embriones somáticos de la especie recalcitrante *C. chinense*. (A) Fenotipo en forma de copa. (B) Fenotipo en forma de alfiler. (C) Embriones fusionados. (D, E) Cotiledones deformados. (F-H) Micrografía de secciones histológicas de embriones somáticos con SAM deformado: (F) Formación anormal del SAM en un embrión en forma de copa, (G) Deformaciones del meristemo en embriones fusionados (MDF), (H) Sin formación

de meristemo apical entre los cotiledones (Cot). Tamaño del marcador: 50 μm . Modificado de Pijeira-Fernández y Santana-Buzzy, 2024.

Múltiples estudios en el género *Capsicum* y específicamente en la especie *C. chinense* han demostrado que la capacidad regenerativa está determinada por la acción conjunta de mecanismos de regulación genética, muy específicos en respuesta a condiciones ambientales y de cultivo. De igual manera, existe una diversidad de respuestas fisiológicas de la planta a estas condiciones impuestas, las cuales pueden afectar el desarrollo *in vitro* de los tejidos embrionarios y su potencial de regeneración. Ambos aspectos serán discutidos más ampliamente a continuación.

1.6.1 Estudios genéticos en embriones somáticos de la especie *C. chinense*

La formación del SAM requiere una especificación celular continua, regulada por una compleja red genética cuya expresión está regulada epigenéticamente (Nguyen y Gutzat 2022). El proceso *in vitro* abarca una serie de eventos moleculares, incluidos la percepción de señales inductivas, la proliferación celular y la reprogramación para adquirir la competencia regenerativa. Esta complejidad molecular determina que el potencial regenerativo de las plantas varíe drásticamente entre genotipos (Eshed-Williams 2021). Es generalmente aceptado que la embriogénesis cigótica y somática son procesos comparables en términos de regulación genética (Horstman *et al.*, 2017).

Los estudios de asociación genómica han identificado que el factor de transcripción (FT) *WUSCHEL* (*WUS*) y el equilibrio de las concentraciones de fitohormonas auxina/citocinina (*AUX/CK*) son los principales componentes en la regulación de la capacidad de regeneración en *Arabidopsis* spp. (Lardon *et al.*, 2020). *WUS* y la familia de FTs *WUS-related homeobox* (*WOX*) regulan específicamente el mantenimiento del equilibrio dinámico de las células madre en el SAM, la totipotencia celular, el desarrollo embrionario y la polarización, entre otros procesos celulares (Jha *et al.*, 2020). Su expresión es inducida por auxinas exógenas y está estrechamente relacionada con la de otros factores de transcripción cruciales para la inducción y regeneración de brotes, como *BABY BOOM* (*PLT4/BBM*), *AGAMOUS-LIKE15* (*AGL15*), *NF-Y*, *LEAFY COTYLEDON* (*LEC1*), *LEC2*, *SHOOT MERISTEMLESS1* (*STM1*) entre otros. La Figura 1.6 ilustra la integración de los factores que influyen en la expresión génica durante la embriogénesis somática y las

particularidades de la red transcripcional que regula la embriogénesis en la especie recalcitrante *C. chinense*, de acuerdo con los estudios realizados hasta el momento.

En *C. chinense*, los patrones de expresión de WUS no difieren significativamente entre embriones cigóticos (EC) y embriones somáticos (ES), pero la acumulación de transcritos es más alta en los embriones cigóticos inmaduros (Valle-Gough *et al.*, 2015; Regla-Márquez *et al.*, 2019). La transformación *in vitro* de *C. chinense* con el gen *WUSCHEL* de *Arabidopsis thaliana* promovió el desarrollo de embriones somáticos, aunque no se logró una regeneración completa (Solís-Ramos *et al.*, 2009). Entre los FTs *WOX* implicados en la formación del meristemo de brotes, *WOX1* y *WOX3* trabajan juntos regulando el crecimiento de órganos laterales. En estudios con *C. chinense*, los niveles de transcritos de *WOX1* y *WOX3* fueron casi indetectables en embriones somáticos, mientras que en los embriones cigóticos maduros se observó una expresión alta (Valle-Gough *et al.*, 2015).

STM es un gen involucrado en la formación y el mantenimiento del SAM, así como en la separación de cotiledones, mecanismos que se inducen a partir de un incremento en la síntesis de citocininas (Spinelli *et al.*, 2011). En un estudio realizado por Regla-Márquez *et al.* (2019) en *C. chinense*, el análisis de expresión de *STM* mostró patrones de expresión contrastantes entre embriones cigóticos y somáticos. Durante las primeras etapas de los embriones cigóticos *STM* presentó una alta expresión, mientras que, en los embriones somáticos deformes en estadio avanzado, la expresión fue significativamente menor.

En especies no recalcitrantes, los FTs *BBM* y *LEC* desempeñan una función clave en la regulación de la homeostasis de auxinas durante la inducción de la embriogénesis somática. Se ha demostrado que *BBM* regula transcripcionalmente *LEC1* y *LEC2*. El gen *LEC1* activa la expresión del gen *YUC*, mientras que *LEC2* y *AGL15* activan la expresión de enzimas involucradas en la síntesis, en el mantenimiento de la homeostasis, de auxinas necesarias para la inducción de embriogénesis tanto a partir de tejidos somáticos como en gametos (Horstman *et al.*, 2017). Irikova *et al.* (2012) identificó los genes *BBM* y *LEC* en el genoma de *C. annuum* y analizaron su expresión en embriones androgénicos en etapas tempranas y en tejidos no embriogénicos, confirmando niveles de expresión altos de ambos genes solo en los tejidos de anteras embriogénicas.

Pijera-Fernández *et al.* (2020) hizo un análisis comparativo de los patrones de expresión de los FTs *BBM* y *LEC* en embriones cigóticos y embriones somáticos de *C. chinense* var. Mayan Ba'Alché. Los resultados mostraron que los patrones de expresión de *BBM* y *LEC* en embriones cigóticos fueron opuestos a los observados en embriones somáticos. En el caso de *BBM*, se expresa en mayor cantidad en estadios tempranos del embrión cigótico y avanzados de embriones somáticos. Para *LEC* se observó lo contrario, acumulándose sus transcritos en estadios tempranos del embrión somático y disminuyendo hacia la madurez. Estudios de transformación del gen *BBM* mediada por *Agrobacterium* en *Capsicum annuum* aumentaron la capacidad de regeneración del tejido vegetal (Heidmann *et al.*, 2011). Este resultado sugiere que la expresión transitoria de *BBM* juega un papel crucial no solo en la inducción de la embriogénesis somática, sino también en el correcto desarrollo del embrión.

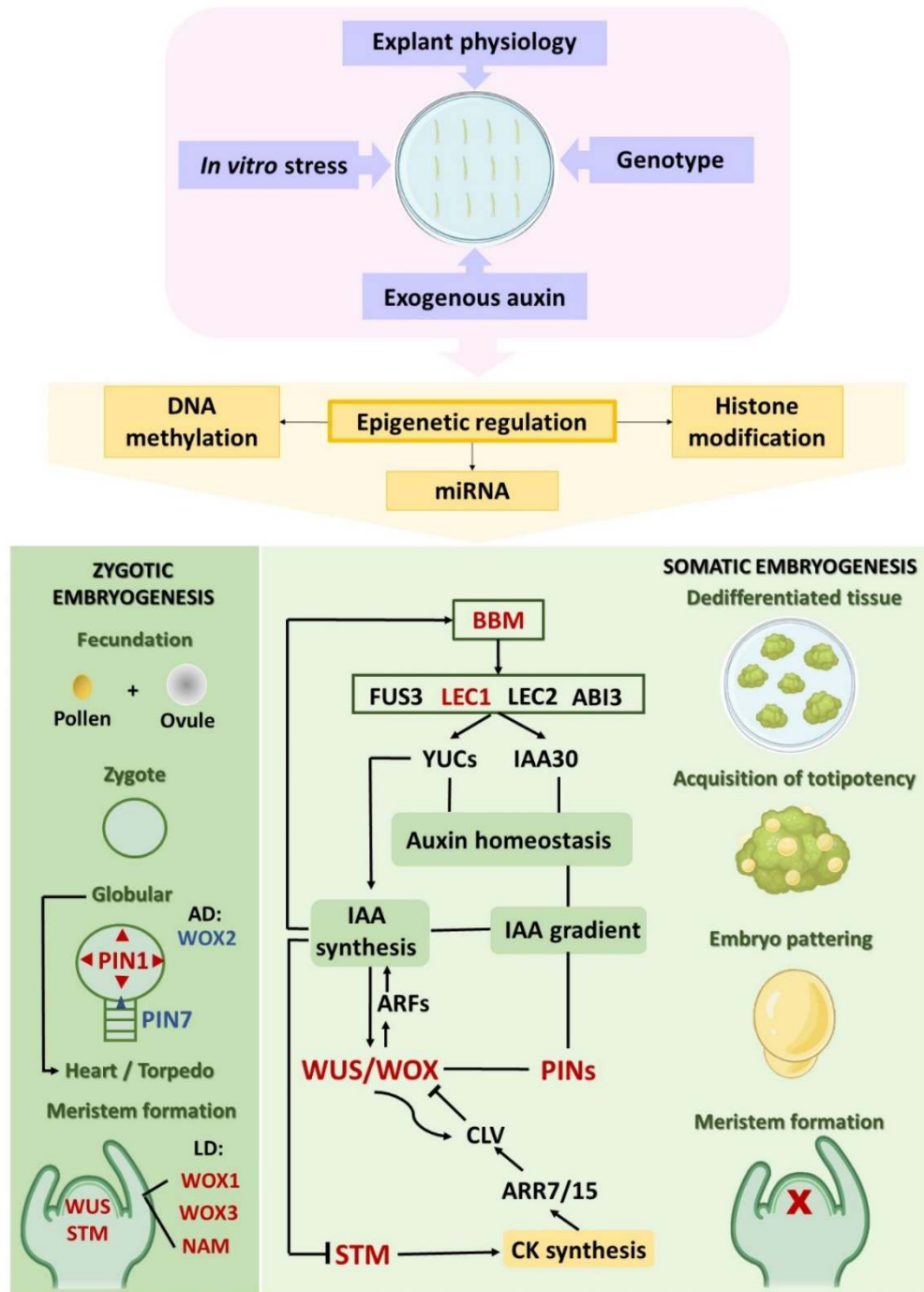


Figura 1. 6: Mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la embriogénesis somática, que han sido estudiados en la especie recalcitrante *C. chinense*. Los factores de transcripción en rojo son aquellos cuyos patrones de expresión difieren de los de los embriones cigóticos. Los factores de transcripción en azul son aquellos cuyos patrones de expresión no difieren de los de los embriones cigóticos. AD: Desarrollo apical. LD: Desarrollo lateral.

1.6.2 Factores fisiológicos determinantes de la respuesta embriogénica en *C. chinense*

Las respuestas morfogénicas *in vitro* se estimulan habitualmente mediante la adición de una proporción específica de reguladores del crecimiento vegetal (RC). Un enfoque común para mejorar o investigar la regeneración en cultivo implica manipular los niveles de otras fitohormonas, además de las auxinas (AUX) o citoquininas (CK) que se suministran típicamente. Se ha demostrado que las auxinas y citoquininas exógenas estimulan la producción de etileno (Vogel *et al.*, 1998; Tsuchisaka y Theologis, 2004), que se acumula fácilmente en los cultivos de tejidos, lo que puede limitar significativamente la regeneración (Santana-Buzzy *et al.*, 2006).

Por otro lado, también se han detectado la acumulación tisular de diferentes poliaminas, y se ha investigado su papel en la mejora de la morfogénesis y la regeneración (Valle-Gough *et al.*, 2015; Regla-Márquez *et al.*, 2016). Existe evidencia de que el etileno y las poliaminas ejercen una regulación coordinada sobre las frecuencias de regeneración *in vitro* y las respuestas morfogénicas en *Capsicum* (Batista *et al.*, 2013; Regla-Márquez *et al.*, 2016). Además de su función como reguladores del crecimiento, las poliaminas también sirven como una fuente alternativa de nitrógeno bajo las exigentes condiciones de cultivo (Rakesh *et al.*, 2021). Otras estrategias, como el enriquecimiento del medio y la suplementación de proteínas, se han implementado con éxito para mejorar la regeneración en especies del género (Kaparakis y Alderson, 2003; Pourmohammad *et al.*, 2021). Toda la investigación sobre el papel de estos factores en la embriogénesis somática en *C. chinense* se resume en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de diferentes factores fisiológicos en la respuesta morfogénica *in vitro* en especies de *Capsicum*

Factor fisiológico	Estudio	Referencias
Balance de AUX/CK	Efecto de diferentes tratamientos en los procesos de inducción de embriogénesis somática e histodiferenciación	Santana-Buzzy <i>et al.</i> , 2005 López-Puc <i>et al.</i> , 2006 Avilés-Viñas <i>et al.</i> , 2013 Pérez- Pastrana, 2013
	Inmunolocalización de ácido	Pérez-Pastrana <i>et al.</i> , 2021

	indolacético (AIA) en embriones somáticos y cigóticos	
Etileno	Efecto de la producción y acumulación de etileno en tejidos embriogénicos	Martínez-López <i>et al.</i> , 2021 Santana-Buzzy <i>et al.</i> , 2006 Bello-Bello <i>et al.</i> , 2010
Poliaminas	Efecto de las poliaminas en la respuesta embriogénica <i>in vitro</i>	Valle-Gough <i>et al.</i> , 2015 Regla-Márquez <i>et al.</i> , 2016
Proteínas	Síntesis proteica y su acumulación durante la embriogénesis	Lecona-Guzmán <i>et al.</i> , 2012

AUX: Auxinas; CK: Citocininas; AIA: Ácido Indolacético.

En general estos estudios demostraron que la embriogénesis somática en *Capsicum chinense* debe ser inducida inicialmente con la aplicación de una alta concentración de auxina exógena, la cual debe reducirse posteriormente para inducir el proceso de histodiferenciación, aunque no se debe eliminar por completo ya que esto afecta la eficiencia del proceso (Avilés-Viñas *et al.*, 2013). En cuanto a la acumulación de etileno en cultivos no ventilados se ha demostrado que afecta negativamente la respuesta morfogénica, lo cual puede mitigarse ventilando el medio, con inhibidores de etileno como el nitrato de plata (AgNO_3) o poliaminas como la espermidina, que mejoran la regeneración.

Valle-Gough *et al.* (2015) evaluó el efecto de las poliaminas espermina (Spm), espermidina (Spd) y putrescina (Put) en embriones somáticos deformados. Se observó que la adición de Spm mejoró la morfología de los embriones, permitiendo el desarrollo de hojas cotiledonares y superando el fenotipo deformado del meristemo apical (SAM). Además, se registró un aumento en la expresión de genes clave para la formación del SAM. En otro estudio, Regla-Márquez *et al.* (2016) detectó cadaverina (Cad) en embriones somáticos y cigóticos, una poliamina rara en plantas y que normalmente se encuentra en tejidos severamente estresados, que mostró ser más abundante en los embriones somáticos.

Con respecto a la acumulación de proteínas en los tejidos embrionarios, Lecona-Guzmán *et al.* (2012) observaron que los embriones somáticos acumulan menos proteínas que los cigóticos, lo que podría ser un factor clave en la incapacidad de los embriones somáticos para desarrollarse completamente. Investigaciones proteómicas en otras especies sugieren que las proteínas juegan un rol crucial en el desarrollo y germinación de los embriones

somáticos, sin embargo, es necesario profundizar en las investigaciones al respecto en la especie *C. chinense*.

A pesar de que el proceso de embriogénesis somática se ha estudiado a profundidad en la especie *C. chinense* aún se desconoce la clave para lograr la regeneración de embriones en plantas completas. Si bien el embrión cigótico constituye un tejido control que proporciona información acerca del proceso de embriogénesis natural, no se debe ignorar que su origen es fisiológicamente muy diferente al del embrión somático y su desarrollo está vinculado a procesos naturales que aún no han sido completamente dilucidados. Es por esto que se hace necesario el estudio de rutas alternativas de obtención de embriones *in vitro*, que puedan proveer de un tejido embrionario originado bajo condiciones de estrés ambiental impuestas, más semejantes a las que generan el estímulo embriogénico *in vitro*.

Hasta el momento, no existen reportes sobre la obtención de embriones a partir del cultivo de anteras, microsporas o óvulos de la especie, sin embargo, el resultado de estos métodos de cultivo presenta múltiples ventajas para el mejoramiento y la profundización en el estudio de procesos fisiológicos de la especie.

1.7. El cultivo de anteras y microsporas como ruta alternativa para el estudio de la embriogénesis en *Capsicum*

La vía experimental de conversión de las microsporas en embriones haploides, es una vía alternativa al desarrollo normal del polen, la cual fue descubierta hace 60 años por (Guha y Maheshwari, 1964). En esta ruta, los precursores de los granos de polen se desvían de la ruta gametofítica y son inducidos *in vitro* para formar embriones haploides o callos (Figura 1.7). Luego, las plantas pueden regenerarse directamente mediante embriogénesis haploide derivada de microsporas, o indirectamente a partir de una fase intermedia de callo haploide. Estas plantas serán DH si duplican su genoma haploide original, o simplemente haploide como la microspora original. En el último caso, se necesitan tratamientos adicionales para promover la duplicación del genoma. En ambos casos, las plantas resultantes tendrán un trasfondo genético procedente exclusivamente de la planta donante (progenitor masculino), y 100% homocigótico, por lo que se consideran líneas puras (Seguí-Simarro *et al.*, 2010). Los dobles haploides tienen numerosas ventajas, ya que además de acortar el ciclo reproductivo por fijación inmediata de la homocigosis, proporcionan una alta

eficiencia de selección, amplia variabilidad genética a través de la producción de variantes gametoclonales, y expresión más temprana de genes recesivos adecuados para la reproducción (Devaux y Pickering, 2005; Mishra *et al.*, 2016).

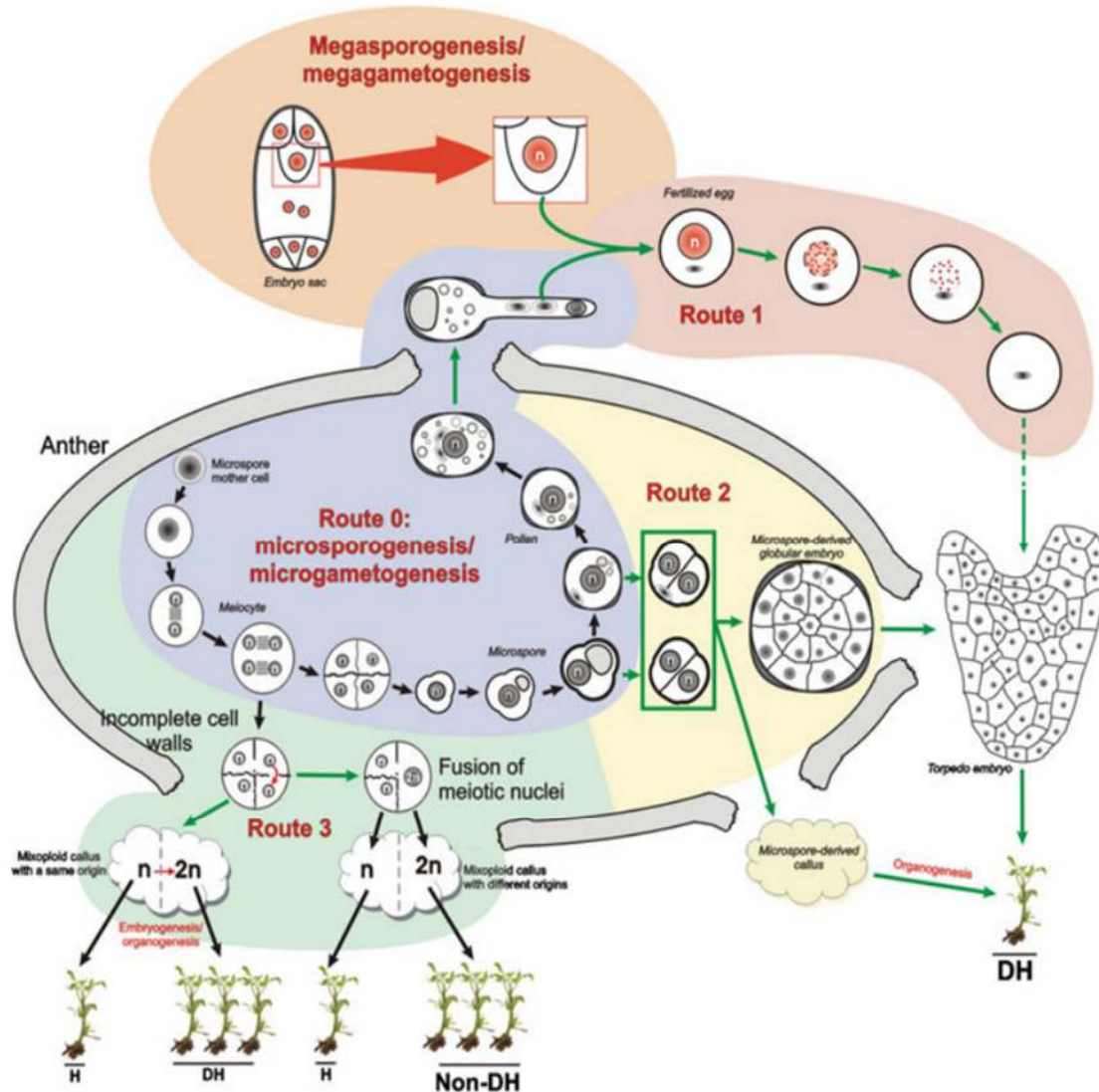


Figura 1. 7: Diferentes alternativas androgénicas para la formación de gametos masculinos. Partiendo de la microsporogénesis y la microgametogénesis (ruta 0, fondo púrpura), un individuo haploide o doble haploide derivado del precursor gametofito masculino puede originarse de tres maneras: (1) formación de gametos, fertilización del óvulo sin fusión nuclear y desmantelamiento del núcleo materno (ruta 1). (2) Desviación de la microspora en estado vacuolado o del grano de polen joven hacia la embriogénesis o, ocasionalmente, hacia la calogénesis, seguida por la organogénesis (ruta 2). (3) Desviación del meiocito hacia la calogénesis, que puede potencialmente llevar a la

formación de haploides y dobles haploides, pero también a diploides heterocigotos (ruta 3). Tomada de Segui-Simarro *et al.* (2010).

La producción *in vitro* de haploides por androgénesis se puede llevar a cabo utilizando cultivos de anteras o cultivos de microsporas aisladas. El método de cultivo de anteras es el método más ampliamente utilizado para obtener plantas haploides. Una ventaja importante de este método es la capacidad de producir un gran número de propágulos haploides, debido a la presencia de miles de microsporas en las anteras. Además, se ha demostrado que en algunas especies la presencia de las anteras en el medio provee de un ambiente más favorable para mantener la viabilidad de la microspora y para la inducción de la androgénesis (Segui-Simarro *et al.*, 2016). Sin embargo, como resultado se pueden obtener también embriones diploides derivados de embriogénesis somática directa de las células somáticas que componen las anteras. El cultivo de microsporas aisladas tiene como ventaja que, al removerse el tejido de la antera, las microsporas quedan en contacto directo con los componentes del medio de cultivo para dar lugar únicamente a embriones haploides derivados de las mismas. Este método se ha logrado establecer con éxito en algunas especies del género *Capsicum*, sin embargo, los protocolos disponibles no han sido reproducidos hasta el momento en la especie *C. chinense*.

Adicionalmente, existe la técnica de cultivo “shed-microspore”, creada por Supena *et al.*, (2006), en la que la antera es sembrada en un medio doble capa que garantiza que toda la superficie de la antera esté expuesta a los estímulos del medio de cultivo. Además, la fase líquida difunde con mayor facilidad hacia el interior de la antera llevando el estímulo apropiado a las microsporas. Este método se ha perfeccionado con el tiempo, alcanzando altos rendimientos para la producción de plantas haploides de la especie *C. annuum* (Supena *et al.*, 2021).

1.8. Factores que intervienen en la respuesta androgénica

1.8.1. Planta madre

Como ocurre con muchos otros sistemas androgénicos, la embriogénesis de microsporas en el género *Capsicum* depende en gran medida de factores críticos. El primero se relaciona con las plantas donantes, sus condiciones endógenas y exógenas, su entorno de crecimiento (fotoperíodo, temperatura, fertilización, riego, uso de pesticidas, estación) y

principalmente el genotipo, como ocurre en todas las demás especies sensibles. Diversos estudios en *C. annuum* demuestran que la influencia del genotipo en la respuesta a la embriogénesis se manifiesta incluso entre variedades de una misma especie, variando significativamente la eficiencia en la producción de embriones haploides (Ercan *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2013). La edad de la planta donante también es muy importante en la respuesta embriogénica, siendo las más idóneas para la colecta de botones entre la primera y la tercera floración (Cheng *et al.*, 2013).

1.8.2. Condiciones de cultivo

Otro factor crítico son las condiciones de cultivo, incluido el estrés utilizado para la inducción. Como ocurre con muchos otros sistemas androgénicos, los primeros protocolos utilizados para el cultivo de anteras de chile generaron callos. El protocolo propuesto por (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981) introdujo mejoras basadas principalmente en el uso de un tratamiento a alta temperatura (35 ° C) para inducir divisiones de microsporas, y dos composiciones de medio y condiciones de crecimiento diferentes para la inducción y desarrollo embrionario. A partir de entonces, este protocolo general se ha aplicado, con ligeras modificaciones, a muchas variedades de pimiento diferentes. Por ejemplo, recientemente se demostró que diferentes duraciones (4, 8, 12 y 16 días) del choque térmico de 35 ° C aplicado a diferentes híbridos F1 comerciales de las variedades Lamuyo y California de *C. annuum* tuvieron efectos significativos en la producción de embriones, pero también en la generación de callos, que aumenta con exposiciones prolongadas de una manera dependiente del genotipo (Parra- Vega *et al.*, 2013). Pocos años después de que se desarrollara el método Dumas de Vaulx, se propuso la adición al medio de cultivo de carbón activado para adsorber compuestos tóxicos derivados del metabolismo (Vagera y Havranek, 1985). Dolcet-Sanjuan *et al.* (1997) propusieron un medio bifásico que consiste en una fase de medio líquido vertida sobre una fase semisólida a base de agar con carbón activado, y agregaron una mejora significativa con la implementación de un ambiente de dióxido de carbono. Este método permitió la producción de embriones de variedades que no respondieron al método de Dumas de Vaulx, y aumentó la eficiencia de variedades con baja respuesta (Segui-Simarro *et al.*, 2016).

1.8.3. Estadio de desarrollo de la microspora

El estadio óptimo de desarrollo de la microspora es uno de los factores más importantes a tener en cuenta al aplicar el tratamiento inductivo. Las microsporas se forman a través del proceso de microsporogénesis/microgametogénesis que a partir de las células arqueosporiales de los primordios de anteras. Estas se dividen por meiosis dando lugar a microsporas haploides las cuales pasan por diferentes estadios de desarrollo hasta la formación del polen maduro (Figura 1.7). La literatura muestra ejemplos de artículos que afirman que, para ciertos genotipos, la etapa más inducible es la microspora vacuolada (González-Melendi et al., 1995), mientras que otros apoyan el polen bicelular temprano como la mejor etapa (Kim et al., 2008). En general, la noción más aceptada es que las etapas inducibles giran en torno a la primera mitosis del polen, como es habitual en otras especies. Definir una etapa como la más adecuada depende en gran medida de la precisión y corrección del método utilizado para seleccionar anteras con microsporas en la etapa correcta. La literatura al respecto busca establecer una correlación entre los marcadores morfológicos como la longitud de la yema, la longitud de la antera, la pigmentación de las anteras y la proporción cáliz / yema (Parra-Vega, et al., 2013). Este trabajo propone una combinación de la proporción cáliz / yema y la pigmentación de las anteras (una vez que la yema está abierta bajo la campana de flujo), como la forma más conveniente, rápida y precisa de identificar anteras que contienen microsporas vacuoladas y polen bicelular joven.

REFERENCIAS

- Ahn, Y. K., Tripathi, S., Kim, J. H., Cho, Y. I., Lee, H. E., Kim, D. S., ... & Yoon, M. K. (2014). Microsatellite marker information from high-throughput next-generation sequence data of *Capsicum annuum* varieties Mandarin and Blackcluster. *Scientia Horticulturae*, 170, 123-130.
- Ari, E., Bedir, H., Yildirim, S., & Yildirim, T. (2016). Androgenic responses of 64 ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to shed-microspore culture in the autumn season. *Turkish Journal of Biology*, 40(3), 706-717.
- Ari, E., Yildirim, T., Mutlu, N., Büyükalaca, S., Gökmen, Ü., & Akman, E. (2016). Comparison of different androgenesis protocols for doubled haploid plant production in ornamental pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turkish Journal of Biology*, 40(4), 944-954.
- 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 Biotechnol Rep*, 7, 277-286.
- Ayzenshtat, D., Kumar, M., Zemach, H., Forotan, Z., Faigenbom, A., & Bocobza, S. (2023). Morphological and Transcriptional Analyses of Regeneration Events in Pepper Plants (*Capsicum annuum*) Expose Patterns of Shoot Apical Meristem Formation. *J Plant Growth Regul*, 42, 7474-7487
- Badu, M., Tripathy, B., Sahu, G. S., & Jena, A. K. (2017). Role of doubled haploids in vegetable crop improvement. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 384-389.
- Baruah, J., & Lal, M. (2020). *Capsicum chinense* Jacq.: ethnobotany, bioactivity and future prospects. *Botanical leads for drug discovery*, 349-362.
- Begna, T. (2021). Combining ability and heterosis in plant improvement. *Open Journal of Plant Science*, 6(1), 108-117.
- Benson, E. E. (2000) Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. In *Vitro Cell Dev Biol – Plant*, 36, 141-148.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., & Sankhla, D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15, 536-540.

- Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, e00450.
- Chel-Guerrero, L. D., Castañeda-Corral, G., López-Castillo, M., Scampicchio, M., Morozova, K., Oney-Montalvo, J. E., ... & Rodríguez-Buenfil, I. M. (2022). In vivo anti-inflammatory effect, antioxidant activity, and polyphenolic content of extracts from *Capsicum chinense* by-products. *Molecules*, 27(4), 1323.
- Cheng, Y., Ma, R. L., Jiao, Y. S., Qiao, N., & Li, T. T. (2013). Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany*, 88, 306-309.
- Corrales-García, J., Alonso Carrillo, M. G., Santos, G. A., Sandoval, A. G., Hernández Trejo, M. M., Justo Gómez, M. D. R., ... & López, M. (2002). El sistema agroindustrial chile habanero en Yucatán. *Gómez Cruz, M. A., Schwentesius Rindermann, R y Covarrubias Gutiérrez, I (Coord). Frutas y Hortalizas, Estado Actual y Nuevas Alternativas en México*, 81-96.
- Devaux, P., & Pickering, R. (2005). Haploids in the improvement of *Poaceae*. In *Haploids in crop improvement II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 215-242.
- Doğangüzel, E., Altındağ, F. N., Yiğit, M. A., Ellialtıoğlu, Ş. Ş., & Çömlekçioğlu, N. (2021). In vitro androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) and the affecting factors on success: II. Carbohydrate source and antioxidants. *Biotech Studies*, 30(2), 92-97.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., & Huerta, A. (1997). Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122 (4), 468-475.
- Do Rego, E. R., do Rêgo, M. M., & Finger, F. L. (2016). Production and breeding of chilli peppers (*Capsicum spp.*). Springer International Publishing, Cham Switzerland. Faltan pags.
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., & Pochard, E. (1981). Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie*, 1, 859–864
- Duranova, H., Valkova, V., & Gabriny, L. (2022) Chili peppers (*Capsicum spp.*): The spice not only for cuisine purposes: An update on current knowledge. *Phytochem. Rev*, 21, 1379-1413.

- Elhiti, M., & Stasolla, C. (2022). Transduction of signals during somatic embryogenesis. *Plants*, *11*(2), 178.
- Ercan, N., Sensoy, F. A., & Sensoy, A. S. (2006). Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, *110*(1), 16-20.
- Eshed-Williams, L. (2021). Genetics of shoot meristem and shoot regeneration. *Annu Rev Genet*, *55*,661-681.
- Ezekiel, A., Abiodun, O., Funmilayo, A. D., Tolulope, I. O., Oluwatosin, O., & Ogola-Emma, E. (2023). Identification of ascorbic acid and phytochemical profiles of Scotch Bonnet pepper (*Capsicum chinense*) using High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detector (HPLC-UV). *Journal of Applied and Natural Science*, *15*(4), 1475-1483.
- Gaba, Y., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2021). Raising climate-resilient crops: journey from conventional breeding to new breeding approaches. *Current Genomics*, *22*(6), 450.
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, *204*(4957), 497-497.
- González-Melendi, P., Testillano, P. S., Ahmadian, P., Fadón, B., Vicente, O., & Risueño, M. C. (1995). In situ characterization of the late vacuolate microspore as a convenient stage to induce embryogenesis in *Capsicum*. *Protoplasma*, *187*, 60-71.
- Hale, B., Ferrie, A. M., Chellamma, S., Samuel, J. P., & Phillips, G. C. (2022). Androgenesis-based doubled haploidy: Past, present, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 751230.
- Haque, S. M., & Ghosh, B. (2018) An improved micropropagation protocol for the recalcitrant plant *Capsicum*—a study with ten cultivars of *Capsicum* spp. (*C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens*) collected from diverse geographical regions of India and Mexico. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*, *93*,91-99
- Heidmann, I., De Lange, B., Lambalk, J., Angenent, G. C., & Boutilier, K. (2011). Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Reports*, *30*, 1107-1115.
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., ... & Boutilier, K. (2017). The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, *175*(2), 848-857.

-
- Humbal, A., & Pathak, B. (2023) Harnessing nanoparticle-mediated elicitation in plant tissue culture: a promising approach for secondary metabolite production. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 155,385-402.
- 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, 191-198.
- Jha, K., Choudhary, P. K., & Agarwal, A. (2021). Doubled haploid production in *Capsicum annuum* L. using anther culture: a review. *Plant Archives*, 21(1), 168-173.
- Kim M, Jang I C, Kim J A, Park E J, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep.*, 27,425-434
- Labroo, M. R., Studer, A. J., & Rutkoski, J. E. (2021). Heterosis and hybrid crop breeding: a multidisciplinary review. *Frontiers in Genetics*, 12, 643761.
- Lal, B., Kamboj, A., Singh, V. P., Singh, B. P., Singh, A. P., & Mishra, S. K. (2023) Phytochemical and Biological Properties of Domesticated *Capsicum* Species: A Review. *Int. J. Plant Sci.*, 35, 427-437
- Latournerie, L., Chávez, J. L., Pérez, M., Hernández, C. F., Martínez, R., Arias, L. M., & Castañón, G. (2001). Exploración de la diversidad morfológica de chiles regionales en Yaxcabá, Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana*, 41-47.
- Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., ... & Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97, 285-293.
- Lantos, C., Gémes Juhász, A., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., & Pauk, J. (2012). Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnology Reports*, 6, 123-132.
- Lardon, R., & Geelen, D. (2020). Natural variation in plant pluripotency and regeneration. *Plants*, 9(10), 1261.
- 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.
-

- 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*, 41,1645-1650
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. *Plant Cell Culture Protocols*, 3-13.
- Lozada, D. N., Bosland, P. W., Barchenger, D. W., Haghshenas-Jaryani, M., Sanogo, S., & Walker, S. (2022). Chile pepper (*Capsicum*) breeding and improvement in the “multi-omics” era. *Frontiers in Plant Science*, 13, 879182.
- Martínez-López, M., García-Pérez, A., Gimeno-Páez, E., Prohens, J., Vilanova, S., & García-Forteza, E. (2021). Screening of suitable plant regeneration protocols for several capsicum spp. Through direct organogenesis. *Horticulturae*, 7(9), 261.
- Mishra, R., & Rao, G. J. N. (2016). In-vitro androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. *Rice Science*, 23(2), 57-68.
- Montalvo-Peniche, M. D. C., Iglesias-Andreu, L. G., Mijangos-Cortés, J. O., Nahuat-Dzib, S. L., Barahona-Pérez, F., Canto-Flick, A., & Santana-Buzzy, N. (2007). *In vitro* germplasm conservation of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 42, 1247-1252
- Nguyen, V., & Gutzat, R. (2022). Epigenetic regulation in the shoot apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 69, 102267.
- Nowaczyk, P., Kisiała, A., & Olszewska, D. (2006). Induced androgenesis of *Capsicum frutescens* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28, 35-39.
- Oney-Montalvo, J. E., López-Salas, D., Ramírez-Rivera, E., Ramírez-Sucre, M. O., & Rodríguez-Buenfil, I. M. (2022). Evaluation of the soil type effect on the volatile compounds in the habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Horticulturae*, 8(5), 428.
- Ossai, C. O., Balogun, M. O., & Maroya, N. G. (2024). Status and prospects of yam somatic embryogenesis: a pathway for biotechnology applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-11.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013). Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and

- growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112, 353-360.
- Patel, P., Sarswat, S. K., & Modi, A. (2022) Strategies to overcome explant recalcitrance under *in vitro* conditions. Academic Press. *In Advances in Plant Tissue Culture*, 283-294.
- Peña-Yam, L. P., Muñoz-Ramírez, L. S., Avilés-Viñas, S. A., Canto-Flick, A., Guzmán-Antonio, A., & Santana-Buzzy, N. (2019). Floral biology studies in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) to implement in a crossbreeding program. *Agriculture*, 9(12), 249.
- Peña-Yam, L. P., Muñoz-Ramírez, L. S., Avilés-Viñas, S. A., Canto-Flick, A., Pérez-Pastrana, J., Guzmán-Antonio, A., ... & Mijangos-Cortés, J. O. (2019). Analysis of genetic parameters of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) in the Yucatan, Mexico. *HortScience*, 54(3), 429-433.
- Pérez-Pastrana, J., Islas-Flores, I., Bárány, I., Álvarez-López, D., Canto-Flick, A., Canto-Canché, B., & Santana-Buzzy, N. (2018). Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-esterification. *Journal of Plant Physiology*, 230, 1-12.
- Perez-Pastrana, J., Testillano, P. S., Barany, I., Canto-Flick, A., Alvarez-Lopez, D., Pijeira-Fernandez, G., ... & Santana-Buzzy, N. (2021). Endogenous auxin accumulation/localization during zygotic and somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. *Journal of Plant Physiology*, 258, 153333.
- Phillips, G. C., Hubstenberger, J. F. (1985). Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 4, 261-269.
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 242-257.
- Pijeira-Fernández, G. (2020) Análisis de la expresión de genes involucrados en la conversión en planta de embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq. (Tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida, Yucatán. <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/2954>
- Pijeira-Fernández, G., & Santana-Buzzy, N. (2024). Capsicum recalcitrance: physiological and molecular challenges of pepper tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-17.

- Pinar, H., Mutlu, N., Yildiz, S., Simsek, D., & Shams, M. (2020). Transferring the cultured anther to a medium without activated charcoal overcomes the recalcitrance in pepper genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 101(2), 151-156.
- 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 Tiss Organ Cult.*, 124,253-264
- 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. *J Genet*, 98,1-8
- Ribeiro, C., Reifschneider, F., Carvalho, S., Bianchetti, L., & Buso, G. (2020). Embrapa's Capsicum Breeding Program-looking back... into the future. *Crop Breed Genet Genom.* 2(1),e200001. <https://doi.org/10.20900/cbqg20200001>
- Rodríguez-Llanes, Y., Pérez-Brito, D., Magaña-Álvarez, A., Cortés-Velázquez, A., Guzmán-Antonio, A., Mijangos-Cortés, J. O., ... & Santana-Buzzy, N. (2023). Combinatory ability and heterosis for quantitative traits related to productivity and the pungency in F1 hybrids of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Plant Breeding*, 142(6), 809-820.
- Salehian, H., Shahnazi, S., & Nazari, M. (2023). Production of doubled haploid plants in cucumber (*Cucumis sativus* L.) via parthenogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 59(4), 467-474.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias-Andreu, L. G., Montalvo-Peniche, M. D. C., López-Puc, G., & Barahona-Pérez, F. (2006). Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience*, 41(2), 405-409.
- Santana-Buzzy, N., López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Balam-Uc, E., Avilés-Viñas, S., &... Mijangos-Cortés, J.O. (2009). Ontogenesis of the somatic embryogenesis of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 44,113-118
- 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.
- Seguí-Simarro, J. M. (2010). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76, 377-404.

- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., & González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30(5), 765-778.
- Seguí-Simarro, J. M. (2016). Androgenesis in Solanaceae. *In vitro embryogenesis in higher plants*, 209-244.
- Seguí-Simarro, J. M., Jacquier, N. M., & Widiez, T. (2021). Overview of *in vitro* and *in vivo* doubled haploid technologies. *Doubled haploid technology: volume 1: General Topics, Alliaceae, cereals*, 3-22.
- Shafiq, M., Ashraf, T., Mushtaq, S., Anjum, N., Asim, M., Feroze, M. A., ... & Aziz, M. (2022). Response of Different (*Capsicum annuum* L) Genotypes for Callus Induction, Plant Regeneration and Plant Transformation. *Sarhad Journal of Agriculture*, 38(4), 1332-1343.
- Shu, H., Zhang, Y., He, C., Altaf, M. A., Hao, Y., Liao, D., ... & Wang, Z. (2022). Establishment of *in vitro* regeneration system and molecular analysis of early development of somatic callus in *Capsicum chinense* and *Capsicum baccatum*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1025497.
- Solís-Ramos, L. Y., González-Estrada, T., Nahuath-Dzib, S., Zapata-Rodriguez, L. C., & Castaño, E. (2009). Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 96, 279-287.
- 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.
- Spinelli, S. V., Martin, A. P., Viola, I. L., Gonzalez, D. H., & Palatnik, J. F. (2011). A mechanistic link between STM and CUC1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiology*, 156(4), 1894-1904.
- Steinitz, B., Küsek, M., Tabib, Y., Paran, I., & Zelcer, A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant*, 39,296-30.
- Supena, E. D. J., Muswita, W., Suharsono, S., Custers, J. B. M. (2006). Evaluation of crucial factors for implementing the shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Sci Hortic.*, 107,226-232

- Supena, I., Darmuki, A., & Hariyadi, A. (2021). The Influence of 4C (Constructive, Critical, Creativity, Collaborative) Learning Model on Students' Learning Outcomes. *International Journal of Instruction*, 14(3), 873-892.
- Testillano, P. S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 70(11), 2965-2978.
- Tomiczak, K., Mięka, A., Niedziela, A., Wójcik-Lewandowska, A., Domżańska, L., & Rybczyński, J. J. (2019). Somatic embryogenesis in the family Gentianaceae and its biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 10, 415990.
- Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004). Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2275-2280.
- Vagera, J., & Havranek, P. (1985). *In vitro* induction of androgenesis in *Capsicum annuum* L. and its genetic aspects. *Biologia plantarum*, 27(1), 10-21.
- 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.). *Afr J Biotechnol.*, 14,569-581
- Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Kalyan, S. S., & Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *J Genet Eng Biotechnol.*, 14,55-60
- Villa-Rivera, M. G., & Ochoa-Alejo, N. (2020). Chili pepper carotenoids: Nutraceutical properties and mechanisms of action. *Molecules*, 25(23), 5573
- Vogel, J. P., Woeste, K. E., Theologis, A., & Kieber, J. J. (1998). Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS 5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4766-4771.
- Yan, R., Sun, Y., & Sun, H. (2020). Current status and future perspectives of somatic embryogenesis in *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(2), 229-240.

JUSTIFICACIÓN

La androgénesis es un proceso morfogénico con múltiples ventajas biotecnológicas y para el mejoramiento. Se conoce que, en el género *Capsicum*, es más eficiente que la embriogénesis somática en cuanto la obtención de embriones con morfología normal. Se han descrito múltiples protocolos con alta eficiencia en la obtención de plantas haploides/dobles haploides en algunas especies de género. Sin embargo, no se ha establecido un protocolo en *Capsicum chinense* Jacq. para la regeneración de embriones a partir de las microsporas de esta especie. La mayoría de los estudios refieren que los factores determinantes de la respuesta embriogénica en la microspora son su estadio de desarrollo, el genotipo de la planta madre y las condiciones de cultivo. El desarrollo de protocolos basado en la optimización de los factores clave para la androgénesis, sentará las bases para la creación de una metodología eficiente en la obtención *in vitro* de plantas haploides/dobles haploides de *Capsicum chinense* Jacq.

HIPÓTESIS

La optimización de los factores clave en el proceso de androgénesis, como son la selección del estadio de desarrollo adecuado de la microspora y las condiciones de cultivo, permitirán establecer un protocolo eficiente para la inducción de androgénesis en chile habanero *in vitro*

OBJETIVO GENERAL

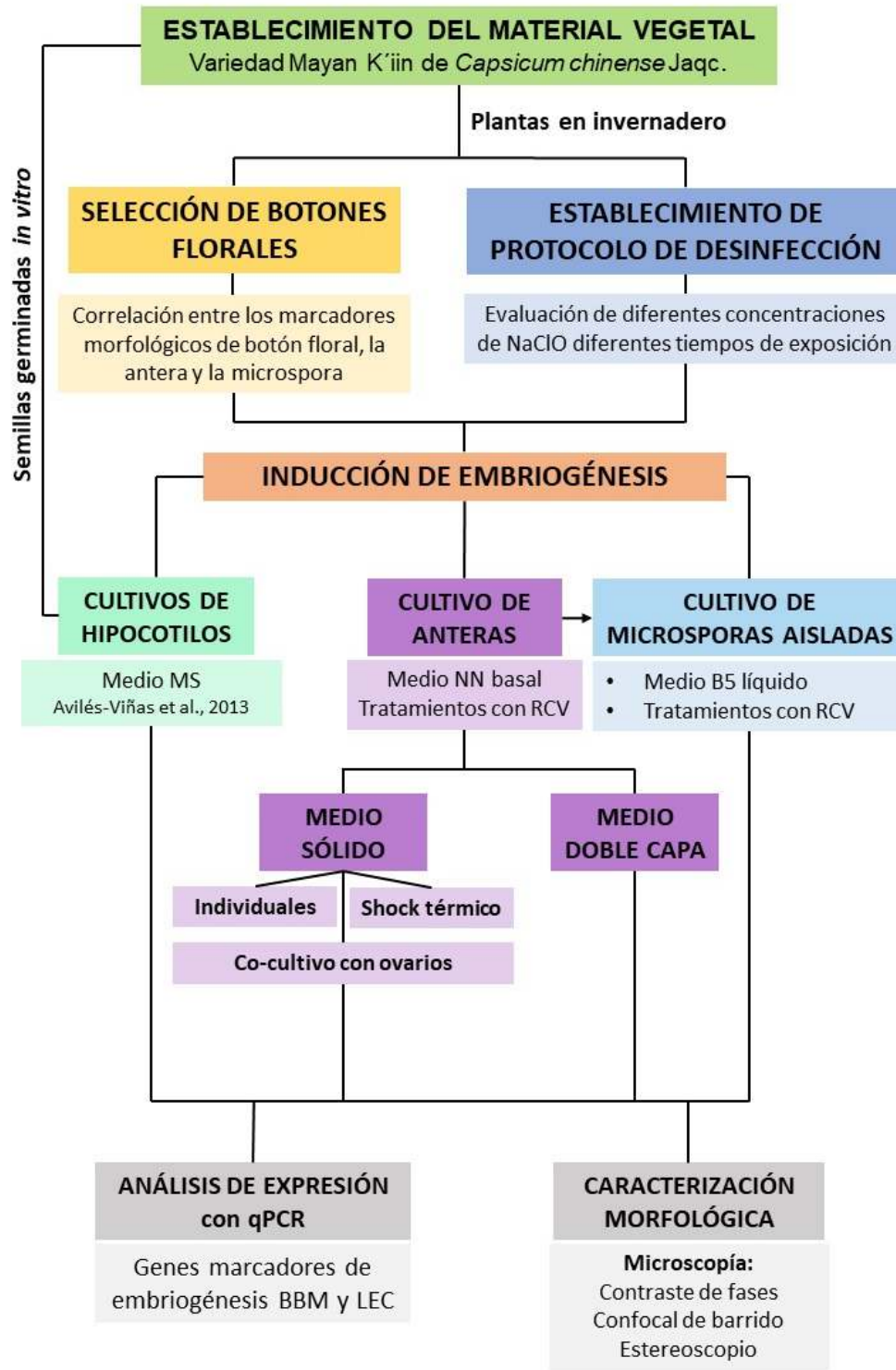
Establecer un sistema de embriogénesis a partir del cultivo de anteras y microsporas de *Capsicum chinense* Jacq.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la relación entre las fases de la microsporogénesis y los marcadores morfológicos del botón floral y la antera de *C. chinense* var. Mayan K'iiin.

2. Establecer un protocolo eficiente para la desinfección de los botones florales provenientes del invernadero con altos porcentajes de viabilidad de las anteras y microsporas.
3. Evaluar el efecto de diferentes tratamientos de inducción en la respuesta embriogénica de anteras y microsporas de *C. chinense* var. Mayan K'iiin.
4. Evaluar el efecto de diferentes métodos de cultivo de anteras y microsporas en la respuesta embriogénica de *C. chinense* var. Mayan K'iiin.
5. Analizar la expresión de los genes marcadores de embriogénesis *BBM* y *LEC* en las estructuras morfogénicas obtenidas a partir del cultivo de anteras y microsporas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

ESTABLECIMIENTO Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL DONANTE PARA EL CULTIVO DE ANTERAS Y MICROSPORAS DE *C. chinense*

2.1 INTRODUCCIÓN

Entre los múltiples factores determinantes de la calidad de la respuesta morfogénica *in vitro*, se destacan la edad y estadio fisiológico de la planta madre. En el caso específico de las plantas donantes de botones florales para el cultivo de anteras y microsporas, la edad y la condición fisiológica están estrechamente ligadas al desarrollo reproductivo, la viabilidad y la capacidad de respuesta de los explantes en cuestión (Ramlal *et al.*, 2024). En *Capsicum*, se ha comprobado que las fluctuaciones de temperatura en el ciclo de cultivo y la edad de las plantas donantes, puede afectar positiva o negativamente la respuesta androgénica de un genotipo específico (Buyukalaca *et al.*, 2004; Ercan *et al.*, 2006; Grozeva *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran la importancia de optimizar las condiciones de cultivo, así como de delimitar el período útil de vida de la planta como donante de explante. Sin embargo, las circunstancias óptimas de cultivo varían de acuerdo con el genotipo en cuestión, por lo que es necesario ajustar estas condiciones a las especies de cada sistema de estudio en particular (Ercan *et al.*, 2006). El cultivo en condiciones controladas de temperatura, fotoperíodo y humedad es una alternativa factible para garantizar las condiciones óptimas de desarrollo de las plantas madre, que a la vez contribuye a la obtención de un material vegetal de mayor asepsia.

La asepsia es un aspecto fundamental en el cultivo *in vitro* debido a que garantiza la viabilidad de los tejidos, los cuales deben desarrollarse en condiciones óptimas, sin la interferencia de microorganismos competidores. Para garantizar la asepsia a lo largo de todas las fases de un cultivo *in vitro*, es necesario el previo establecimiento de un protocolo de desinfección eficiente, que no afecte la viabilidad del tejido a cultivar. La selección del agente químico desinfectante, las concentraciones que se utilizarán y los tiempos de exposición dependen de las condiciones de cultivo de la planta madre, la naturaleza del explante y el objetivo que se persigue con el establecimiento del cultivo (Teixeira da Silva *et al.*, 2016). Para el cultivo de anteras y microsporas es necesario garantizar el máximo porcentaje de asepsia del material vegetal, ya que este conlleva pasos de manipulación

posteriores a la desinfección, los cuales son muy propensos a extender la contaminación en las múltiples réplicas de cada tratamiento. También se debe tener en cuenta el porcentaje de viabilidad del explante, ya que de esto dependerá su capacidad de responder a los tratamientos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Establecimiento del material vegetal en condiciones de invernadero

Para el presente trabajo se sembraron semillas de la variedad Mayan K'íin, de la colección de germoplasma de *Capsicum chinense* Jacq. del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY). Previo a la siembra se pesó 1g de semillas, las cuales fueron sometidas a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, enjuagadas 3 veces con agua destilada estéril y sumergidas en una solución de Nitrato de Potasio (KNO_3) al 1 % durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se sembraron en charolas de unicele de 200 cavidades, preparadas con sustrato Sunshine humedecido y se cultivaron en condiciones controladas de invernadero. Las plántulas germinadas se fertilizaron cada 7 días con una mezcla de los fertilizantes Triple18 (3g/L) y Bactiva (0.5 g/L). Transcurridos 60 días las plantas se transfirieron a bolsas con tierra, Sunshine y Agrolita en una proporción de 2:1:1 y un régimen de fertilización cada 14 días con los fertilizantes Akafoz (3g/L) y Triple18 (3 g/L). El régimen de riego fue de 1L de agua por planta cada 3 días. Este procesode siembra se repitió en los meses de marzo, junio, septiembre y diciembre.

2.2.2 Establecimiento del protocolo de desinfección

Para el establecimiento de un protocolo eficiente de desinfección utilizando hipoclorito de sodio (NaClO), se diseñó un experimento en dos fases: la primera para evaluar diferentes concentraciones del agente desinfectante y la segunda para evaluar los tiempos de exposición al mismo (Tabla 2).

Tabla 2.1 Fases para el establecimiento del protocolo de desinfección

Fase 1: Concentración de NaClO	Fase 2: Tiempos de exposición
1.25%	15 min
2.5%	20 min

5%	25 min
----	--------

Para cada prueba se utilizaron 20 botones florales del mismo tamaño, los cuales fueron rociados con etanol al 70% y transcurridos 3 minutos fueron lavados con agua bidestilada estéril (H₂O (b)). En la Fase 1 del protocolo, estos botones se transfirieron a frascos con 100 mL de las diferentes soluciones de NaClO y Extrán al 10% durante 20 minutos. Para la Fase 2 del experimento, los botones se transfirieron a soluciones de igual concentración de hipoclorito, las cuales fueron agitadas durante 10, 15 y 20 minutos cada una. Para ambas fases se realizaron los mismos pasos posteriores. Los botones fueron lavados tres veces consecutivas con H₂O (b) y se procedió a la extracción de las anteras de forma aséptica. Las anteras se extrajeron utilizando pinzas de relojero, sujetando firmemente la base del cáliz dejando al descubierto el gineceo. Éstas se tomaron cuidadosamente para evitar fragmentar las tecas y se sembraron a una densidad de 25 anteras por placa. Para la siembra de anteras de utilizaron cajas Petri con 20 mL de medio de cultivo NN (Nitsch y Nitsch, 1969) suplementado con 3% de Sacarosa. Las muestras se incubaron en oscuridad a 25 °C y se observaron al estereoscopio a los 3, 7 y 14 días de cultivo, para detectar la presencia de contaminantes fúngicos o bacterianos. A los 7 días se incluyó el porcentaje de anteras con respuesta al cultivo de tejidos como criterio para la determinación del porcentaje de viabilidad. La eficiencia de los tratamientos se evaluó a través del cálculo de los porcentajes de contaminación y viabilidad de las anteras, de acuerdo con las Ecuaciones 1 y 2.

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de contaminación del cultivo

$$\% \text{ Contaminación} = \frac{\text{No. de anteras contaminadas}}{\text{Total de anteras sembradas}} \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de viabilidad de las anteras

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No. de anteras responsivas}}{\text{Total de anteras sembradas}} \times 100$$

2.2.3 Análisis estadístico

Se hizo un análisis estadístico para comparar tratamientos, basado en los porcentajes de contaminación y viabilidad. Se comprobaron los supuestos de normalidad, homogeneidad de varianza e independencia de datos y se realizó un ANOVA de una vía, seguidas de una prueba de Tukey con un $\alpha=0.05$ para detectar diferencias significativas entre las medias de cada tratamiento. Se seleccionó el mejor tratamiento en base a los menores niveles de contaminación y mayores niveles de viabilidad.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Establecimiento del material vegetal en condiciones de invernadero

El establecimiento del material vegetal donante de explante se llevó a cabo en los invernaderos de las instalaciones del CICY. En la Figura 2.1 se aprecian algunos de los pasos del proceso, así como algunas de las dificultades que se presentaron durante el mismo. Las semillas de la variedad Mayan K'iin presentaron un porcentaje de germinación en las charolas que osciló entre el 60 y el 70% en cada uno de los períodos de siembra escalonada (Figura 2.1 A). Esto afectó la disponibilidad de plantas donantes de botones florales, por lo que en períodos de siembra posteriores se sembró mayor cantidad de semillas (1.5 g) para garantizar la cantidad de material vegetal requerida. Adicionalmente, se llevó a cabo una siembra escalonada, en la que se repitió todo el proceso de establecimiento cada tercer mes para asegurar que las plantas donantes permanecieran en un estadio fisiológico adecuado (Figura 2.1 B, C). Durante los períodos de siembra comprendidos entre marzo y agosto, se observó un aumento en la frecuencia de aparición de síntomas de estrés abiótico debido a las altas temperaturas registradas, las cuales oscilaron entre los entre 35°C y 42°C. Entre los síntomas observados con mayor frecuencia se destacan la clorosis y la marchitez de las hojas (Figura 2.1 D), así como el aborto floral y la defoliación (Figura 2.1 E). Además, se pudo apreciar un retraso en el desarrollo normal de la planta y en la aparición de los ciclos de floración. Durante este período también se observó una mayor incidencia de plagas, que fueron identificadas como mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y el ácaro conocido como araña roja (*Tetranychus urticae*). Los síntomas de estrés biótico ocasionados por estas plagas (Figura 2.1 F, G) provocaron pérdidas de hasta el 100% de las plantas establecidas en el período de mayo a agosto de 2022. Las plantas afectadas se retiraron inmediatamente del invernadero una vez detectada la enfermedad. Estas condiciones conllevaron a una intensificación del manejo agronómico,

incluyendo ajustes en el régimen de riego e incrementos en la frecuencia de fertilización y fumigación. Las especificidades del manejo del cultivo implementado en cada etapa se encuentran descritas en la Tabla 2.1.

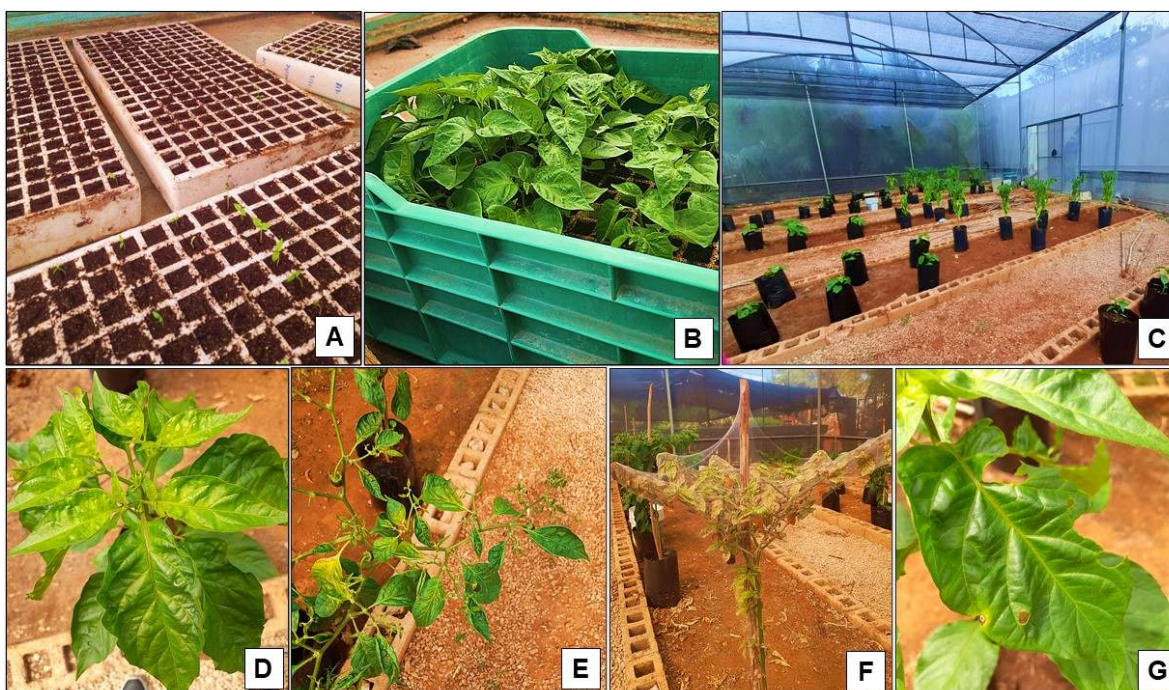


Figure 2. 1: Establecimiento de la variedad Mayan K'iin (*C. chinense*) como material vegetal donante de explante en condiciones de invernadero. A: Germinación de semillas en charolas de unicel con sustrato Sunshine. B: Plántulas germinadas en estadio óptimo para el trasplante a bolsas. C: Establecimiento escalonado del material vegetal en el invernadero. D: Planta con hojas cloróticas y pérdida de turgencia. E: Planta con síntomas de defoliación y aborto floral. F: Planta infectada por el ácaro araña roja (*T. urticae*). G: Hoja con signos de daño causado por plagas.

Tabla 2.1: Manejo agronómico aplicado en los períodos de siembra correspondientes.

Manejo agronómico	Períodos de siembra	
	Septiembre-Febrero	Marzo-Agosto
Cantidad de semillas sembradas	1.0 g	1.5 g
Régimen de riego (fase adulta)	1L de agua cada 2 días	1L de agua todos los días
Régimen de fertilización	Akafoz (3 g/L) y Triple18 (3 g/L) cada 14 días	Akafoz (3 g/L) y Triple18 (3 g/L) cada 7 días
Control de plagas	Fumigación con Imidacloprid al 20% cada 14 días	

Los ajustes realizados al manejo agronómico en los meses de calor fueron efectivos en mitigar los problemas del cultivo. Se seleccionaron como plantas donantes de explantes

aquellas con un estadio fisiológico óptimo, que hubiesen transitado por todas las fases de su desarrollo con normalidad y que no presentaran signos ni síntomas de enfermedad provocada por factores bióticos o abióticos. Cada generación de plantas establecida se mantuvo en el invernadero hasta su cuarta floración, tiempo después del cual fueron sustituidas por la siguiente generación.

2.3.2 Establecimiento de un protocolo de desinfección para los botones florales

En el presente estudio se estableció un protocolo de desinfección para botones florales de la variedad Mayan K'iiin (*C. chinense*) provenientes plantas cultivadas en invernadero, con el fin de extraer asépticamente las anteras y microsporas a cultivar. Se establecieron dos fases del experimento para evaluar diferentes concentraciones y tiempos de exposición al NaClO. La Tabla 2.2 muestra los datos correspondientes al porcentaje de contaminación y al porcentaje de viabilidad de las anteras correspondientes a los tratamientos evaluados en cada fase

Tabla 2.2. Efecto de diferentes tratamientos de desinfección en el porcentaje de contaminación y de viabilidad de las anteras

FASE 1	Concentración de NaClO (%)	Porcentaje de contaminación (%)	Viabilidad de las anteras (%)
	5	8 c	-
	2.5	51 b	-
	1.25	89 a	-
FASE 2	Tiempo de exposición (minutos)	Porcentaje de contaminación (%)	Viabilidad de las anteras (%)
	10	15 a	75 a
	15	11 a	60 b
	20	3 b	49 c

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo con la prueba de Tuckey $p \leq 0.05$

Como resultado de la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio en la desinfección de botones florales (Fase 1), se observó que al sumergir los botones durante 20 minutos en la solución desinfectante al 5%, se contaminó el 8% de las anteras sembradas. En contraste, los tratamientos de concentración 2.5% y 1.25% tuvieron porcentajes de contaminación superiores al 50% (Tabla 2.2). En la Fase 2 de evaluación se comprobó que el tiempo óptimo de exposición al agente desinfectante es de 10 minutos, con un porcentaje de contaminación de 15% y una viabilidad de las anteras del 75%. Los tiempos de exposición de 15 y 20 minutos, aunque tuvieron porcentajes de contaminación de 11% y 3% respectivamente, afectaron significativamente la viabilidad de las anteras (Tabla 5).

Teniendo en cuenta estos resultados, se estableció un protocolo de desinfección con un paso previo en el cual los botones se sumergieron en etanol al 70% por 3 minutos y se enjuagaron con agua doble destilada estéril. Este paso se realiza con la finalidad de reducir al máximo la carga de contaminantes provenientes de las condiciones de cultivo de las plantas madre en el invernadero. A continuación, los botones se transfieren a 100 mL de solución de NaClO al 5%, que contiene 5 mL de Extrán® durante 10 minutos. Posteriormente se hacen tres lavados consecutivos con agua doble destilada estéril. Los botones desinfectados son conservados en cajas Petri estériles y se preservan en refrigeración durante el cultivo.

2.4. DISCUSIÓN

El establecimiento de material vegetal es un paso crítico en el cultivo de tejidos, en el que se debe garantizar que la planta donante de explante se encuentre en condiciones fisiológicas óptimas. Las células en óptimo estado tienen mayor capacidad de división y diferenciación, así como un balance hormonal adecuado, lo cual es determinante para su capacidad de respuesta a los estímulos del medio de cultivo (Shahzad *et al.*, 2017; Bibadi *et al.*, 2020). Estudios previos en *Capsicum* han demostrado que las plantas donantes crecidas en condiciones de invernadero requieren de cuidados especiales cuando su finalidad es proveer explantes para el establecimiento de androgénesis (Pourmohammad *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que el estrés por calor, debido a temperaturas que oscilan entre los 35°C y 42°C, provoca afectaciones en una gran variedad de procesos fisiológicos cíclicos en la planta, siendo la floración uno de los más sensibles a este tipo de estrés (Karwa *et al.*, 2020;

Chaudhary *et al.*, 2022). Los síntomas más frecuentes observados en este estudio asociados a las elevadas temperaturas correspondientes al período de siembra de marzo agosto, incluyeron clorosis, marchitez de las hojas, retraso en la floración, aborto floral y defoliación. Estas observaciones coinciden con investigaciones que reportan que temperaturas superiores a 35°C pueden inducir estrés térmico en *Capsicum* spp., afectando negativamente el desarrollo vegetal y la capacidad reproductiva de las plantas (Erockson, 1999; Upreti *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Reyes-Castro *et al.*, 2024).

El estrés biótico también es un factor que altera considerablemente el equilibrio fisiológico de las plantas (Parisi *et al.*, 2020). La identificación y manejo inmediato de las plantas afectadas mediante su remoción del invernadero es una práctica recomendada para prevenir la propagación de infecciones y mantener la sanidad del cultivo (Dekebo *et al.*, 2022). La intensificación del manejo agronómico, que incluyó ajustes en el régimen de riego y un aumento en la frecuencia de fertilización y fumigación, fue necesaria para mitigar los efectos adversos de los estreses abiótico y biótico. La implementación de estas medidas permitió estabilizar las condiciones de cultivo y mejorar la resiliencia de las plantas donantes frente a las adversidades ambientales y biológicas. Este enfoque es consistente con las prácticas de manejo integrado de plagas (MIP), que combinan estrategias culturales, químicas y biológicas para optimizar la salud y productividad de los cultivos (Shivalingaswamy *et al.*, 2022).

Por otra parte, el establecimiento de un cultivo de tejidos vegetales depende críticamente de protocolos de desinfección eficientes que garanticen la asepsia del material vegetal, especialmente cuando se trabaja con cultivos de anteras o microsporas aisladas en la inducción de androgénesis. La contaminación microbiana puede comprometer no solo la viabilidad del cultivo, sino también la integridad del proceso, afectando la capacidad de los tejidos para responder a los estímulos morfogénicos y desarrollarse adecuadamente (Teixeira da Silva *et al.*, 2016; Calan-Janeiro *et al.*, 2019). En el caso de la androgénesis, que involucra manipulaciones frecuentes y sensibles, como el aislamiento de microsporas, el riesgo de contaminación se incrementa debido a la mayor exposición del tejido vegetal. Esto es particularmente relevante ya que la presencia de microorganismos puede conllevar a pérdida de viabilidad en el tejido cultivado. Por lo tanto, el uso de agentes desinfectantes adecuados, como el hipoclorito de sodio o el etanol, en concentraciones óptimas y tiempos

de exposición específicos, resulta fundamental para asegurar la asepsia durante el establecimiento y desarrollo de estos cultivos especializados (Uribe *et al.*, 2008).

En resumen, el éxito en el establecimiento de cultivos de tejidos de *Capsicum chinense* depende de una gestión agronómica adaptativa que optimice las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, enfrentando efectivamente los factores de estrés abiótico y biótico. La implementación de prácticas como la siembra escalonada y el ajuste en riego y fertilización, permite disponer de material vegetal con la calidad requerida para la obtención de haploides y dobles haploides. Además, la eficiencia de protocolos de desinfección en la androgénesis, tanto en cultivos de anteras como de microsporas aisladas, es crucial para garantizar la asepsia y la viabilidad de los tejidos, reduciendo la interferencia de contaminantes y mejorando los resultados en los procesos de regeneración y diferenciación celular. Estos factores son esenciales para fortalecer los programas de mejoramiento genético en *Capsicum chinense*.

2.5. REFERENCIAS

- Bidabadi, S. S., & Jain, S. M. (2020). Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants*, 9(6), 702.
- Buyukalaca, S. A. A. D. E. T., Kilic, N., Comlekcioglu, N., Abak, K., & Ekbic, E. (2004). Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *European Journal of Horticultural Science*, 69(5), 206-209.
- Calana-Janeiro, V. M., Izquierdo-Oviedo, H., Gonzalez-Cepero, M. C., Rodriguez-Llanes, Y., Rodriguez-Hernandez, M., & Horta-Fernandez, D. (2019). Disinfection of pepper seeds (*Capsicum annuum* L.) cultivar 'YAMIL' for *in vitro* implantation. *Cultivos Tropicales*, 40(3), NA.
- Chaudhary, S., Devi, P., HanumanthaRao, B., Jha, U. C., Sharma, K. D., Prasad, P. V., ... & Nayyar, H. (2022). Physiological and molecular approaches for developing thermotolerance in vegetable crops: a growth, yield and sustenance perspective. *Frontiers in Plant Science*, 13, 878498.
- Dekebo, A. (2023). Major Pests and Pest Management Strategies in the Sweet Pepper (*Capsicum annuum*). *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.106386

- Ercan, N., Sensoy, F. A., & Sensoy, A. S. (2006). Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Scientia horticultrae*, 110(1), 16-20.
- Erickson, A. N. (1999). The physiological and morphological consequences of high temperature on flower development and reproduction of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). University of Minnesota ProQuest Dissertations & Theses, 9934951.
- Grozeva, S., Todorova, V., Cholakov, T., & Rodeva, V. (2013). Effect of temperature and growth period of donor plants on pepper anther culture. En *Proceedings of the Fourth International Conference, Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences*, 1, 60-64.
- Karwa, S., Bahuguna, R. N., Chaturvedi, A. K., Maurya, S., Arya, S. S., Chinnusamy, V., & Pal, M. (2020). Phenotyping and characterization of heat stress tolerance at reproductive stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-16.
- Li, T., Xu, X., Li, Y., Wang, H., Li, Z., & Li, Z. (2015). Comparative transcriptome analysis reveals differential transcription in heat-susceptible and heat-tolerant pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars under heat stress. *Journal of plant biology*, 58, 411-424.
- Ramlal, A., Mehta, S., Nautiyal, A., Baweja, P., Shivam, Sharma, D., Raju, D., Vijayan, R., Lal, S. K., Subramaniam, S. & Rajendran, A. (2024). Androgenesis in Soybean (*Glycine max* L.): A critical revisit. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 60(1), 1-15.
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128, 487-508.
- Parisi, M., Alioto, D., & Tripodi, P. (2020). Overview of biotic stresses in pepper (*Capsicum* spp.): Sources of genetic resistance, molecular breeding and genomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2587.
- Pourmohammad, A., Moieni, A., Dehghani, H., & Rashidi Monfared, S. (2021). Field-grown donor plants and arabinogalactan proteins improve microspore embryogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57, 510-518.
- Reyes-Castro, R., Núñez-Palenius, H. G., Valiente-Banuet, J. I., Sosa-Morales, M. E., Orosco-Alcalá, B. E., Guzmán-Mendoza, R., ... & Costilla-Salazar, R. (2024). Organ Abscission in Plants: With Special Emphasis on Bell Pepper. *Phyton* (0031-9457), 93(7).

- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R., ... & Ahmad, Z. (2017). Historical perspective and basic principles of plant tissue culture. *Plant biotechnology: principles and applications*, 1-36. DOI 10.1007/978-981-10-2961-5_1
- Shivalingaswamy, T. M., Udayakumar, A., & Mani, M. (2022). Pests and their management in chillies and bell pepper. *Trends in Horticultural Entomology*, 971-982.
- Teixeira da Silva, J. A., Kulus, D., Zhang, X., Zeng, S., Ma, G., & Piqueras, A. (2016). Disinfection of explants for saffron (*Crocus sativus*) tissue culture. *Environmental & Experimental Biology*, 14(4).
- Upreti, K. K., Srinivasa Rao, N. K., & Jayaram, H. L. (2012). Floral abscission in *Capsicum* under high temperature: role of endogenous hormones and polyamines. *Indian J Plant Physiol*, 17, 207-214.
- Uribe, M. E., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque (valdivia)*, 29(1), 58-64.

CAPÍTULO III

El artículo que conforma este capítulo será sometido a revisión para su publicación en la revista *In vitro Celular and Developmental Biology-Plant*

Induction of androgenesis in isolated microspore cultures of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)

Pijera-Fernández, Gema¹; Ku-González, Ángela F. ¹; Canto-Flick, Adriana¹; Guzman-Antonio, Adolfo A. ¹; Pérez-Brito, Daisy²; Santana-Buzzy, Nancy^{1*}

¹Unidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, CP 97205, Mérida, Yucatán, México

²Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, CP 97205, Mérida, Yucatán, México

*Corresponding author email: buzzy@cicy.mx

Abstrac

Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) is recognized as one of the most recalcitrant species within the *Capsicum* genus. To date, the induction of *in vitro* morphogenic processes from isolated microspore cultures of this species has not been reported. In this study, a protocol for androgenesis induction in isolated microspore cultures of habanero pepper was developed. The variety Mayan K'iin, cultivated under greenhouse conditions, served as the donor of explants. Floral buds exhibiting a calyx-to-corolla ratio of 1:1 and pale-yellow anthers with slight violet pigmentation at the distal end were identified as the optimal developmental stage for microspore extraction, as this stage contained the highest percentage of vacuolated microspores. It was demonstrated that anther sonication could serve as an efficient alternative method for microspore extraction, yielding a density of 5×10^6 microspores/mL and a viability rate of 87%. Phase contrast microscopy allowed the observation and characterization of induced microspores and their progressive embryogenic development or proliferation as callus masses over a period of 30 days. Treatments using B5 medium, with equivalent concentrations of auxins and cytokinins, effectively induced an embryogenic response, with T2 (0.1 mg/L ANA/KIN) standing out as the most efficient treatment for the formation of embryo-like structures. Interestingly, the number of responsive microspores and embryo-like structures produced in T1 demonstrated that PGRs were not strictly necessary for embryogenesis induction in this experiment. Despite limitations in

regeneration due to the recalcitrant nature of the species, this is the first report of successful androgenesis induction from isolated microspore cultures of *C. chinense*.

Keywords: *Capsicum chinense*, microspore culture, microspore embryogenesis, recalcitrance

Introduction

Doubled haploid (DH) technology has emerged as an effective alternative to traditional breeding methods for hybrid seed production, reducing the time required to produce elite parental lines and enabling the rapid fixation of desirable traits (Seguí-Simarro *et al.*, 2021; Yali, 2022). Androgenesis is a morphogenic route that enables the production of DHs, involving the *in vitro* conversion of microspores into haploid embryos. Upon chromosome doubling, these haploid individuals develop into fully homozygous plants, representing a pure genetic line derived from the donor gametophyte (Hale *et al.*, 2022). The androgenic process can be achieved by using both isolated microspores or the entire anther structure as explants (Lantos *et al.*, 2012a; Seguí-Simarro, José M. & Nuez, 2007; Seguí-Simarro, José M. *et al.*, 2011). Isolated microspores culture avoids complications associated with the tapetal layer, thereby improving culture control and embryo production. Additionally, this method enhances nutrient uptake and allows for more precise observation of microspore development and embryogenesis (Hashemi *et al.*, 2023).

Although significant progress has been made in recent years regarding the cellular and molecular mechanisms underlying microspore embryogenesis induction, the process governing the shift in microspore cell fate remain largely unknown (Testillano, 2019). The induction of embryogenesis in gametic cells is a multifactorial process influenced by the genotype of donor plant, its growing conditions, culture season, nutrient media, incubation conditions, plant growth regulators, pre-treatments of buds and anthers and the correct selection of donor buds at the correct developmental stage (Bat *et al.*, 2020; Kambale *et al.*, 2023). Identifying the microspore developmental stage poses a significant challenge in this process, as it is a critical factor determining the success in switching from the gametophytic to the embryogenic developmental program. Most of the studies suggest the vacuolated microspore stage as optimal for embryogenesis induction in certain genotypes but some authors also consider the utilization of young bicellular pollen (Seguí-Simarro *et al.*, 2021). Generally, the inducible stages are thought to coincide with first pollen mitosis, as seen in other species (Mineykina *et al.*, 2021). The accuracy in identifying the optimal stage relies on precise methods for selecting anthers, often based on morphological markers

characteristic of each genotype cultured (Mangal & Srivasatava, 2019; Moraes *et al.*, 2008; Parra-Vega *et al.*, 2013)

Androgenesis has been successfully applied to numerous angiosperm species; however, among the major solanaceous crops, only tobacco has an extensively developed DH production protocol (Germana, 2011; Seguí-Simarro, Jose M., 2016). *Capsicum* genus, in spite of being recalcitrant to plant tissue culture techniques, is relatively amenable to androgenesis induction, with numerous researches reporting the production of embryos and plants from both isolated microspore and anther cultures (de Vaulx *et al.*, 1981; Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1997; Lantos *et al.*, 2012b; Supena *et al.*, 2006b). Nevertheless, many of these protocols are not widely applicable to different pepper genotypes and often result in a high proportion of underdeveloped embryos or embryo-like structures (ELS), with few progressing to the cotyledonary stage. Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) is one of the domesticated species of this genus for which no androgenesis induction protocol has been established. The process of microspore reprogramming in habanero genotypes remains underexplored, despite the inclusion of different varieties in experimental studies. These limitations have impeded the practical application of DHs for habanero pepper breeding and biotechnology, necessitating the development of improved culture systems. The objective of this study is to establish an effective protocol for the induction of androgenesis in isolated microspore cultures of *C. chinense*, through the optimization of culture conditions and identifying the key factors influencing the androgenic response, with the goal of overcoming species-specific challenges in regeneration. By developing a reliable methodology, the study seeks to advance the use of androgenesis for accelerated breeding in habanero peppers, facilitating the rapid development of homozygous lines for conventional breeding programs.

Materials and methods

Donor plant material

The commercial variety Mayan K'iiin of habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) was selected as the genotype to be evaluated. Starting material was provided by the Germplasm collection of habanero pepper belonging to the Scientific Research Center of Yucatán (CICY). Seeds were superficially disinfected, rinsed and then immersed in a 1% potassium nitrate (KNO₃) solution for 24 hours. Germination process was carried out in 200-cell polystyrene trays filled with moistened Sunshine substrate and grown under controlled

greenhouse conditions. After 60 days, the germinated seedlings were transferred to bags containing a mixture of soil, Sunshine, and Agrolite in a 2:1:1 ratio. Donor plants were grown in the CICY greenhouses, in Mérida, Yucatán, during the 2023 winter season.

Morphological markers of flower buds and anthers

Flower buds ranging 1 to 6 mm long were excised in the early morning from donor plants under its fifth flowering cycle. Buds, calyx, corolla and anthers were measured using a digital calibrator and following the methodology described by Parra-Vega et al., 2013. These structures were also analyzed and photographed with a LMscope stereomicroscope with an integrated Canon camera. The morphological markers described were flower bud length, calyx/corolla proportion, anther length and anther pigmentation particularities. According to this, flower buds were divided into six groups, each corresponding with different developmental stages. For each developmental stage, three replicates were used, each replication composed of three buds. Three anthers from bud were examined for pigmentation and subsequently used to identify the microspore developmental stage.

Determination of the microspore developmental stage

To extract the microspores, three anthers were placed on a slide and subjected to pressure with a coverslip using the squash technique. Once the content was released, the coverslip and anther tissue were removed, and the sample was immediately stained with 5µl of the fluorescent DNA dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (400µM). The preparations were incubated in darkness for two hours and then examined under the Olympus Fluoview IX81 confocal fluorescence microscope at 40X magnification to identify the microspore developmental stage. Fluorescence images were processed using Olympus Fluoview Software, version 4.2.

Microspore isolation and viability test

Flower buds in the appropriate developmental stage were selected, manually excised and transported under refrigeration to the laboratory. Buds were surface sterilized by immersion in 70% ethanol for 3 minutes, rinsed with sterile distilled water (dH₂O), followed by immersion in a solution of 5% sodium hypochlorite (NaOCl) and 10% Extran with gentle agitation for 15 minutes and then rinsed three times with sterile dH₂O. For microspore extraction, twenty anthers were aseptically placed in tubes with 5 ml of B5 basal medium and subjected to an

ultrasonic bath (Branson®) for 10 minutes. The resulting suspension was filtered through a sterile sieve to remove anther debris. Microspores were counted using a Neubauer chamber. For viability assessment, microspores were stained with a propidium iodide (PI) solution 100 μ M and incubated for 15 minutes at room temperature in the dark. Preparations were examined under a confocal microscope and microspores were counted manually by defining regions of interest (ROIs) in confocal images.

Culture conditions

Five treatments with equal concentration of plant growth regulators (T1: 0 mg. l⁻¹ PGR; T2: 0.1 mg. l⁻¹ NAA/KIN; T3 0.3 mg. l⁻¹ NAA/KIN; T4: 0.5 mg. l⁻¹ NAA/KIN; T5: 0.1 mg. l⁻¹ 2,4-D/KIN; T6: 0.3 mg. l⁻¹ 2,4-D/KIN; T7: 0.5 mg. l⁻¹ 2,4-D/KIN) were evaluated in B5 basal medium supplemented with 9% maltose. Cultures were established in 45 mm Gerber flasks with 5ml of liquid culture media inoculated, with a final microspore density of 2×10^6 ms.ml⁻¹. The cultures were incubated in agitation (100 rpm), at 28°C with 80% air humidity and maintained in the dark for 60 days. After the incubation period, morphogenic structures were transferred to liquid regeneration medium R1 (Dumas de Vaulx et al., 1981). Regeneration process was conducted at 24°C with a 16-hour photoperiod and agitation of 100 rpm.

Microscopy monitoring

The effects of the induction treatments were evaluated at 7-day intervals through aliquot sampling from the cultures. The samples were analyzed and photographed using a phase-contrast microscope ZEISS Axioplan, with endosed digital camera Axio Cam CC5, with structures measured using the associated software AxioVision. Microspores exhibiting significant structural and size changes, as well as multicellular structures, were classified as microspore derived structures.

Statistical analysis

All statistical analyses including ANOVA and means comparison analysis were done using R software (Ver. 4.x) (R Core Team, Vienna, Austria). The means comparison analysis was done using Tukey's Honest Significant Difference (HSD) test at 5% probability level following the analysis of variance.

Results

Morphological markers related to the specific microspore developmental stages

The parallel development of floral buds, anthers and microspores was observed, described and documented, covering from early to preanthesis developmental stages of bud maturation (Figure 1). The floral buds of Mayan K'iin variety were grouped based on shared morphological traits, with size ranges established for buds with coincident descriptions. Additionally, the shape and color of the anthers from each bud type were described, along with the characterization of DAPI-stained microspores extracted from different developmental stages (Table 1).

Group 1 included the smallest buds, measuring up to 2 mm, with the calyx completely covering the corolla (Figure 1A) and exhibiting small, rounded, white anthers (Figure 1A'). This group showed a higher proportion (69%) of post meiotic microspores organized in tetrads surrounded by a thick callose wall (Figure 1A''), although early uninucleate individual microspores were also observed (31%).

Floral buds in Group 2 presented green petals that slightly protrude from the calyx (Figure 1B), ranging from 2 to 3 mm long. The light-yellow anthers were more elongated compared to those previously described (Figure 1B') and small, fully spherical, uninucleate microspores predominate (75%) (Figure 1B'') over vacuolated ones also observed in these slides (25%).

Vacuolated microspores appear as a small, generally spherical structure that under fluorescent microscopy the nucleus fluoresces bright blue while a significant portion of its cytoplasm is occupied by a clear or lightly stained region, corresponding to the vacuolar volume (Figure 1C'). In this study vacuolated microspores were found in greater proportion (86%) in buds from Group 3, with proportional calyx and corolla lengths and pale green petals, between 3 and 4 mm of bud size (Figure 1C). Anthers of this group were pale yellow and exhibited a distinctive purplish pigmentation at the distal end coinciding with the beginning of anthocyanin biosynthesis (Figure 1C').

Group 4 included buds with very similar traits to those of Group 3, measuring 4 to 5 mm in length, with the corolla slightly larger than the calyx (Figure 1D). Anthers in this group were

elongated and showed a pale violet pigmentation, featuring a distinct white transverse line (vallecular line) on the sides of each theca (Figure 1D'). In this stage, a higher proportion of dividing or early binucleate microspores was observed (79%). Early binucleate microspores exhibit two nucleus and minimal vacuolation or vacuole fragmentation. Some stages of mitotic division can also be observed, such as chromatin condensation and chromosome migration (Figure 1D'').

Young pollen grains were also visualized in lower proportion (21%). Group 5 included buds measuring 5 to 6 mm in length, with pre-anthesis white petals (Figure 1E). Their anthers exhibit intense violet pigmentation (Figure 1E'), and the mature stage of pollen was observed with a central and a peripheral nucleus. In a mature pollen grain, central and peripheral nuclei were observed, in conjunction with initial formation of the pollen tube (Figure 1E'').

Assessment of microspore viability after anther sonication

In this experiment the efficiency of sonication, as a new method for microspore extraction was evaluated. Microspores isolated from anthers by sonication were counted, stained with Propidium Iodide, and observed under a confocal microscope to analyze their viability (Figure 2). As a result of the microspore count in a Neubauer chamber, a density of 5×10^6 microspores per milliliter was obtained (Figure 2A). Only 13% of the total counted microspores lost its viability, as evidenced by the nucleus stained with PI (Figure 2 B and B'). In contrast, 87% were viable, demonstrating the integrity of the exine layer that covers them and prevents the dye from entering the cell and stain the nucleus (Figure 2, C and C'). These results were obtained under the following conditions, which were considered optimal for microspore extraction using sonication: 25 anthers per tube, with 5 ml of B5 medium, incubated for 5 minutes in the sonicator at a frequency of 40 kHz. Incubation times longer than 5 minutes were not effective in increasing the density of microspores in the samples; however, they negatively affected the viability percentage of the microspores.

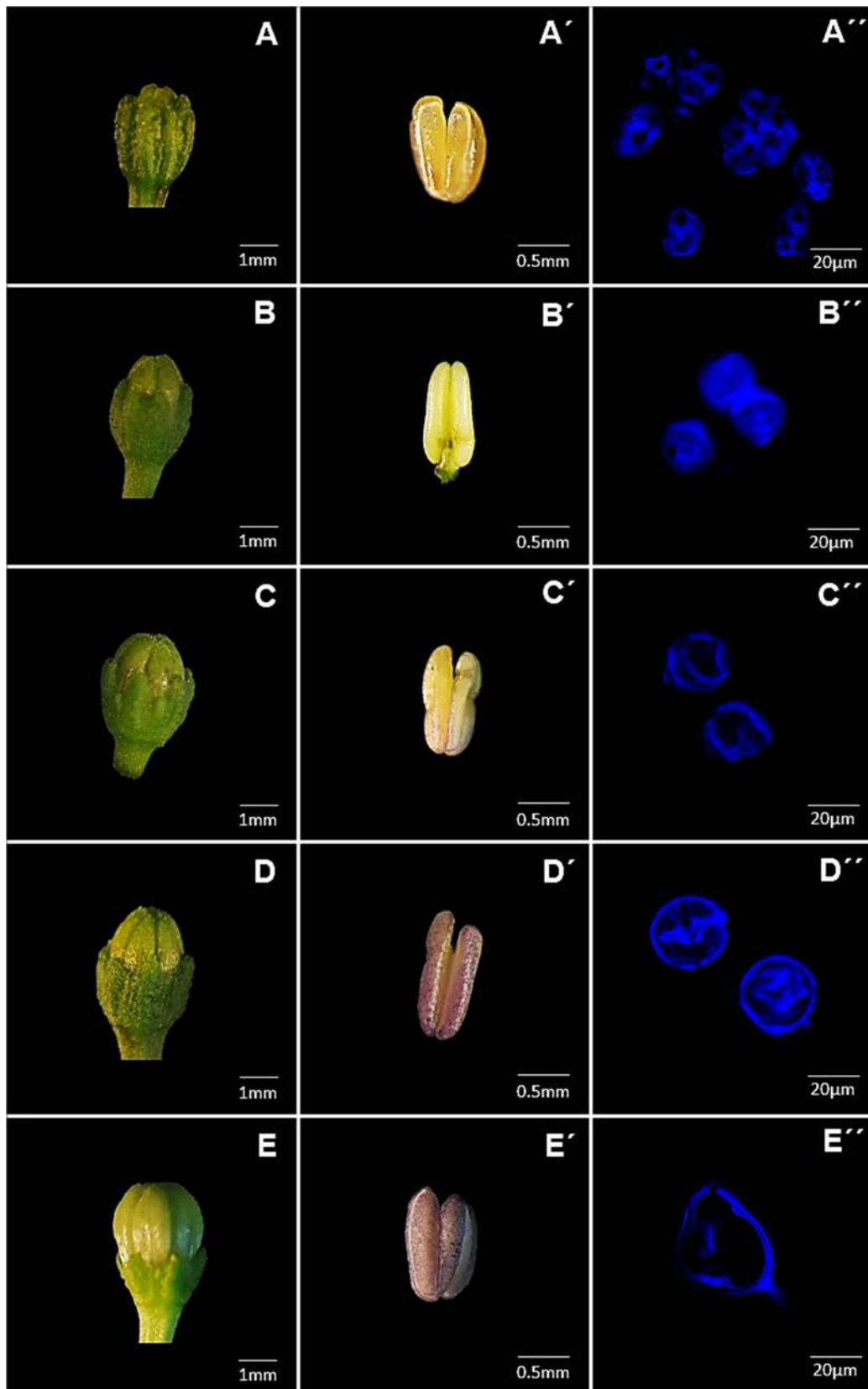


Figure 3. 1: Morphological features of floral buds and anthers at different stages of floral development, and the micropore developmental stage predominant in each group. A: Floral bud from Group 1; A': Anther from the floral bud of Group 1; A'': Microspores in tetrads. B: Floral bud from Group 2; B': Anther from the floral bud of Group 2; B'': Early uninucleated individual microspores. C: Floral bud from Group 3; C': Anther from the floral bud of Group 3; C'': Vacuolated uninucleated microspores. D: Floral bud from Group 4; D': Anther from the floral bud of Group 4; D'': Early binucleated microspores. E: Floral bud from Group 5; E': Anther from the floral bud of Group 5; E'': Mature pollen.

Table 1: Relation between floral bud and anther morphological markers and microspore developmental stages.

Group	Bud length (mm)	Morfological Markers		MDS	P (%)
		Floral bud	Anthers		
1	$B \leq 2$	The calyx completely covers the corolla	Small, rounded white anthers	Tetrads	69
				Early uninucleate	31
2	$2 < B \leq 3$	Green petals which protrude slightly from the calyx	Elongated light-yellow anthers	Early uninucleate	75
				Vacuolated	25
3	$3 < B \leq 4$	Calyx-corolla ratio of 1:1 with pale green petals	Anthers with purplish pigmentation towards the distal end.	Vacuolated	86
				Early binucleate	14
4	$4 < B \leq 5$	The corolla is slightly larger than the calyx, and the petals are pale yellow.	Completely pigmented anthers of light purple.	Early binucleate	79
				Young pollen	21
5	$5 < B \leq 6$	Floral bud pre-anthesis with white petals	Intensely purple pigmented anthers	Mature pollen	100

MDS: Microspore developmental stage; P: Probability (%)

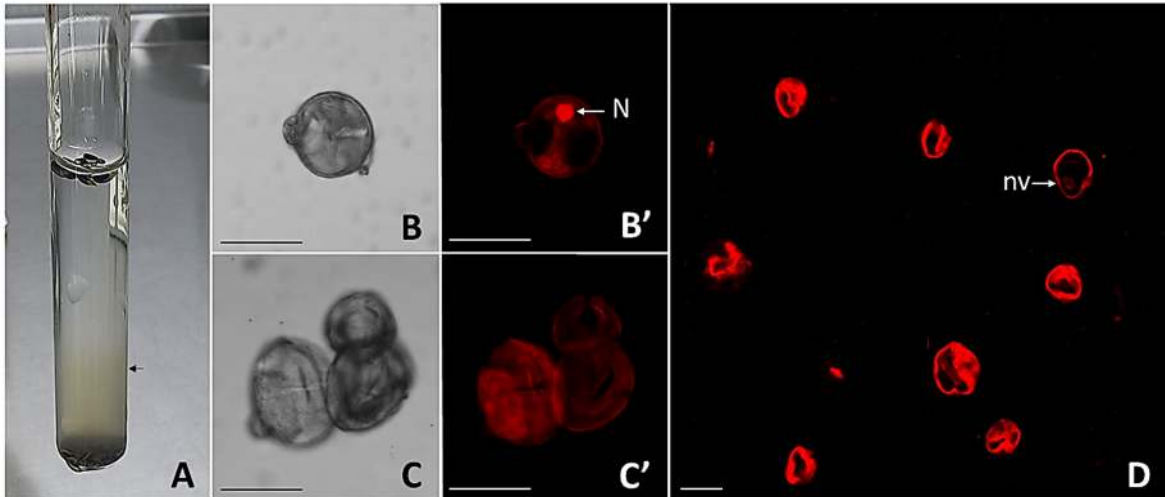


Figure 3. 2: Propidium Iodide Staining for viability assessment. A: Suspension of microspores extracted from the anthers by anther sonication. B, B': Non-viable microspore: bright field image (B) and fluorescence image (B') indicating the stained nucleus (N) of the microspore. C, C': Viable microspores with intact exine wall. D: Fluorescence image of viable microspores showing a single non-viable cell. Each scale bar corresponds to 20 μm in length. N: nucleus; nv: non-viable. Bars indicate 20 μm length.

Monitoring the androgenic response in microspore cultures

Contrast microscopy allowed the observation of morphological changes experienced by microspores induced in the embryogenic pathway (Figure 3). To identify these changes, untreated microspores at the uninucleate/vacuolated stage were characterized as structures 20 to 25 μm in diameter, with a slightly ellipsoidal spherical shape, lobulated, with three visible apertures (colpi), and a thick exine wall covering them. Microscopic observations were made of the equatorial (Figure 3, A-I) and polar (Figure 3, A-II) planes of the microspores, each of which allows distinguishing different structural details.

From day 5 of culture, responsive microspores began to be observed, with a slight increase in size compared to the rest and a granular appearance of the cytoplasm (Figure 3, B). After day 7, the formation of dense multicellular structures was observed, which remained confined within the exine layer (Figure 3, C). On day 10, an increase in the frequency of formation of larger multicellular structures was reported, some of which caused the exine wall to rupture (Figure 3, D). By day 12 of culture, these structures continued to proliferate, giving rise to two types of embryo-like structures (ELS): one type with a rounded morphology with defined edges and organized cellular structure (Figure 3, E) and the other one with an

amorphous structure and irregular edges, both invisible to the naked eye (Figure 3, F). After 15 days in culture, some of these dividing structures acquired polarity, leading to the formation of embryos at advanced stages of development (Figure 3, G). Others led to the formation of irregular multicellular structures with high cell density (Figure 3, H).

Maximal cell proliferation in the culture medium was evident after 15 days of culture, with the predominant formation of translucent cell masses resembling calli (Figure 3, I). In continuous culture samples, from day 30 to day 60, no appreciable changes in cell proliferation were observed, nor was the formation of embryo-like structures detected.

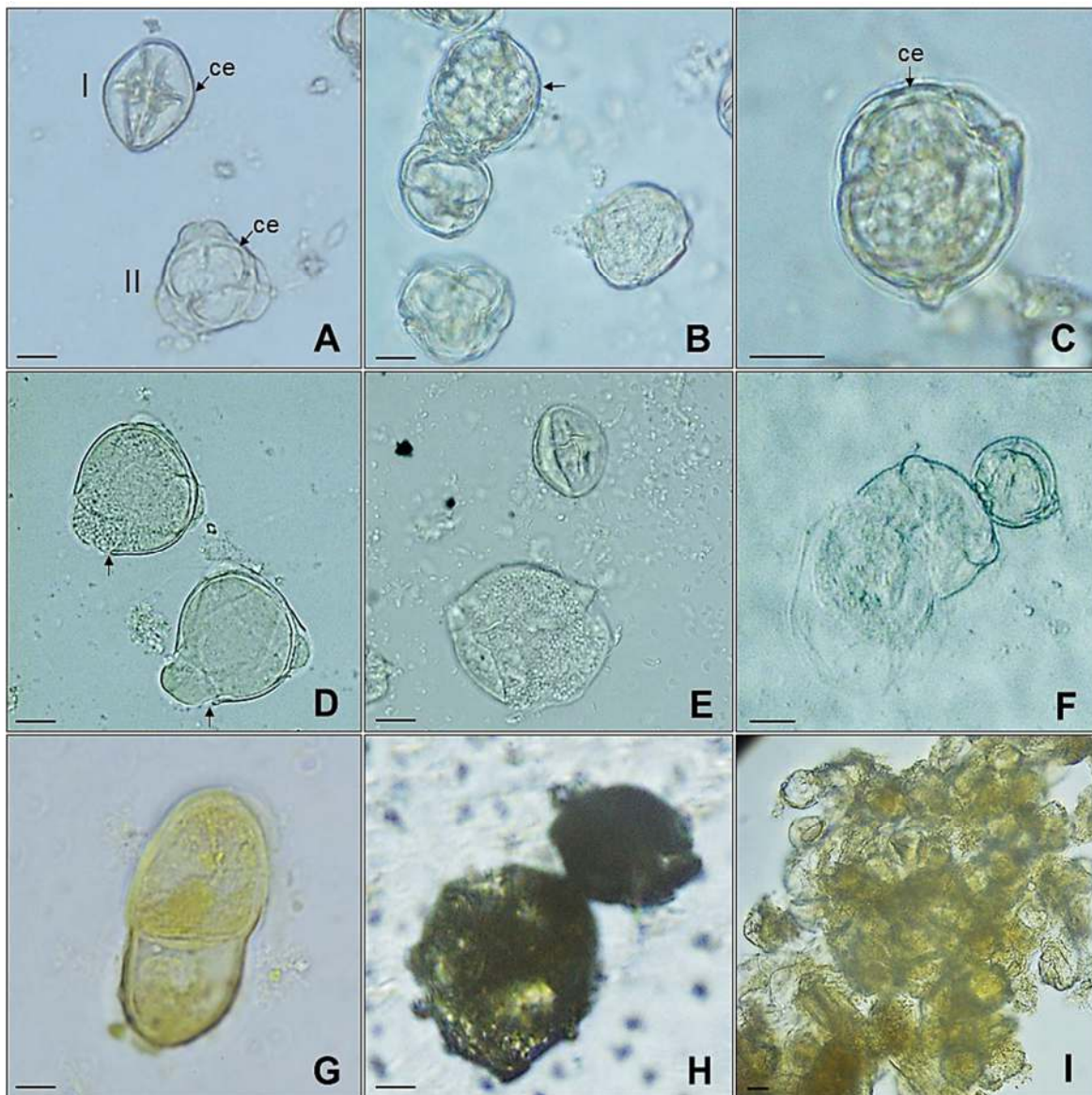


Figure 3. 3: Morphological changes associated with embryogenic reprogramming in the microspore culture of *C. chinense*. A: Untreated microspores viewed in equatorial (I) and polar (II) planes, indicating the exine layer covering them. B: Responsive microspore with a slight increase in size and cytoplasmic changes distinguishing it from others in the visual field. C: Dense multicellular structure confined in the exine wall (ew). D: Multicellular structures emerging through a marked rupture point in the exine layer. E: Rounded multicellular structure with defined edges. F: Irregular multicellular structure. G: Polarized multicellular structure resembling a somatic embryo morphology. H: Irregular multicellular structures with high density. I: Micrograph of a macroscopic structure resembling a callus. Each scale bar corresponds to 20 μm in length.

Effect of different treatments with PGRs on embryogenesis induction in isolated microspore cultures

In this experiment, the effect of seven treatments combining equivalent concentrations of auxin- and cytokinin-type phytohormones treatments was evaluated. The quantification of the embryogenic response (Table 4) was performed at different time points during cultivation. Responsive microspores were considered a measure of the initial response (5-7 days of culture), while the formation of ELS (embryo-like structures) and callus were considered advanced morphogenic responses, quantified at days 15 and 30 of culture, respectively. The statistical analysis of mean comparisons showed that treatments 1, 2, and 5 exhibited similar percentages of responsive microspores, with these being the highest average initial responses recorded in the experiment. Treatment 2, with $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA/KIN, was the most efficient in producing ELS, with approximately 35 of these structures for every 100 structures counted. Significant differences were observed with treatments containing PGR concentrations higher than $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T3, T4, T6, and T7), where fewer responsive microspores and ELS were counted. In general terms, a maximum embryogenic response was observed in treatments with the lowest or null PGR concentrations, and this response tended to significantly decrease with the addition of higher amounts of PGR to the culture medium. However, higher doses of PGR promoted the disorganized cell proliferation, with treatments at $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ recording the highest number of calli production.

Treatments including a combination of auxin and cytokinin effectively induced morphogenic response in cultured microspores of habanero pepper, however, B5 medium without PGR showed highly efficient cellular reprogramming. Regarding the specific effect of the auxin used in each combination, it was observed that treatment with NAA, although not significantly different in inducing the initial response, proved to be more efficient for

embryogenesis induction and ELS formation at the lowest concentration. On the other hand, the combination containing 2,4-D was observed to preferentially promote callus proliferation over embryo production.

Table 2: Response of the habanero pepper isolated microspore cultures to different treatments with PGR

T	NAA (mg. l ⁻¹)	2,4-D (mg. l ⁻¹)	KIN (mg. l ⁻¹)	RM (%)	ELS (%)	Calli (Mean per culture)
T1	0	0	0	43.2 ± 1.2 ^a	26.4 ± 0.9 ^b	0 ^e
T2	0.1	0	0.1	41.8 ± 0.9 ^a	35.3 ± 1.3 ^a	5.4 ^d
T3	0.3	0	0.3	25.5 ± 1.1 ^b	13.4 ± 0.6 ^c	19.2 ^c
T4	0.5	0	0.5	15.1 ± 0.8 ^c	3.2 ± 0.5 ^d	30.6 ^b
T5	0	0.1	0.1	39.9 ± 1.1 ^a	21.6 ± 1.1 ^b	12.0 ^d
T6	0	0.3	0.3	29.3 ± 1.3 ^b	10.5 ± 0.4 ^c	20.8 ^c
T7	0	0.5	0.5	18.4 ± 0.5 ^c	2.9 ± 0.8 ^d	41.0 ^a

NAA: Naphthaleneacetic acid; 2,4-D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid; KIN: Kinetin; RM: Responsive microspores; ELS: Embryo-like structures

Regeneration results

The morphogenic structures obtained were transferred to regeneration medium R1 after 30 days. Prior to the transfer, the embryo-like structures were nearly imperceptible at the macroscopic level. The successful transfer of these structures to the regeneration medium, was confirmed through fluorescence microscopy on day 5 of R1 culture. However, despite their presence, no signs of further embryogenic development or differentiation were observed throughout the culture period.

In contrast, the macroscopic evaluation revealed a continuous callus proliferation (Figure 4A) and the emergence of a new type of abnormal individual structures (Figure 4 B, C). These structures were morphologically irregular and elongated, with a certain degree of

polarization, but no clear indication of organized tissue development. They remained undifferentiated, with no progression towards shoot or root formation.

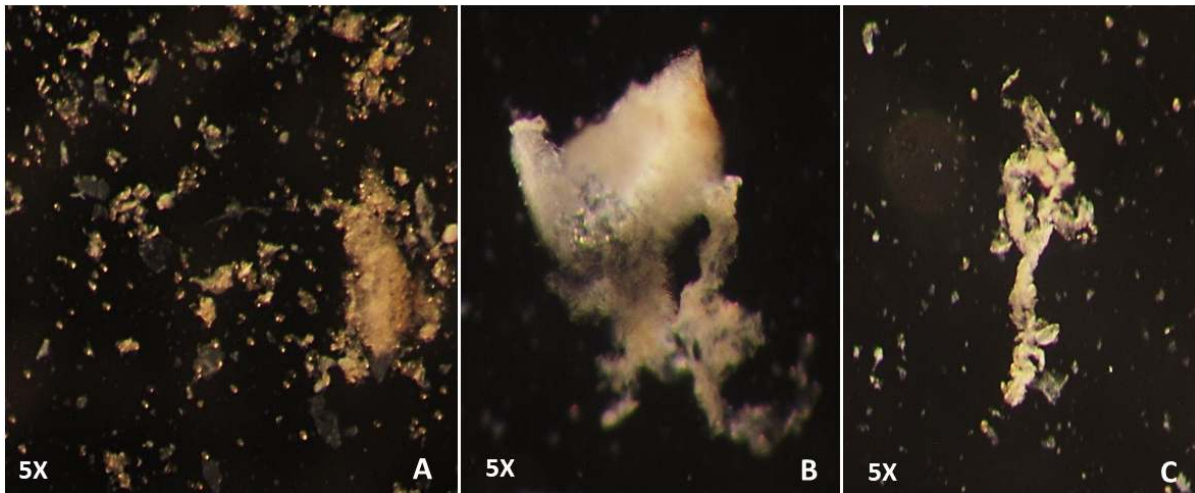


Figure 3. 4: Morphogenic structures formed in regeneration medium R1. A: Proliferative callus in R1 medium. C, D: abnormal individual structures

Discussion

The study provides significant advancements in the induction of embryogenesis from *C. chinense* microspores, offering new strategies to address the severe recalcitrance of habanero pepper to *in vitro* culture. Establishing the correlation between floral bud morphology, anther characteristics, and microspore developmental stages provides a crucial foundation for improving protocol efficiency by selecting optimal explants. The importance of selecting the appropriate microspore stage has been widely reported, as it directly impacts embryogenic induction (Kambale *et al.*, 2023; Ramlal *et al.*, 2024; Luo *et al.*, 2024). Studies on solanaceous species have shown that the vacuolated microspore stage is particularly responsive to androgenic induction, as the cells are primed for reprogramming (Seguí-Simarro *et al.*, 2011; Parra-Vega *et al.*, 2013; Sahana *et al.*, 2021). Therefore, this targeted approach to explant selection could serve as a model for rapid and accurate method for floral bud collection.

Ultrasound has been previously used on pollen cells for extracting proteins, polyphenols, among other secondary metabolites and it has been demonstrated sonication increase the metabolic activity before resulting in cell disruption (Liu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Oroian *et al.*, 2020; Sebi *et al.*, 2021). The innovative use of ultrasound for isolating microspores demonstrated effectiveness without compromising their viability. The resulting 87% viability

rate shows the potential of this technique as a quick and efficient alternative to traditional isolation methods that have limited efficiency (Corral- Martínez *et al.*, 2020). However, the duration of exposure to this method must be carefully regulated, as cell disruption becomes evident when sonication treatment exceeds 10 minutes.

The embryogenic pathway observed in the study, progressing from multicellular aggregates to ELS and callus formation, is consistent with the androgenic responses in *Capsicum annuum*, where minimal PGR concentrations promote direct embryogenesis (Heidari-Zefreh *et al.*, 2019). Treatments with lower PGR levels yielded the highest ELS counts, corroborating earlier work indicating that lower auxin and cytokinin levels or only temperature pretreatments favor organized development over callus proliferation (Dumas de Vault *et al.*, 1981; Supena *et al.*, 2006; Lantos *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). In contrast, high PGR concentrations in this study induced prolific callus formation, a common outcome in *Capsicum* cultures where undifferentiated tissue masses often result from elevated auxin-cytokinin treatments (Parra-Vega *et al.*, 2013 a; Mangal *et al.*, 2023). The study also underscores a recurring challenge in *Capsicum* androgenesis—transitioning from ELS to fully regenerated plants. Previous research on *Capsicum* has noted similar difficulties, with callus-like proliferations often failing to progress to organized tissue structures capable of forming shoots or roots (Bal *et al.*, 2003; Parra-Vega *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013). Such obstacles are linked to the recalcitrant nature of the *Capsicum* genus and underscore the need for further optimization of conditions to support regeneration.

This study represents a significant advance for *C. chinense* tissue culture, as it is the first to report and document the successful induction of androgenesis from isolated microspores in the species. Further research is necessary to improve embryo production efficiency and refine regeneration methods to consistently obtain doubled haploid plants through this technique. Together, our results contribute significantly to the development of androgenesis protocols tailored for *C. chinense*, providing a foundation for broader application in breeding programs aimed at producing elite cultivars with enhanced genetic traits.

References

- Bat, H., Shidfar, M., Çömlekçioğlu, N., & Ellialtıoğlu, Ş. Ş. (2020). *In vitro* androgenesis in pepper and the affecting factors on success: I. Carbon source and concentrations. *Biotech Studies*, 29(2), 62-68
- Bal, U., Abak, K., Büyükalaca, S. A. A. D. E. T., & Comlekcioglu, N. U. R. A. Y. (2003). Development of callus colonies from the isolated microspore culture of *Capsicum annuum*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 17(2), 38-43.
- Corral-Martínez, P., Camacho-Fernández, C., & Seguí-Simarro, J. M. (2020). Isolated microspore culture in *Brassica napus*. *Plant Embryogenesis: Methods and Protocols*, 269-282.
- Dumas de Vault R, Chambonnet D, Pochard E (1981) Culture *in vitro* d'anthers de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à +35°C. *Agronomie* 1:859–864.
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., & Huerta, A. (1997). Androgenesis in *Capsicum annuum* L.-effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122 (4): 468-475. 1997
- Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104, 283-300.
- Hale, B., Ferrie, A. M., Chellamma, S., Samuel, J. P., & Phillips, G. C. (2022). Androgenesis-based doubled haploidy: Past, present, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 12, 751230.
- Hashemi, M., Moieni, A., & Sabet, M. S. (2023). Improving the isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.) with amino acid nutrition. *Plos One*, 18(6), e0286809.
- Heidari-Zefreh, A. A., Shariatpanahi, M. E., Mousavi, A., & Kalatejari, S. (2019). Enhancement of microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) using putrescine and ascorbic acid. *Protoplasma*, 256, 13-24.
- Kambale, R., Ramasamy, G., Balasubramanian, R., Thiruvencatasamy, S., & Sekar, V. (2023). Androgenesis in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)—Effect of genotypes, microspore development stage, pre-treatments and media composition on induction of haploids. *J. Phytol.*, 15, 80-93.

- Kim, M., Jang, I. C., Kim, J. A., Park, E. J., Yoon, M., & Lee, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant cell reports*, 27, 425-434.
- Kim, M., Park, E. J., An, D., & Lee, Y. (2013). High-quality embryo production and plant regeneration using a two-step culture system in isolated microspore cultures of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112, 191-201.
- Lantos, C., Gémes Juhász, A., Vági, P., Mihály, R., Kristóf, Z., & Pauk, J. (2012). Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnology Reports*, 6, 123-132.
- Liu, X. D., Zhang, F. B., Zhou, B., Shan, H., & Chen, P. Y. (2015). Effect of sonication on different quality parameters of *Pinus massoniana* pollen. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 174-181.
- Luo, P., Zhao, Z., Yang, F., Zhang, L., Li, S., Qiao, Y., ... & Shi, C. (2024). Stress-Induced Autophagy Is Essential for Microspore Cell Fate Transition to the Initial Cell of Androgenesis. *Plant, Cell & Environment*.
- Mangal, M., & Srivasatava, A. (2019). Exploitation of morphological features of bud and anther development for prediction of stages of microsporogenesis and microgametogenesis in pepper. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57(6).
- Mineykina, A., Bondareva, L., Soldatenko, A., & Domblides, E. (2021). Androgenesis of red cabbage in isolated microspore culture *in vitro*. *Plants*, 10(9), 1950.
- Oroian, M., Ursachi, F., & Dranca, F. (2020). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from crude pollen. *Antioxidants*, 9(4), 322.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013). Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112, 353-360.
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013). Stress treatments and *in vitro* culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112, 353-360.
- Ramlal, A., Mehta, S., Nautiyal, A., Baweja, P., Shivam, Sharma, D., ... & Rajendran, A. (2024). Androgenesis in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): A critical revisit. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 60(1), 1-15.

- Sahana, K. P., Singh, K., Srivastava, A., Khar, A., Jain, N., Jain, P. K., ... & Mangal, M. (2021). Morphological characterization of floral traits to predict ideal stage for haploid production in bell pepper. *Indian Journal of Horticulture*, 78(4), 365-369.
- Sebii, H., Karra, S., Blecker, C., Karoui, R., Attia, H., & Besbes, S. (2021). Effect of sonication and succinylation on rheological properties and secondary structures of date palm pollen protein concentrate. *Rheologica Acta*, 60, 543-551.
- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., & González-García, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30(5), 765-778.
- Seguí-Simarro, J. M. (2016). Androgenesis in solanaceae. *In vitro* embryogenesis in higher plants, 209-244.
- Seguí-Simarro, J. M., Jacquier, N. M., & Widiez, T. (2021). Overview of *in vitro* and in vivo doubled haploid technologies. *Doubled haploid technology: volume 1: general topics, alliaceae, cereals*, 3-22.
- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119-1132.
- Supena E D J, Muswita W, Suharsono S, Custers J B M (2006) Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Sci Hortic* 107:226-232
- Testillano, P. S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 70(11), 2965-2978.
- Yali, W., & Mitiku, T. (2022). Mutation breeding and its importance in modern plant breeding. *Journal of Plant Sciences*, 10(2), 64-70.
- Yang, L., Cui, G., Wang, Y., Hao, Y., Du, J., Zhang, H., ... & Sun, Y. (2017). Expression of foreign genes demonstrates the effectiveness of pollen-mediated transformation in *Zea mays*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 383.

CAPÍTULO IV

El artículo que conforma este capítulo será sometido a revisión para su publicación en la revista *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*

First report of embryogenesis induction in *in vitro* cultured anther and ovary tissues of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)

Pijera-Fernández, Gema¹; Magaña-Álvarez., A. ²; Canto-Flick, Adriana¹; Guzman-Antonio, Adolfo A. ¹; Pérez-Brito, Daisy²; Santana-Buzzy, Nancy^{1*}

¹Unidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, CP 97205, Mérida, Yucatán, México

² Laboratorio GeMBio, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, CP 97205, Mérida, Yucatán, México

*Corresponding author email: buzzy@cicy.mx

Abstract

Capsicum chinense is severely recalcitrant to *in vitro* regeneration, and its androgenic potential remains largely unexplored, with limited studies investigating its capacity for gametic embryogenesis induction. In this study, various culture methods and treatments with plant growth regulators were systematically evaluated for their effectiveness in inducing microspore embryogenesis. The occurrence of microspore-derived embryogenesis was confirmed through microscopic culture monitoring within the first 30 days of culture. Embryo-like structures of different developmental stages, were simultaneously formed across solid, double layer and anther-ovary cultures treated with T2 (0.5 mg·l⁻¹ NAA / KIN) or T6 (0.5 mg·l⁻¹ 2,4-D / KIN), and this response was further enhanced by heat shock treatment (35°C / 24 hours) and coculture conditions. Furthermore, ovule-derived embryogenesis was induced during anther-ovary co-cultures, with the highest yield of embryonic structures observed under 1.0 mg·l⁻¹ NAA / KIN (T3). These embryos displayed advanced development, with prominent apical meristems and initial cotyledon formation, distinguishing them from abnormally formed microspore-derived embryos. Differential expressions of *BBM*

and *LEC* in cultured tissues confirmed the embryogenic nature of the structures, suggesting that embryogenesis induction is regulated by tissue-specific factors and culture conditions. Overall, this study provides novel insights into the culture conditions and PGR treatments required for gametic embryogenesis induction, marking the first successful report of androgenesis in *C. chinense* and the first documentation of gynogenesis in the *Capsicum* genus.

Key words: androgenesis, anther culture, ovary coculture, embryogenesis, *Capsicum chinense*, recalcitrance

Introduction

Androgenesis is a method for inducing male gametophytes to develop into haploid embryos, providing an efficient route for developing double haploid plants to use as homozygous lines, essential for crop breeding programs and genetic research. The efficiency of androgenesis in anther culture is influenced by different factor as plant genotype, physiological state, microspore developmental stage, and specific pretreatments, plant growth regulators (PGR) or culture conditions, which collectively influence the switch from gametophytic to sporophytic development (Singh et al., 2020; Jha et al., 2022).

Among the methods used to induce androgenesis, anther culture is often implemented over isolated microspore culture, especially in species where microspore isolation is technically challenging, and anther acts as a protective environment for microspores (Lantos *et al.*, 2021; Hale *et al.*, 2022; Islam *et al.*, 2023). Anther culture mostly utilizes solid media, supplemented with growth regulators, usually combining auxins and cytokinins (Cheng *et al.*, 2013; Tatar *et al.*, 2023; Mangal *et al.*, 2023). Solid media provide physical support for anthers, ensuring they remain intact and protected throughout the embryogenic process. By contrast, isolated microspore cultures tend to favor liquid media, which allows for greater mobility and access to nutrients, critical for the isolated microspores to transition into embryogenesis. The "shed-microspore" method, developed and refined by Supena *et al.* (2006), has significantly improved the efficiency of microspore-derived embryogenesis in *Capsicum annuum* by overcoming some of the challenges associated with isolated microspore culture, such as low yields and the fragility of microspores during isolation (Supena *et al.*, 2021).

In addition to the refinement of culture conditions, studies have shown that the presence of ovaries, during anther or microspore culture, significantly improves androgenesis by providing additional hormonal or developmental cues that promote the transition from

gametophytic to sporophytic development (Abdollahi *et al.*, 2015). This cocultivation technique has proven effective in *Capsicum annuum*, where embryogenic responses have been significantly enhanced when anthers are cultured in presence of ovaries (Lantos *et al.*, 2009). On the other hand, temperature treatments have been shown to significantly enhance androgenic efficiency in *Capsicum* tissue culture. Studies indicated both low and high temperature pre-treatments can increase the rate of successful embryogenesis by stimulating the expression of genes involved in stress and developmental pathways, ultimately promoting higher rates of androgenesis in *Capsicum* species (de Vaulx *et al.*, 1981; Popova *et al.*, 2016; Ata *et al.*, 2019).

Recent studies have focused on understanding molecular mechanisms governing androgenesis, particularly the role of key transcription factors (TF) such as *BABY BOOM (BBM)* and *LEAFY COTYLEDON (LEC)* (Irikova *et al.*, 2012). The exogenous application of PGR in the culture medium can alter auxin levels balance within cells by modifying IAA metabolism, which promotes the induction of somatic embryogenesis (Fraga *et al.*, 2012). This morphogenic process is regulated by a complex genetic network where both TFs are essential for activating the embryogenic program in somatic cells and are also associated with formation and maintenance of the shoot apical meristem (SAM). *BBM* and *LEC* play a significant role in regulating auxin homeostasis during induction of somatic embryogenesis. *BBM* has been shown to transcriptionally regulate *LEC1* and *LEC2*, which activate the expression of genes encoding enzymes involved in maintaining auxin homeostasis. Due to their marked expression during the activation of the embryogenic program, the expression of these TFs is considered a marker for initial stages of embryogenesis (Horstman *et al.*, 2017).

Tissue culture recalcitrance is a well-known challenge in *Capsicum* genus, however, androgenesis has been successfully achieved in many *Capsicum* genotypes but *C. chinense* still lacks an efficient androgenesis protocol (Olsewska *et al.*, 2020). This limitation hinders its use as an alternative system to study embryogenesis and develop homozygous lines more efficiently. Overcoming this species-specific recalcitrance could offer valuable insights into embryogenic processes and enhance breeding efforts within this genus. The primary objective of this study was to establish a somatic embryogenesis system from anther culture of *C. chinense* Jacq. var. Mayan K'iin, evaluating the effect of various treatments and culture methods in the induction of embryogenic response confirmed by *BBM* and *LEC* expression. This integrated approach is intended to contribute to the development of an efficient and reproducible embryogenesis system in *C. chinense*.

Materials and methods

Plant material

In this study, seeds of the commercial variety Mayan K'iin (*C. chinense* Jacq.), sourced from the CICY habanero pepper germplasm collection, were used for the establishment of plant material. Donor plants were cultivated in periods of three months in green house conditions. Flower buds, with the appropriate developmental stage (petals equal or slightly longer than sepals), containing vacuolated microspores were collected and the surface disinfected with 70% ethanol for 3 min, followed by a rinse with sterile distilled water (SDW). Then, they were transferred to a solution with 5% of NaOCl and 5% (v/v) Extrán. After ten minutes of gentle agitation, buds were rinsed thrice with SDW and placed in sterile Petri dish for further processing. Pale yellow anthers with distal purple pigmentation were aseptically extracted and positioned with their abaxial side in direct contact with the medium surface.

Treatments with PGR and culture conditions

NN culture medium (Nitsch & Nitsch, 1969) supplemented with 3% sucrose and pH adjusted to 5.8 was used as the basal medium in this study. A total of 16 induction treatments with plant growth regulators (PGR), featuring various types and concentrations of auxins and cytokinins, were tested in both solid and double layer cultures (Table 1). PGR were added by filtration after sterilization process. Cultures were kept in dark at 25 ± 2 °C, at relative humidity of 60-70 per cent for 15 days and later incubated under a light intensity of 2000-4000 lux in a photoperiod of 16/8 light and dark cycle.

Table 1: NN medium with PGR combinations

Code	Medium and PGR (mg.l ⁻¹)
T0	NN basal
T1	NN + NAA (0.1) + KIN (0.1)
T2	NN + NAA (0.5) + KIN (0.5)
T3	NN + NAA (1.0) + KIN (1.0)
T4	NN + NAA (2.0) + KIN (2.0)
T5	NN + 2,4-D (0.1) + KIN (0.1)
T6	NN + 2,4-D (0.5) + KIN (0.5)
T7	NN + 2,4-D (1.0) + KIN (1.0)
T8	NN + 2,4-D (2.0) + KIN (2.0)

T9	NN + NAA (0.1) + ZEA (0.1)
T10	NN + NAA (0.5) + ZEA (0.5)
T11	NN + NAA (1.0) + ZEA (1.0)
T12	NN + NAA (2.0) + ZEA (2.0)
T13	NN + 2,4-D (0.1) + ZEA (0.1)
T14	NN + 2,4-D (0.5) + ZEA (0.5)
T15	NN + 2,4-D (1.0) + ZEA (1.0)
T16	NN + 2,4-D (2.0) + ZEA (2.0)

Culture procedures for embryogenesis induction

- 1. Somatic embryogenesis induction.** Seeds of the selected genotype Mayan K'iin were germinated *in vitro*, following the embryogenesis induction protocol described by Avilés-Viñas *et al.* (2013) for the Mayan Ba'alché variety of *C. chinense*. Early and advanced-stage embryos were collected after 30 days in histodifferentiation medium and stored in an ultrafreezer at -80°C for further gene expression analyses.
- 2. Pepper anther culture in solid medium:** Pale yellow anthers with distal purple pigmentation, were aseptically extracted from floral buds and positioned with their abaxial side in direct contact with the surface of NN solid medium containing 0.5% of activated charcoal and 0.5% Gelrite. Five Petri dishes per treatment were used, each containing 20 anthers and these experiments were repeated three times.
- 3. Shed-microspore culture:** For this experiment a double layer NN medium was distributed in Gerber flask of 80 ml. Anthers with the afore-mentioned features were aseptically placed in the solid NN under layer containing 0.5% of activated charcoal and 0.5% Gelrite. Afterwards, anthers were completely covered with the liquid top layer containing NN basal components and the PGR of the corresponding treatments.
- 4. Anther-ovary coculture.** The anther-ovary coculture of *C. chinense* was conducted following the same methodology previously described for anther culture on solid medium. Additionally, ovaries from each anther-donor floral bud were transversely

dissected. The ovary sections were placed alternately and spaced between the anthers, positioning the ovules in direct contact with the culture medium.

Temperature treatment

An additional experiment with anthers cultured on solid NN medium subjected to a heat shock treatment was carried out. A set of newly established anther cultures, under T0 and T2 culture conditions, were incubated at 35°C for different time lapses in the dark, and then transferred to a standard growth chamber set at 25°C in continuous darkness during 15 days. The development of the untreated and treated groups of anthers was monitored in parallel for further comparison.

Culture monitoring and sample collection

Cultures were monitored for eight weeks following their establishment, using a Leica M205 FA stereoscope. Morphogenic response quantification was based on the visualization of structural changes in anthers. Androgenic response was also confirmed by microscopy. For this purpose, responsive anthers were selected and prepared using the squash method for microscopic observation using a phase-contrast microscope ZEISS Axioplan, with endosed digital camera Axio Cam CC5. Some slides were stained with 5 μ L of 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (400 μ M). The stained preparations were incubated in the dark for two hours, and then observed in an Olympus Fluoview IX81 confocal fluorescence microscope at 40X magnification. Fluorescence images were processed with Olympus Fluoview Software, version 4.2.

Macroscopic morphogenic structures resembling embryos were collected after 30 days of culture and stored in an ultrafreezer at -80°C for further gene expression analyses.

Gene expression analysis

RNA extraction and cDNA synthesis.

For comparative gene expression analysis, total RNA was extracted from the samples listed in Table 2 using 1 mL of TRIzol reagent and 200 mg of each sample, following the protocol by Chomczynsky and Sacchi (1987). The extracted RNA was treated with DNase I (Invitrogen) as per the manufacturer's instructions and its integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis.

cDNA synthesis was performed using 1 μ L of Oligo-dT (Invitrogen) and 1 μ L of dNTP (10 mM) in a final volume of 10 μ L with nuclease-free water. To this mixture, 2 μ L of RNA (70 ng/ μ L) was added, incubated at 65°C for 5 minutes, then transferred to ice for 1 minute. Subsequently, 2 μ L of DTT (0.1 M), 4 μ L of 5x First-Strand Buffer, 1 μ L of RNase OUT, and 1 μ L of RT-SuperScript III (Invitrogen) were added. The reaction was carried out at 50°C for 40 minutes, followed by a final incubation at 70°C for 15 minutes.

Table 2: Samples for gene expression analysis and its identifier

Identifier	Sample description
ACI	Individually-cultured anthers
ACO	Anthers cocultured with ovaries
OCA	Ovaries cocultured with anthers
ES	Somatic embryos
EC	Zygotic embryos
AST	Untreated anthers
OST	Untreated ovaries

Primers design

Primers for *BBM* (HM345995) and *LEC* (HM345996) were designed based on the DNA sequences of these genes in *Capsicum annuum*, available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, using the indicated accession numbers. Primer design was conducted using Primer3 and NCBI Primer Tool, following the recommended parameters for quantitative PCR: a length of 20-25 bp, a GC content of 50%, and amplicon sizes of 90-200 bp. Primers were synthesized by Invitrogen, with and its sequence, melting temperature (T_m) and fragment length (FL) as listed in Table 3.

Table 3: Designed primers for *BBM* and *LEC* amplification

Gene	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'	T_m (°C)	FL (bp)
<i>BBM</i>	GTTGCACACTTGAGAAGG	CTAGCTTGCCATCTACCA	58	98
<i>LEC</i>	CCGATAGCCAACGTGATTC	GAACTCGGACACGCATTC	60	102

qRT-PCR

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was conducted using primers specific to genes *BBM*, *LEC*, and reference gene *UBI3*. Amplification reactions (25 μ L per reaction) comprised 12.5 μ L Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific, California, USA), 0.3 μ M of

each primer, and 2 μL of cDNA template, corresponding to 100 ng/ μL . Reactions were carried out on an Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System (California, USA). The thermal cycling protocol consisted of an initial denaturation at 95°C for 20 seconds, followed by 40 cycles at 95°C for 3 seconds, then 60°C for 1 minute. Each sample was analyzed in triplicate for technical accuracy, across three independent experiments. Untreated anther and ovary tissues were used as control samples, with the relative gene expression quantified using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). A non-template control (NTC) was included to ensure no formation of non-specific amplification products. Dissociation curves were generated post-amplification to confirm the specificity of the products, with a temperature range from 65°C to 95°C, increasing by 0.5°C every 5 seconds.

Statistical analysis

Statistical analysis was conducted to evaluate the significance of differences between treatment means. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) to determine the overall effects of treatments. Duncan's Multiple Range Test was subsequently applied as the post hoc test to identify statistically significant differences among the group means. All statistical analyses were performed using the software package SPSS version XX (IBM Corp., Armonk, NY, USA), with a significance level set at $p < 0.05$. Data are presented as mean \pm standard deviation.

Results

Characterization of the morphogenic response in anther cultures

To evaluate the efficacy of treatments used for morphogenesis induction, visual criteria were established to identify responsive anthers within the total population of cultured anthers. Anthers exhibiting significant morphological changes indicative of potential embryogenesis induction were classified as responsive (Figure 1). Based on these criteria, observed changes across the treatments were classified in three main categories: 1) theca opening (Figure 1, A-E); 2) callus formation (Figure 1, E-H); and 3) embryonic structure formation (Figure 1, I-M). Anther responses appeared progressively over the culture period in both solid and double layer medium. Theca opening was observed in the first 24 hours of culture. This response varied among the anther population, with observations of lobulated thecae (Figure 1, A), fully opened thecae releasing microspores into the medium (Figure 1, B), and partially opened thecae due to internal structure formation (Figure 1, C).

Callus formation and embryonic structures became visible after the first week of culture in solid anther culture. The calluses exhibited different appearances: translucent callus (Figure 1, E and F), friable cream-colored callus (Figure 1, G), and compact callus (Figure 1, H). Similarly, diverse structures were observed corresponding to all stages of embryonic development: globular (Figure 1, I), heart (Figure 1, J), torpedo (Figure 1, K), and cotyledonary stages (Figure 1, L and M). Early structures up to the torpedo stage displayed normal morphology characteristic of dicot embryonic development. However, advanced-stage embryos exhibited morphological abnormalities that restricted further development and germination.

On the other hand, no callus formation was observed in anthers cultured in double layer medium. In this procedure, anther responsiveness was limited to theca opening and the embryo-like structures observed were smaller than those observed in solid medium. Additionally, embryo-like structures derived from microspores were observed in preparations made from morphogenic anthers collected from both types of culture (Figure 1, N-P). A significant number of induced microspores were observed in slides prepared through squash of responsive anthers (Figure 1, N). DAPI staining confirmed the presence of multicellular structures emerging from the exine wall, five times the size of a non-responsive microspore (Figure 1, O and P).

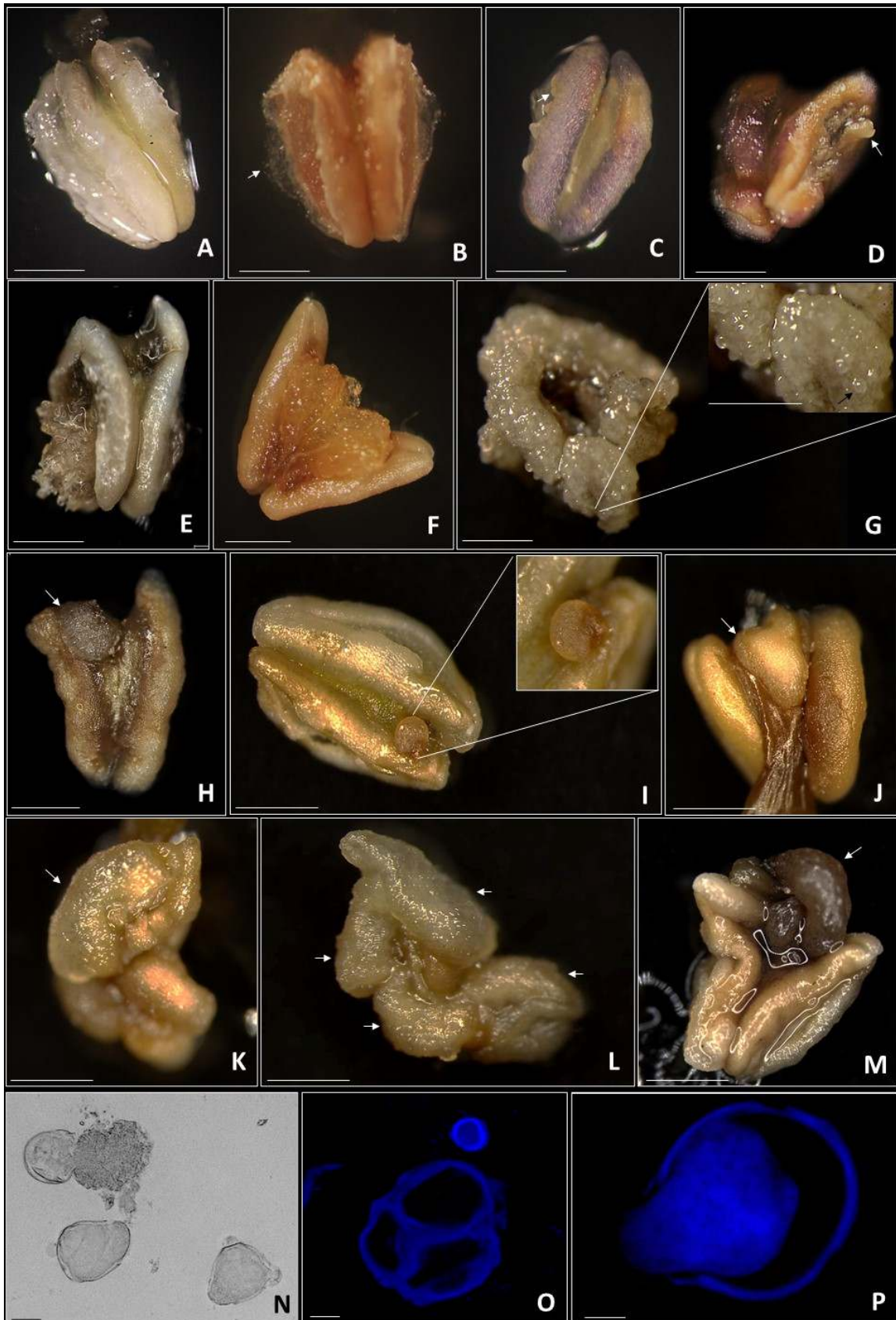


Figure 4.1: Morphological changes observed in cultured anthers. A-E) Anthers with dehiscent thecae: A) Lobulated opening of thecae; B) Fully open thecae with microspore release into the medium; C) Partial opening of thecae due to internal structure formation; D) Elongated embryo-like structure emerging from within the pollen sac. E-H) Callus formation in anthers: E) Translucent callus emerging from the pollen sac; F) Translucent callus in the central zone of the anther; G) Embryogenic callus covering the anther surface, highlighting globular structure formation. H-M) Embryonic structures: I) Early globular-stage embryo; J) Heart-stage embryo; K) Torpedo-stage embryo; L-M) Advanced-stage embryonic structures emerging from within the anther. N) Field of microspore-derived multicellular structures isolated from responsive anthers. O, P) DAPI-stained microspore-derived multicellular structures.

Differential embryo and callus production

In this study, the effect of 16 treatments with PGR was evaluated in conjunction with three different methods for anther culture, and the results were compared as shown in Figure 2. For the anther-ovary co-culture method, only treatments T0 to T9 were assessed. Induction capacity in each medium was initially measured by counting responsive anthers (RA). In both solid and double-layer media, most treatments with PGR concentrations above 0.1 mg L^{-1} demonstrated similar efficiency in terms of RA percentage (ranging from 20% to 35%). However, the same treatments evaluated in co-cultures with ovaries showed significantly higher RA percentages (ranging from 60% to 70%).

The formation of embryo-like structures (ELS) was more prominent in anthers cultured on solid media and in co-culture conditions. ELS formation was limited to treatment groups that included NAA/KIN and 2,4-D/KIN combinations, within a narrow concentration range for each culture method. Treatments 2 and 6 (0.5 mg L^{-1} of PGR) were the only ones capable of inducing ELS formation across all three culture methods, with significantly higher efficiency observed in co-cultured anthers (yielding between 14 and 18 ELS per Petri dish). Callus formation was observed exclusively in solid and co-cultures and was significantly more abundant in treatments with higher PGR concentrations: treatments 3 and 7 (1.0 mg L^{-1}) and treatments 4 and 8 (2.0 mg L^{-1}). Additionally, callus proliferation was enhanced under co-culture conditions, where callus formation was detected in almost all cultured anthers.

In general terms, treatments with the NAA/ZEA and 2,4-D/ZEA combinations (T9-T16) were found to be less efficient in inducing the morphogenic responses quantified in this study, and no embryonic structure formation was evident. Treatments with the lowest evaluated

concentrations (0.1 mg L⁻¹ of PGR) and T0 showed no morphogenic response, except in co-cultures with ovaries where minimal levels of induction were detected.

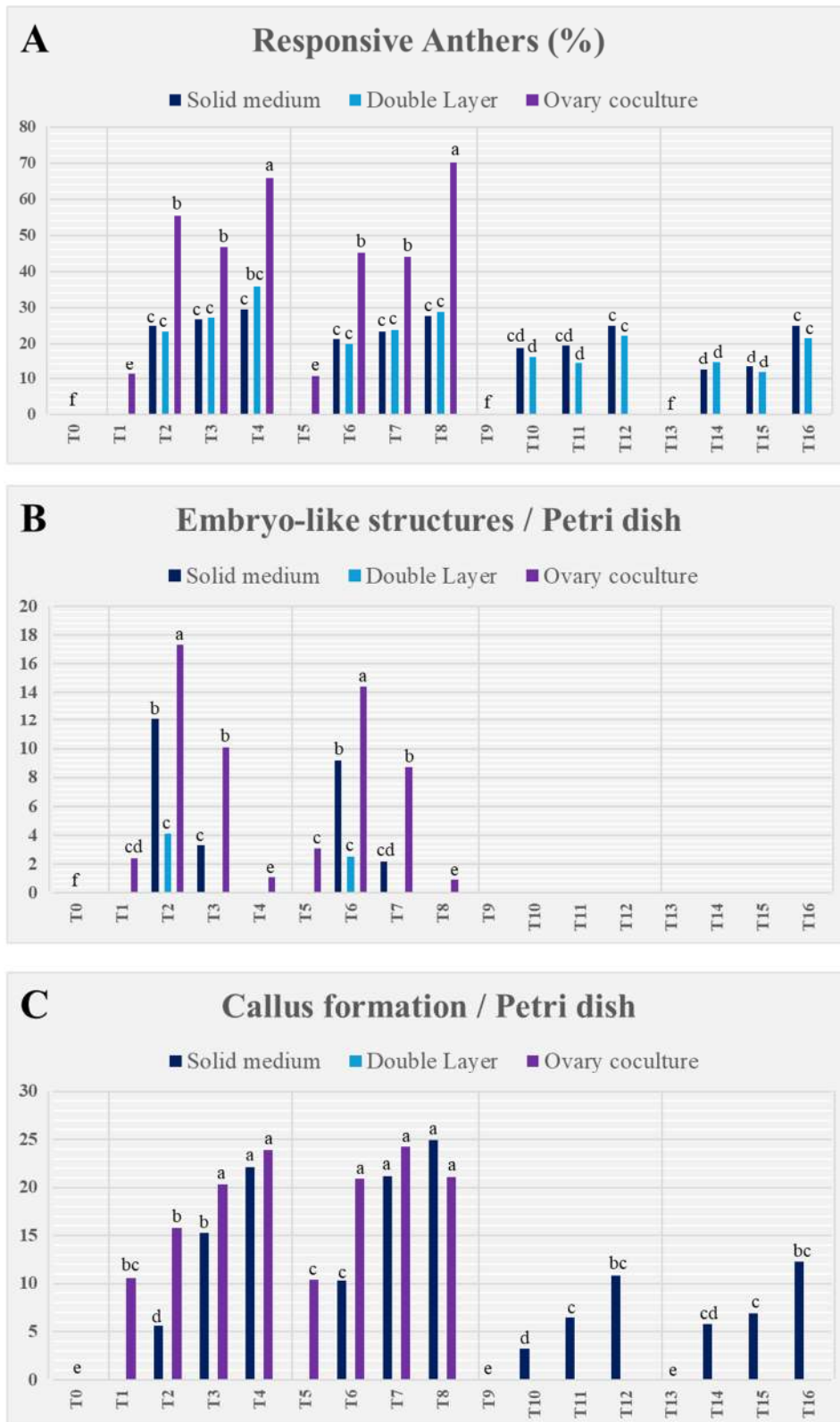


Figure 4.2: Graphical representation of the different types of morphogenic responses quantified to assess the efficiency of PGR treatments across various culture methods. Each graph is segmented into the five treatment groups corresponding to T0 (no PGR), T1-T4 (NAA/KIN), T5-T8 (2,4-D/KIN), T9-T12 (NAA/ZEA), and T13-T16 (2,4-D/ZEA). Results for each of three evaluated culture methods are represented with different colored bars. Different letters indicate statistically significant differences among genotypes ($p \leq 0.05$).

Effect of heat shock treatment in embryo production

Heat shock treatment at 35°C for 24 hours induced lateral thecae dehiscence in all anthers, regardless of the presence of plant growth regulators (PGR). However, no embryo-like structures (ELS) were formed in anthers cultured on basal medium without PGR (T0). In contrast, heat shock notably increased the number of ELS in anthers treated with T2 (0.5 mg·l⁻¹ NAA/KIN), although extending this treatment beyond two days decreased both the efficiency of ELS production and overall cell viability. Additionally, heat shock, with or without PGR, promoted callus formation, especially with prolonged exposure. Callus formation increased gradually over three days in T0 anthers, whereas T2 anthers showed limited callus formation and minimal ELS production when heat shock treatment was extended to the third day.

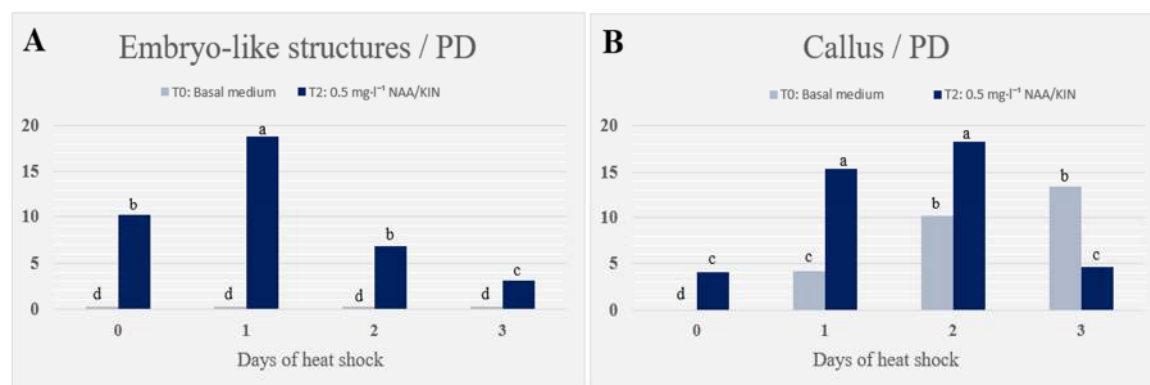


Figure 4.3: Effect of heat shock and exposure periods on the formation of embryo-like structures (A) and callus production (B) in anthers cultured in NN basal medium (T0) and 0.5 mg·l⁻¹ NAA/KIN (T2).

Ovule-derived embryo formation in anther-ovary cocultures

Differentially induced morphogenic response was also observed in the ovary tissues cocultured with anthers (Figure 4). The predominant response was the abundant formation of translucent proliferative callus originating from the ovary walls (Figure 4 B). However,

upon examining the tissue area in direct contact with the culture medium, elongated individual structures were observed emerging from ovules (Figure 4 C), lacking any vascular connection to the ovary tissue (Figure 4 D, E). In ovaries cultured for 30 days, these structures developed into advanced-stage embryos, in which formation of both apical and radicle poles was clearly visible, along with distinguishable cotyledon development (Figure 4F).

Table 4 presents the results of the differential morphogenic response quantification derived from ovary tissues co-cultured with PGR treatments (T1-T7). All evaluated treatments were capable of inducing callus and ELS formation in the cultured ovaries. Callus formation was enhanced by high PGR concentrations in the culture medium, with callus observed in all tissue sections cultured under treatments T3, T4, T7, and T8, which did not significantly differ from the counts obtained for T2 and T6.

The number of ELS counted in treatments 3 and 7 (1.0 mg L^{-1}) with NAA/KIN and 2,4-D/KIN, respectively, was significantly higher than in other treatments (between 12 and 15 ELS per Petri dish) and did not show a differential response to the various PGR combinations evaluated. Treatments with the lowest (0.1 mg L^{-1}) and highest (2.0 mg L^{-1}) concentrations exhibited a significantly lower morphogenic response compared to the other concentrations assessed.

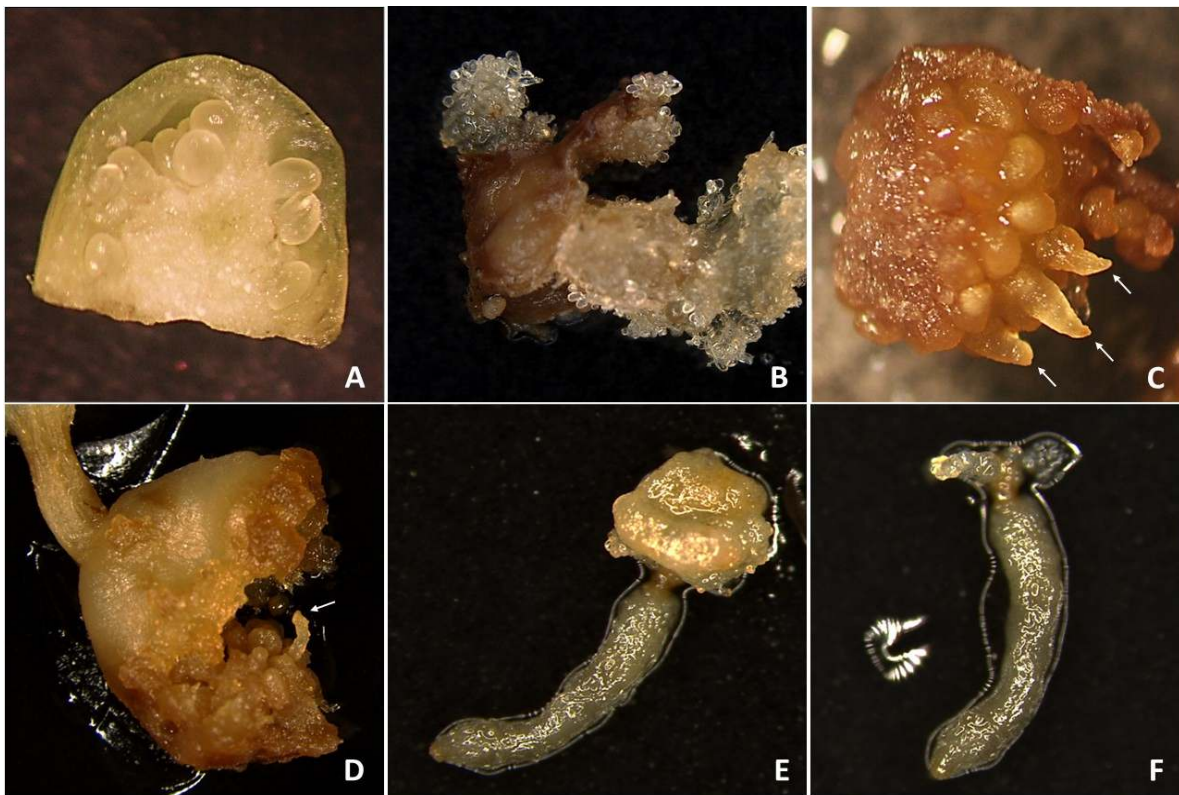


Figure 4.4: Morphogenic response of ovaries in co-culture with anthers. A) Cross-section of an uncultured ovary. B) Proliferation of translucent callus originating from the ovary walls. C) Induced and elongated ovules attached to the ovary in culture. D-F) Sequence of extraction of a cotyledonary-stage embryo derived from an ovary in culture. D) Elongated embryonic structure protruding from the cultured ovary. E) Embryonic structure extracted along with the embryo sac, showing no vascular connection. F) Cotyledonary-stage embryo with developed radicle and shoot apices.

Table 4: Differential morphogenic response to PGR treatments observed in ovaries cocultured with anthers

T	PGR: AUX/CK	C (mg.l ⁻¹) 1:1	Ovary coculture	
			Callus / PD	ELS / PD
1	NAA/KIN	0.1	2.8 ^b	1.5 ^d
2		0.5	7.1 ^a	9.3 ^b
3		1.0	10 ^a	15.8 ^a
4		2.0	10 ^a	5.1 ^c
5	2,4-D/KIN	0.1	4.3 ^b	2.1 ^d
6		0.5	8.9 ^a	7.5 ^b
7		1.0	10 ^a	12.1 ^{ab}
8		2.0	10 ^a	3.9 ^c

T: Treatment; PGR: Plant growth regulator; C: Concentration; ELS: Embryo-like structures; PD: Petri dish. Different letters indicate statistically significant differences among genotypes ($p \leq 0.05$).

Somatic embryo obtention

As a result of the induction protocol with 2,4-D in *C. chinense*, a high number of somatic embryos were obtained, with an overall efficiency of 1.55×10^4 embryos per liter of medium. The early embryos that proliferated from the hypocotyl tissue displayed characteristic morphology of the globular and heart developmental stages (Figure 5, A). More advanced developmental stages exhibited deformations like those described in somatic embryos of the *Capsicum* genus (Figure 5, B). These malformations were all associated with dysfunctional apical meristem development, giving rise mainly to pin-formed or fused-cotyledon embryos. Somatic embryos embedded in liquid histodifferentiation medium, with no vascular connection with the hypocotyl tissue were collected, frozen with liquid nitrogen and stored for further genetic analysis.

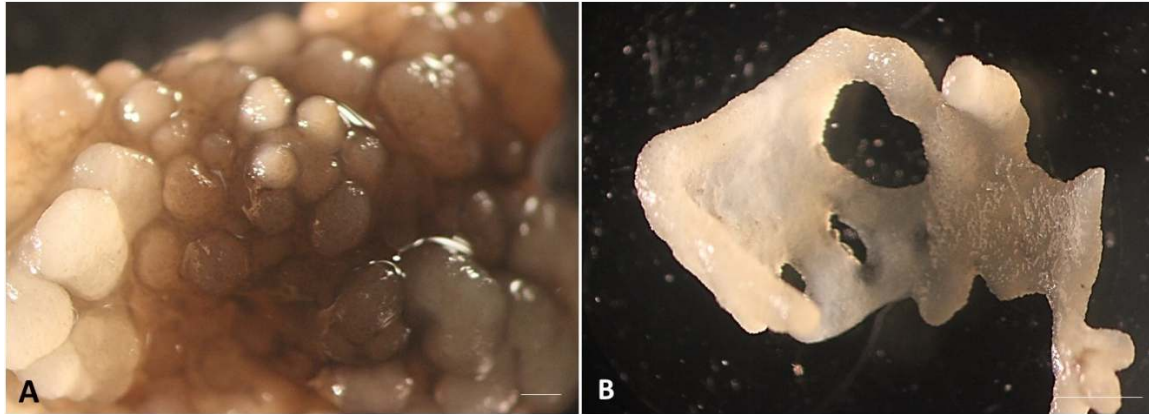


Figure 4.5: Somatic embryos of habanero pepper. A) Ealy somatic embryos proliferating from hypocotyl tissue. B: Abnormally-developed somatic embryo in advanced stage of development

Expression of *BBM* and *LEC* TFs in morphogenic structures

Expression analysis was conducted to confirm the embryogenic nature of the morphogenic tissues collected from the cultures. The relative quantification of *BBM* and *LEC* transcripts was performed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with the *UBI3* reference gene used for data normalization. The expression of both embryogenesis marker genes was detected in the total cultured tissues as well as in zygotic embryos. The qPCR results for the controls, corresponding to untreated anther and ovary samples (AST and OST) were not included in the graphs, as gene expression of *BBM* and *LEC* genes was undetectable in these tissues. Therefore, for the calculation of relative expression compared to the control, a Ct value of 40 was assigned to these samples. Figure 5 presents the graphical results corresponding to the transcript expression levels of the *BBM* and *LEC* genes in treated samples and the positive control provided by the zygotic embryo sample.

The relative expression of *BBM* gene differs significantly between all tissues analyzed. *BBM* was preferentially expressed in cultured tissues than in zygotic embryos, with the exception of individually-cultured anthers (ACI), where the expression of this gene was almost indetectable. Co-cultured anther samples (ACO) showed significantly higher expression levels compared to those cultured individually (ACI), however, this quantification was half the transcript accumulation observed in ovary tissues co-cultured with anthers (OCA). On the other hand, the highest *BBM* transcript accumulation was detected in the early somatic embryo sample (EST).

Contrary to *BBM* gene, the *LEC* expression levels quantified in the zygotic embryo (EC) were higher, but no significantly different to those of the somatic embryo (EST) and

cocultured ovary samples (OCA). The relative expression of this gene in the ACI and ACO samples was significantly lower, with the lower transcript accumulation detected in tissues of cocultured anthers

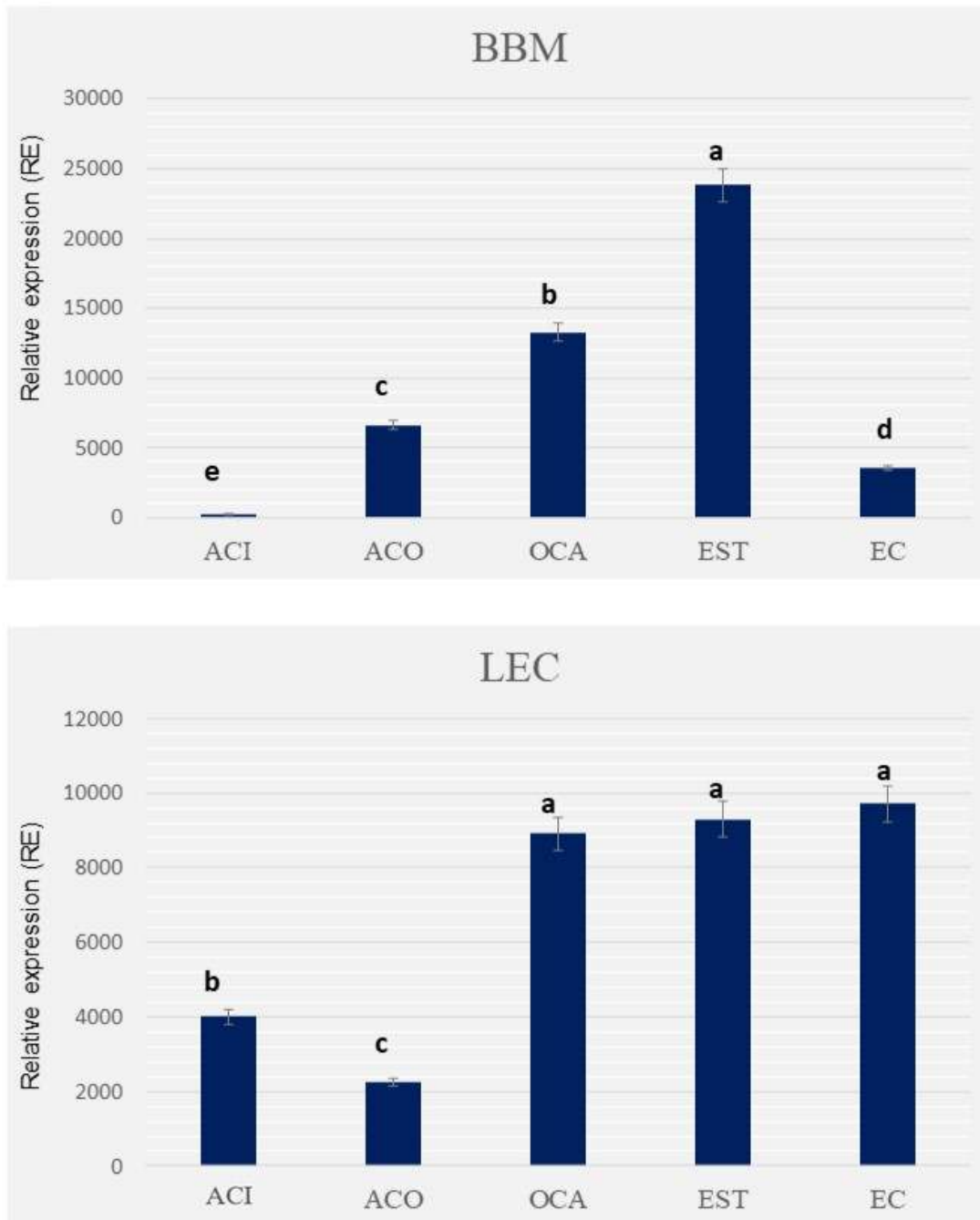


Figure 4.6: Relative quantification of *BBM* and *LEC* transcripts in different samples: ACI: Individually cultured anthers; ACO: Anthers co-cultured with ovaries; OCA: Ovaries co-cultured with anthers; ES:

Somatic embryo; EC: Zygotic embryo; AST: Untreated anther; OST: Untreated ovary. Different letters indicate significant differences between mean values represented (n=4; p<0.05).

Discussion

Androgenesis has previously been studied in *Capsicum* genus, leading to the establishment of protocols for inducing this process and for regenerating haploid and doubled haploid plants from anther and microspore cultures. However, these protocols have shown limited reproducibility across different genotypes due to the inherent recalcitrance of *Capsicum* to *in vitro* culture. Few studies have included *C. chinense* varieties specifically for androgenesis induction, with hybrids being more commonly used (Olsewska *et al.*, 2020). This study represents the first report of androgenesis induction via anther culture in *C. chinense*. Microscopic monitoring allowed the observation of microspore-derived embryos formed inside the anthers during the first days of culture. Macroscopic embryos formed on anthers surface were also observed, morphologically analyzed and compared with somatic embryos. Although the early stages appeared normal and were similarly formed, both types of embryos exhibited comparable SAM deformations. This finding aligns with previous reports in the *Capsicum* genus, indicating recalcitrance manifests consistently across various tissue culture techniques. Such recalcitrance affects the efficiency of androgenesis protocols and is similarly problematic in somatic embryogenesis within the genus (Supena *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2020; Ozsewska *et al.*, 2021).

Androgenic efficiency of anther culture can also be enhanced through the combination of different culture methods, growth regulator treatments, and variations in parameters like temperature. Lantos *et al.*, 2009 demonstrated that co-culturing *C. annuum* microspores with wheat ovaries significantly improved haploid embryo production. Based on these findings, this study implemented anther and ovary co-culture in solid NN medium, which was found to be the most efficient method for producing embryos and callus across all PGR treatments evaluated. Furthermore, advanced-stage embryo development from cultured ovules was observed, likely induced by direct hormonal stimuli from the medium. The induction of gynogenesis from unfertilized ovules is an unusual result that has not been previously reported in *Capsicum*, as this method is rarely applied for haploid and doubled haploid production in the genus. However, there is evidence of its broader use in various species, including solanaceous plants such as *Solanum lycopersicum*, *S. melongena*, and *Nicotiana tabacum* (Sohrabi *et al.*, 2021; Baktemur *et al.*, 2022; Metin *et al.*, 2024; Marín-Montes *et al.*, 2022). Ovule-derived cotyledonary embryos showed normal development of the apical meristem and cotyledons, contrasting with microspore-derived embryos and somatic

embryos observed in this study. These findings highlight unfertilized ovule culture as a viable method for obtaining normally shaped embryos in *C. chinense*.

Evaluating growth regulator treatments is essential for designing new protocols for embryogenesis induction, particularly in recalcitrant species. In this study, 16 treatments were evaluated, consisting of four concentrations of four auxin-cytokinin combinations. Generally, morphogenic response induction was more pronounced in treatments that included KIN, regardless of the auxin type used. Moreover, an optimal concentration range specific to each tissue type was identified. In anther cultures, embryo formation was favored at relatively low growth regulator concentrations (0.5 mg L^{-1}), with no morphogenic response observed at lower concentrations. In contrast, ovule embryogenesis was maximized at twice this concentration (1.0 mg L^{-1}). Notably, in co-cultures, morphogenic responses were visible in both anthers and ovules even in the absence of growth regulators, likely due to hormonal signal exchange between the tissues. At the highest concentration evaluated (2.0 mg L^{-1}), PGR combinations induced proliferative tissue responses, promoting callus formation. Haploid embryos or shoots derived from microspore-derived callus highlight the potential utility of enhancing this morphogenic response.

The findings of this study indicate that heat shock treatment can significantly influence the morphogenic response of *Capsicum chinense* anther cultures. Specifically, the absence of ELS in T0 anthers (without PGRs) contrasts with the increased ELS formation observed in T2-treated anthers, suggesting while heat shock can induce thecae dehiscence, presence of growth regulators is essential for successful ELS development. This observation aligns with prior research by Supena *et al.* (2006), who reported auxin and cytokinin combinations, play a crucial role in triggering embryogenesis in *C. annum* anther cultures. However, the detrimental effect of prolonged heat treatment on ELS production and cell viability also reflects findings by Germana (2011), who noted that while heat shock can enhance androgenic response, excessive exposure can lead to tissue degradation. Additionally, the study's observation that callus formation was promoted regardless of PGR presence but increased over time suggests a stress-induced response, which has been reported in other studies. For instance, Dolcet-Sanjuan *et al.* (1997) found that *Capsicum annum* anthers subjected to prolonged stress conditions tend to favor callus formation over organized embryogenesis. Similarly, Lantos *et al.* (2009) highlighted that controlled stress conditions can be beneficial for callogenesis, although they noted that the optimal duration for such treatments must be carefully calibrated to balance callus and embryo formation.

Expression of *BBM* and *LEC* genes in cultured tissues provides insights into the embryogenic potential of *C. chinense in vitro*. High *BBM* expression is associated with active cell proliferation and reprogramming, essential for embryogenic potential, while *LEC* is crucial for embryogenesis initiation by maintaining cell identity and preventing early differentiation. In this study, the embryonic nature of the morphogenic structures was confirmed through *BBM* and *LEC* expression analysis. The transcript accumulation of these transcription factors indicates embryogenic program induction, regardless of embryo origin (zygotic, somatic, gametic, or callus-derived) (Karim *et al.*, 2018). Differential expression patterns suggest gene regulation by tissue-specific factors and culture conditions. Higher *BBM* expression in somatic embryos underscores its role in promoting embryogenesis in non-gametophytic tissues, while *LEC*'s presence in ovary co-cultures aligns with its function in embryo patterning and cotyledon formation. By demonstrating that high *BBM* and *LEC* gene expressions are closely linked to embryogenic response, this study offers valuable molecular insights, revealing specific gene expression patterns involved in embryo formation during embryogenesis in different tissues, including gametic cells.

Conclusion

This research presents pioneering advancements in androgenesis and gynogenesis induction in *C. chinense*, establishing new pathways for embryo obtention and providing a reproducible method that potentially overcomes this genus's *in vitro* recalcitrance. The implications of these findings are profound for *Capsicum* genetic improvement, as they offer two alternative methods for creating haploid and doubled haploid plants, potentially used as elite parental lines. By addressing a key gap in *C. chinense* embryogenesis research, these findings pave the way for innovative tissue culture techniques that hold potential for enhancing breeding strategies and developing *Capsicum* cultivars with improved agronomic traits.

Supplementary files

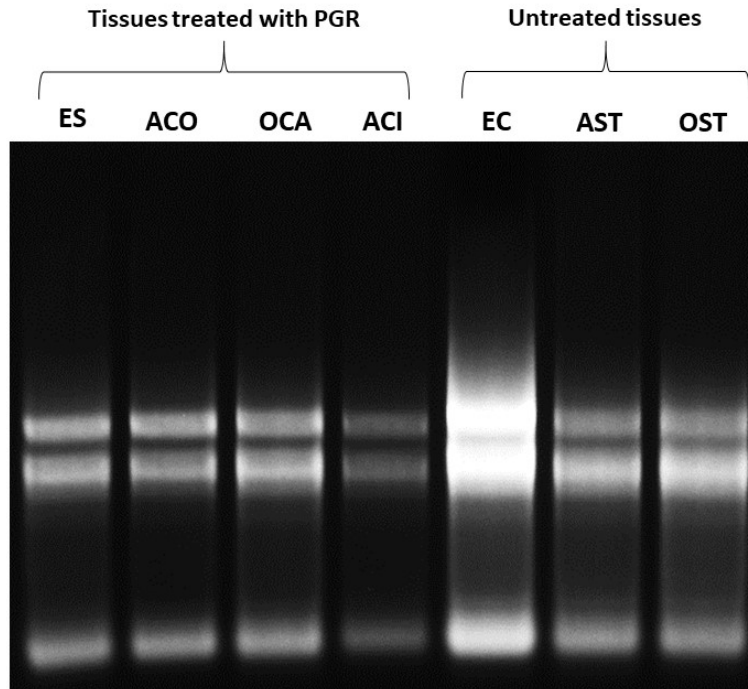


Figure 4.7: Integrity of total RNA extracted from different tissues of *C. chinense*. ACI: Individually cultured anthers; ACO: Anther co-cultured with ovaries; OCA: Ovaries co-cultured with anthers; ES: Somatic embryo; EC: Zygotic embryo; AST: Untreated anther; OST: Untreated ovary.

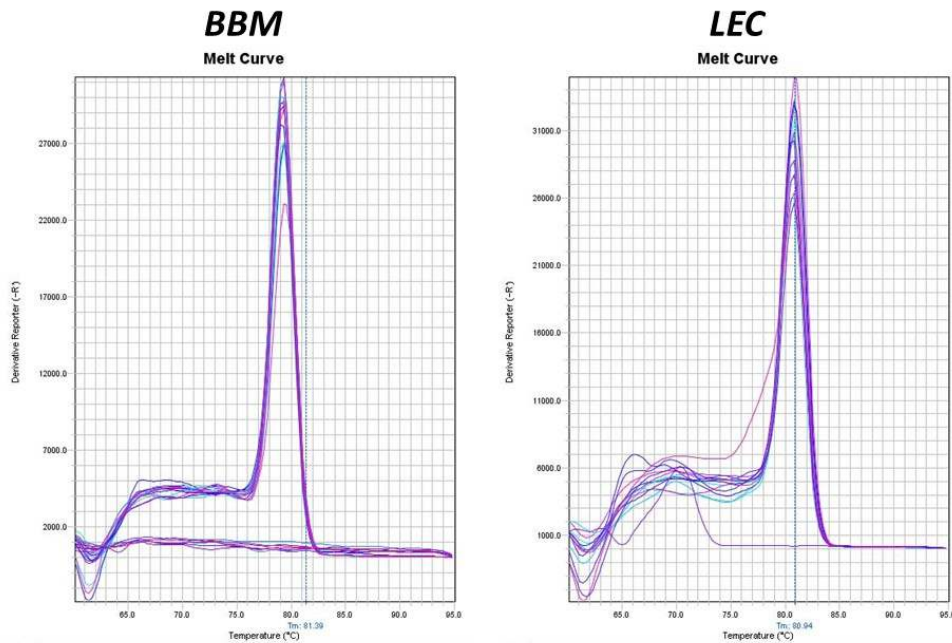


Figure 4.8: Dissociation curve of the putative fragments of the *LEC* and *BBM* genes in *Capsicum chinense* from treated and untreated morphogenic tissue samples.

References

- Abdollahi, M. R., Darbandi, M., Hamidvand, Y., & Majdi, M. (2015). The influence of phytohormones, wheat ovary co-culture, and temperature stress on anther culture response of watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Brazilian Journal of Botany*, 38, 447-456.
- Ata, A., Keleş, D., TAŞKIN, H., & Büyükalaca, S. (2019). Effects of season, genotype, and nutrient medium on pepper anther culture and microspore development. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(2), 123-137.
- Baktemur, G., Keleş, D., Kara, E., Yıldız, S., & Taşkın, H. (2022). Effects of genotype and nutrient medium on obtaining haploid plants through ovary culture in cucumber. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5451-5458.
- de Vaulx, R. D., Chambonnet, D., & Pochard, E. (1981). Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35° C. *Agronomie*, 1(10), 859-864.
- Islam, M. T., & Tuteja, N. (2021). Recent advances in understanding microspore embryogenesis: Revisiting basics and applications. *Frontiers in Plant Science*, 12, 685950.
- Islam, M. T., Arif, M. R., Hasan, M. T., & Robin, A. H. K. (2023). Anther Culture in Crop Plants: Progress and Perspectives. *Plant breeding and biotechnology*, 11(2), 69-96.
- Jha, K., Choudhary, P. K., & Agarwal, A. (2022). Optimization of important factors for efficient embryogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* var. *grossum* L.) using anther culture technique. *NeuroQuantology*, 20(8), 6051.
- 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, 741-751.
- Kim, D. H., Kang, J. H., & Kim, H. T. (2021). The molecular regulatory network of microspore embryogenesis. *Plant Reproduction*, 34(2), 89-98.

- Kumari, M., Singh, M., & Tiwari, S. (2020). Advances in anther culture for haploid and doubled haploid plant production. *Biotechnology Advances*, 43, 107576.
- Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., ... & Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97, 285-293.
- Lantos, C., & Pauk, J. (2021). Factors influencing the efficiency of wheat anther culture. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 62(2), 7-16.
- Li, H., Zhang, H., & Sun, T. (2021). The *AP2/ERF* transcription factor *BBM* regulates auxin homeostasis and organ development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 108(1), 1-14
- Mangal, M., Sahana, K. P., Srivastava, A., Khar, A., Jain, N., Jain, P. K., ... & Harun, M. (2023). Haploid induction through microspore embryogenesis in Bell pepper genotypes.
- Ma, L., Chen, L., & Zhang, F. (2021). Liquid media applications in isolated microspore culture and its impact on embryo development. *Plant Biotechnology Journal*, 19(6), 1189-1201.
- Marin-Montes, I. M., Rodríguez-Pérez, J. E., Robledo-Paz, A., de la Cruz-Torres, E., Peña-Lomelí, A., & Sahagún-Castellanos, J. (2022). Haploid induction in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) via gynogenesis. *Plants*, 11(12), 1595.
- Metin, D., Atakul, Z., Kurtar, E. S., Seymen, M., Alan, A. R., & Toprak, F. Ç. (2024). Callogenesis, embryogenesis, and plantlet initiation in citron watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) via anther and unfertilized ovary culture. *Scientia Horticulturae*, 337, 113493.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3).
- Nowaczyk, P., Nowaczyk, L., Olszewska, D., & Krupska, A. (2009). Androgenic response of genotypes selected from *Capsicum annuum* L. × *C. chinense* Jacq. hybrids. *Acta physiologiae plantarum*, 31, 877-879.

- Nowaczyk, P., Niemirowicz-Szczytt, K., & Kisiąła, A. (2019). Recent advances in androgenesis induction in *Capsicum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 138(2), 345-356.
- Olszewska, D., & Tomaszewska-Sowa, M. (2021). Androgenesis—Technology for Obtaining Genetically Stable Breeding Material of *Capsicum annuum* L. *Agriculture*, 12(1), 19.
- Popova, T., Grozeva, S., Todorova, V., Stankova, G., Anachkov, N., & Rodeva, V. (2016). Effects of low temperature, genotype and culture media on *in vitro* androgenic answer of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 1-11.
- Pattanayak, S., & Gnanam, R. (2017). Gynogenic approach of haploid induction in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Indian Research Journal of Genetics and Biotechnology*, 9(04), 469-477.
- Singh, D., Swapnil, A. S., & Kumar, M. (2020). Androgenesis: A valuable technique to shorten the breeding cycle. *Food Sci Rep*, 1, 18-20.
- Sohrabi, S., Abdollahi, M. R., Mirzaie-Asl, A., Koulaei, H. E., Aghaezadeh, M., & Seguí-Simarro, J. M. (2021). A refined method for ovule culture in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146, 259-267.
- Supena, E. D. J. (2021). An efficient anther culture on double-layered media to produce doubled haploid plants of pepper (*Capsicum annuum*). *Doubled Haploid Technology: Volume 2: Hot Topics, Apiaceae, Brassicaceae, Solanaceae*, 267-278.
- Tatar, M. (2023). Anther Culture Method on Haploid Plant in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(3), 2095-2105.
- Yi, X., Chen, J., & Zhu, Y. (2022). Recent advances in microspore culture for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Reports*, 41(3), 421-435.
- Ying, F., Meng-xiang, S., Hong-yuan, Y., & Chang, Z. (1997). *In Vitro* Divisions of Unfertilized Central Cells and Other Embryo Sac Cells in *Nicotiana tabacum* var macrophylla. *Journal of Integrative Plant Biology*, 39(8).

Zhang, L., Zhou, Y., & Cheng, Z. (2020). Auxin-cytokinin crosstalk in regulating anther culture embryogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(9), 1421-1430.

Zhang, X., Liu, J., & Zhang, X. (2021). Transcriptional regulation of embryogenic competence by *LEAFY COTYLEDON* proteins. *Molecular Plant*, 14(8), 1180-1192

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

Esta investigación aborda los desafíos de la recalcitrancia *in vitro* de *Capsicum chinense*, una especie de gran importancia económica, social y cultural en la Península de Yucatán. La regeneración de esta especie se ha visto limitada por la baja respuesta a los métodos convencionales de cultivo de tejidos, lo cual ha dificultado la implementación de estrategias biotecnológicas para su mejoramiento genético. En respuesta a estos retos, se estudió la androgénesis como ruta morfogénica alternativa a la embriogénesis somática y como medio para facilitar la generación de líneas haploides y dobles haploides, esenciales para acelerar los programas de mejoramiento genético convencional. Aunque este método de CTV ha sido aplicado con éxito en el género *Capsicum*, existen muy pocos trabajos que hayan incluido genotipos de *C. chinense* en la evaluación de protocolos por lo que, hasta el momento, se desconocía el potencial androgénico de la especie, así como las condiciones óptimas para su inducción en la especie. En este trabajo se estudiaron exhaustivamente los factores clave para lograr la inducción de embriogénesis a partir del gameto masculino, partiendo del establecimiento del material vegetal donante de explante.

Uno de los resultados más relevantes de este estudio fue la inducción exitosa de embriogénesis a partir de microsporas, un logro significativo que permite avanzar en el desarrollo de metodologías eficientes para superar la recalcitrancia de *C. chinense*. Al evaluar diferentes métodos de cultivo y tratamientos con reguladores de crecimiento (PGR), se determinó que las combinaciones de NAA/KIN y 2,4-D/KIN, en conjunto con un tratamiento de choque térmico a 35°C, promovieron eficazmente la formación de estructuras similares a embriones (ELS). Estos resultados son coherentes con estudios previos en *Capsicum annuum*, donde tratamientos similares han mejorado la respuesta androgénica (Supena et al., 2006). Sin embargo, se observó que la prolongación del choque térmico más allá de dos días comprometía la viabilidad y la eficiencia del proceso, un hallazgo que coincide con las observaciones de Germana (2011) sobre la necesidad de un balance delicado en la duración de estos tratamientos para optimizar la respuesta androgénica en *Capsicum*.

Además, esta investigación presenta la primera documentación de ginogénesis en el género *Capsicum*, a través del cultivo de óvulos no fecundados. Durante los cocultivos de anteras y óvulos, se observaron embriones en estadios avanzados que mostraban

meristemas apicales bien definidos y formación de cotiledones, lo cual evidencia el potencial de esta técnica para la producción de haploides y dobles haploides. Este resultado es inusual en *Capsicum*, pero encuentra precedentes en especies relacionadas como *Nicotiana tabacum*, donde se ha logrado la embriogénesis a partir de óvulos bajo condiciones específicas.

La validación de la embriogénesis se complementó con el análisis de expresión de los genes *BBM* y *LEC*, los cuales mostraron niveles de expresión más altos en los tejidos diploides como los embriones cigóticos y somáticos. En cambio, en las muestras derivadas de células gaméticas, que se presume conservan la mitad del genoma original, los niveles de expresión fueron más variables. Esto sugiere que el contenido de ploidía podría influir en la actividad transcripcional relacionada con la competencia embriogénica, observándose que las estructuras diploides soportan una expresión robusta de estos genes. Los resultados se alinean con estudios previos que han documentado la importancia de *BBM* y *LEC* en la promoción de la embriogénesis y en la regulación de la identidad celular en otros sistemas modelo.

En conjunto, este trabajo ofrece una base sólida para el desarrollo de métodos de cultivo de tejidos en *C. chinense* mediante la inducción de embriogénesis gamética. Las técnicas de androgénesis y ginogénesis presentadas no solo representan alternativas viables para la obtención de líneas haploides, sino que también abren nuevas vías para abordar la recalcitrancia del género *Capsicum*. Estas estrategias permiten establecer metodologías reproducibles que pueden implementarse en programas de mejoramiento genético, acelerando la obtención de cultivares con características agronómicas mejoradas y adecuadas para la región.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se estableció un sistema de embriogénesis a partir de diferentes métodos de cultivo de anteras y a partir de microsporas aisladas de chile habanero (*C. chinense* Jaqc.).

Se indujo un proceso de ginogénesis *in vitro*, un resultado no reportado con anterioridad en el género *Capsicum* y que podría constituir un método alternativo para la producción de dobles haploides.

La obtención de embriones por androgénesis fue limitada y los estadios avanzados mostraron las deformaciones características de los embriones somáticos de la especie.

Los embriones derivados del gameto femenino mostraron una morfología normal en estadios avanzados con un correcto desarrollo del meristemo apical y la formación de cotiledones.

Se dilucidaron otros factores clave necesarios para la inducción de androgénesis en chile habanero, los cuales se enlistan a continuación:

- Los botones florales en estadio de desarrollo óptimo presentan una proporción cáliz-corola 1:1 y contienen anteras color amarillo pálido con pigmentación violeta en el extremo distal y contienen microsporas vacuoladas en mayor proporción
- Se elaboró un protocolo eficiente de desinfección que permite reducir al mínimo la alta carga de contaminantes de los botones obtenidos en invernadero y conserva la viabilidad del tejido.
- Se comprobó la eficacia del ultrasonido (sonicación) como método de aislamiento que además constituye una alternativa mucho más simplificada con respecto a los métodos convencionales.
- El co-cultivo con ovarios fue el más eficiente para la obtención de estructuras embrionarias.
- Se demostró que los tratamientos que combinan auxinas y citocininas en concentraciones equivalentes son útiles para la inducción de androgénesis en el genotipo evaluado.
- Se comprobó que los genes marcadores de embriogénesis *BBM* y *LEC* se expresan solo en tejidos embriogénicos de origen cigótico, somático o derivado de gametos.

PERSPECTIVAS

Los resultados de un protocolo de androgénesis están determinados por una gran variedad de factores de naturaleza genética, fisiológica y ambiental. En este estudio se abordaron algunos de estos, sin embargo, aún queda mucho trabajo por hacer en la búsqueda de las condiciones óptimas para la aumentar la eficiencia del proceso y lograr la regeneración de plantas haploides y dobles haploides de *C. chinense*. A continuación, se enlistan las perspectivas a abordar en futuras investigaciones, basadas en el conocimiento que ya se tiene acerca de la androgénesis en chile habanero:

- Es necesario optimizar las condiciones de cultivo de las plantas donadoras de explante para garantizar la obtención de un material vegetal en condiciones fisiológicas óptimas para el cultivo *in vitro*, que además presente una menor carga de contaminantes. Se propone experimentar con el establecimiento de plantas en condiciones ambientales controladas.
- Aunque el protocolo de desinfección desarrollado demostró ser eficiente en la eliminación de contaminantes y el mantenimiento de un alto porcentaje de viabilidad, sería conveniente explorar enfoques alternativos que permitan reducir al máximo el uso de agentes químicos que puedan dañar el tejido a cultivar e influir de alguna manera en la respuesta morfogénica.
- Debido a que la respuesta androgénica puede variar significativamente en función del genotipo dentro de una misma especie, es de interés evaluar el potencial androgénico de diferentes variedades de chile habanero, las cuales también presentan rasgos de interés para la producción de DH y su utilización en el mejoramiento convencional de plantas.
- Aunque la androgénesis ha sido el enfoque principal, la ginogénesis también podría ser una vía alternativa para la obtención de individuos dobles haploides en *C. chinense*. Futuras investigaciones deberían explorar la viabilidad de este enfoque en más genotipos de *C. chinense*
- Sería conveniente evaluar otros tratamientos que pudieran potenciar la respuesta androgénica como: bajas temperaturas, la adición de vitaminas, poliaminas, otros reguladores de crecimiento y proteínas cuyo efecto ha sido demostrado en otras especies del género *Capsicum*.
- Dada la abundante proliferación de callo obtenida en los diferentes tratamientos, la regeneración vía organogénesis indirecta utilizando el protocolo de regeneración

descrito para la especie (Santana-Buzzy et al., 2005) debe ser explorada como ruta alternativa para la obtención de haploides y dobles haploides.

- Sería conveniente profundizar en los estudios genéticos que permitan comprender la naturaleza de la obtención de embriones deformados derivados de microsporas incapaces de convertirse en plantas, así como en los estudios morfo-fisiológicos y estructurales de las estructuras embrionarias deformadas ya que podrían arrojar datos valiosos acerca de la naturaleza de la recalcitrancia de los embriones haploides.