



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Establecimiento de un protocolo para la
inducción de la androgénesis en
*Capsicum chinense Jacq.***

Tesis que presenta

LUIS MAXIMINO GÓMEZ AGUILAR

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México.

Junio 2016

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada (378856) durante el transcurso de la maestría

Al proyecto CONACyT Ciencia básica 60170 “Recalcitrancia a la morfogénesis del género *Capsicum*: estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile in vitro” por el apoyo económico recibido.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, laboratorio 09 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy por las instalaciones y facilidades otorgadas para la realización del trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
1.1 CHILE HABANERO (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	3
1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	5
1.3 BIOLOGÍA FLORAL	5
1.4 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	6
1.5 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	8
1.6 ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	9
1.4 IMPLICACIONES DEL CULTIVO DE HAPLOIDES	11
1.4.1 ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD E HISTODIFERENCIACIÓN ...	12
1.4.2 EMBRIOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE MICROESPORAS	13
1.3 EMBRIOGÉNESIS EN EL GENERO <i>CAPSICUM</i>.....	14
1.4 MARCADORES MORFOLÓGICOS	21
1.4.1 MEIOSIS	21
1.4.1.1 ETAPAS DE LA MEIOSIS.....	22
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	26
1.6 OBJETIVOS.....	27
1.6.1 OBJETIVO GENERAL	27
1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
CAPÍTULO 2	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.1 MATERIAL VEGETAL.....	31

INDICE

2.2 CLASIFICACION Y ALMACENAMIENTO.....	31
2.2 DESINFECCIÓN Y DISECCIÓN	34
2.2.1 DESINFECCIÓN DE BOTONES FLORALES	34
2.2.2 PROCESO DE DESINFECCIÓN	34
2.2.3 DISECCIÓN DEL BOTÓN FLORAL	34
CONTAMINACION DEL CULTIVO DE ANTERAS	35
2.3 MARCADORES MORFOLÓGICOS	35
2.3.2 RELACION SÉPALO/PÉTALO	35
2.5 DESARROLLO DE LA MICROSPORA.....	37
2.5.1 OBTENCIÓN DE LAS MICROSPORAS/GRANOS DE POLEN.....	37
ANÁLISIS CITOGENÉTICO	37
2.5.2 TINCIÓN CON DAPI	37
2.5.3 TINCIÓN CON CARMIN/PROPIÓNICO.....	38
2.6 INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO	38
2.6.1 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	39
2.6.2 INDUCCIÓN DE CALLO EN ANTERA.....	39
TRATAMIENTO CON REGULADORES DEL CRECIMIENTO	39
CAPÍTULO 3	41
RESULTADOS.....	41
3.1 EFECTIVIDAD DE LA DESINFECCIÓN DE ANTERAS.....	41
3.2 DAÑO A LA ANTERA POR NACLO	43
3.3 MARCADORES MORFOLOGICOS	44
3.3.1 ESTADO DE DESARROLLO DE LA MICROSPORA	44

3.4 DESCRIPCION DE RASGOS MORFOLÓGICOS DE <i>C. annuum</i> Y <i>C. chinense</i>.....	44
3.5 BOTÓN FLORAL	45
3.6 ANTERA	49
3.7 IDENTIFICACION DE LAS FASES DE DESARROLLO DE LA MICROSPORA	50
3.8 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA DE LAS MICROSPORAS EN LAS FASES DE DESARROLLO DEL BOTÓN FLORAL... ..	54
3.9 RESPUESTA DE LA ANTERA A LOS TRATAMIENTOS.....	57
3.9.1 VALORACIÓN DE LA RESPUESTA.....	57
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	63
TRATAMIENTOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA ANDROGÉNESIS	63
PERSPECTIVAS.....	64
BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO	73
PROPUESTA DE PROTOCOLO PARA LA INDUCCION DE ANDROGÉNESIS EN <i>C. chinense</i>.....	73
MEDIO NN (NITSCH & NITSCH 1969).....	76

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1.1 PRINCIPALES MÉTODOS DE MICROPROPAGACIÓN.....	7
FIGURA 1.2 PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA.....	9
FIGURA 1.3 ESQUEMA DE DESARROLLO DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS.....	13
FIGURA 1.4 ESTADIOS Y DESARROLLO DE LA ES EN <i>C. annuum</i>	17
FIGURA 1.5 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA INDUCIDA A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES.....	18
FIGURA 1.6 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA INDUCIDA A PARTIR DE HIPOCÓTILO	18
FIGURA 1.7 ANORMALIDADES MÁS FRECUENTEMENTE OBSERVADAS DURANTE LA HISTODIFERENCIACIÓN DE ESs EN <i>C. chinense</i>	19
FIGURA 1.8 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CHILE HABANERO.....	20
FIGURA 1.9 REPRESENTACIÓN DE A) MITOSIS Y B) MEIOSIS, DURANTE EL CICLO MEIÓTICO DE UNA CÉLULA PROGENITORA 2N.	23
FIGURA 1.10 DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	29
FIGURA 2.1. CLASIFICACIÓN DE BOTONES FLORALES (<i>C. annuum</i>).	32
FIGURA 2.2. CLASIFICACIÓN DE BOTONES FLORALES (<i>C. chinense</i>).	33
FIGURA 2.3. BOTÓN FLORAL COLECTADO Y CLASIFICADO DE ACUERDO AL TAMAÑO.....	35
FIGURA 2.4. UBICACIÓN DE LA PIGMENTACIÓN EN LA ANTERA	37
FIGURA 3.1 RESISTENCIA DEL TEJIDO DEL BOTÓN FLORAL A LA EXPOSICIÓN BAJA [NaClO].	43
FIGURA 3.2 DAÑO MOSTRADO POR EL TEJIDO DEL BOTÓN FLORAL POR LA EXPOSICIÓN AL [NaClO].	44
FIGURA 3.3 BOTONES DE <i>C. annuum</i> Y <i>C. chinense</i> EN COMPARACIÓN	45
FIGURA 3.4 CORTE LONGITUDINAL DE BOTONES DE <i>C. annuum</i>	46
FIGURA 3.5 CORTE LONGITUDINAL DE BOTONES DE <i>C. chinense</i>	47
FIGURA 3.6 FASES DE MADURACIÓN DE ANTERA DE <i>C. annuum</i>	48
FIGURA 3.7 FASES DE MADURACIÓN DE ANTERA DE <i>C. chinense</i>	49
FIGURA 3.8 MARCADOR MORFOLÓGICO ESTABLECIDO PARA LA CLASIFICACIÓN R1	50
FIGURA 3.9 MARCADOR MORFOLÓGICO PARA LA CLASIFICACIÓN R2	51
FIGURA 3.10. MARCADOR MORFOLÓGICO PARA LA CLASIFICACIÓN R3	52
FIGURA 3.11. MARCADOR MORFOLÓGICO PARA LA CLASIFICACIÓN R4	53
FIGURA 3.12. MARCADOR MORFOLÓGICO PARA LA CLASIFICACIÓN R5	54
FIGURA 3.13. PORCENTAJE DE MICROSPORAS SEGÚN SU FASE DE DESARROLLO EN RELACIÓN A LA CLASIFICACIÓN POR TAMAÑO DEL BOTÓN FLORAL	55

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 3.14 ABUNDANCIA DE LAS MICROSPORAS QUE RESULTAN DE INTERÉS (TÉTRADA Y VAUOLAR) EN LOS DISTINTOS TAMAÑOS DEL BOTÓN FLORAL	56
FIGURA 3.15. DISTINTAS RESPUESTAS EN LA FORMACIÓN DE CALLO.	58

LISTADO DE CUADROS

CUADRO 1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Capsicum chinense* Jacq..... 4

CUADRO 1.2 RELACIÓN DE TRABAJOS DE ES DESARROLLADOS EN *Capsicum* SPP. 16

CUADRO 2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS BOTONES COLECTADOS DE *C. chinense*. 31

CUADRO 2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS BOTONES FLORALES USANDO DISTINTAS ÍNDICES
DE RELACIÓN ENTRE LONGITUDES..... 36

CUADRO 2.3. ESTIMACIÓN DE LA COLORACIÓN EN RELACIÓN CON EL GRADO DE
DESARROLLO DEL BOTÓN FLORAL. 36

CUADRO 3.1. TRATAMIENTOS DE [NaClO] USADOS PARA DESINFECTAR EL BOTÓN
FLORAL. 42

CUADRO 3.2. EFECTIVIDAD DE LOS TIEMPOS DE EXPOSICIÓN AL TRATAMIENTO
SELECCIONADO. 42

CUADRO 3.3. TRATAMIENTOS USADOS PARA INDUCIR CALLOGÉNESIS EN ANTERAS DE *C.*
chinense. 57

CUADRO 3.4. RESPUESTA DE LAS ANTERAS A LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS..... 59

ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol acético
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DAPI	2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide
DH	Doble haploide
ES	Embriogénesis somática.
MS	Murashige y Skoog (Medio)
NN	Nitsch /Nitsch (medio)
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

RESÚMEN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una especie de gran importancia económica, social y cultural para la península de Yucatán. Es un cultivo emblemático por presentar atributos que lo distinguen del chile habanero que se cultiva en el resto del mundo. El uso de herramientas biotecnológicas para complementar los trabajos de mejora genética es una necesidad para cualquier especie de interés económico. El género *Capsicum* no ha estado muy limitado en los avances en este campo de la ciencia, debido a la incapacidad de los brotes y embriones somáticos para desarrollar plantas completas. Sin embargo, existen reportes de la obtención de embriones somáticos normales a partir de microsporas y/o anteras de algunas especies del género. Contar con plantas dihaploides ofrece una valiosa alternativa ya que puede ser utilizada para generar un modelo que nos permita estudiar los patrones de desarrollo del embrión e identificar la(s) posible(s) causa(s) de las anomalías que incapacitan al embrión somático de esta especie para su conversión en planta. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo para la inducción de la androgénesis en *C. chinense* y en *C. annuum* y determinar mediante marcadores morfológicos el momento óptimo durante el desarrollo de la microspora, para la obtención de estructuras haploides, en ambas especies.

ABSTRACT

The habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) belongs to a species of economic, social and cultural importance for the Yucatán region. It's an emblematic crop because it distinguishes itself from habanero peppers from the rest of the world. The use of biotechnological tools to complement investigation in genetic improvement is a necessity for whatever species of economic interest. The *Capsicum* genus has not been limited in the progresses in this field of science, due to the inability of the shoots and somatic embryos to develop whole plants. However, there are reports of obtaining normal somatic embryos from microspores and/ or anthers from some species of this genus. Having dihaploid plants offers a valuable alternative because they can be used to generate a model that allows us to study the embryonic development patterns and identify the possible cause(s) of abnormalities that disable the somatic embryo of this species to turn into a whole plant. The aim of this study was to establish a protocol for induction of androgénesis in *C. chinense* and *C. annuum* and by morphological markers to determine the optimal time during the development of the microspore, to obtain haploid structures in both species

INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de 30 especies de *Capsicum* de las cuales 5 son las más distribuidas (y cultivadas) en las regiones subtropicales y países de clima templado: *C. annum* L., *C. frutescens* Mill., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. y *C. pubescens* (Csilléry 2006). El Chile es uno de los ingredientes vegetales de mayor consumo alrededor del mundo. Tiene un alto valor nutritivo y es una excelente fuente de vitaminas C, A, complejo B y E; es rico en minerales como molibdeno, manganeso, potasio y tiamina (Simonne *et al.* 1997). *C. chinense* es una de las especies más cultivada, especialmente por su elevado picor y por ser materia prima de numerosas industrias (salsas, colorantes, pinturas, medicamentos, protectores de cables, etc.). En el ámbito biotecnológico, el género *Capsicum* es reconocido como recalcitrante a la regeneración *in vitro*, lo que ha limitado la aplicación de las técnicas del cultivo de tejidos para la propagación y el mejoramiento de las especies de mayor interés económico. Esta incapacidad para regenerar plantas completas ha sido objeto de estudio por numerosos laboratorios en diferentes partes del mundo. En el CICY hace alrededor de 14 años, es abordada esta problemática a través de estudios bioquímicos, moleculares, fisiológicos, entre otras disciplinas. Los avances alcanzados, aunque no son definitivamente alentadores, han permitido entender el rol que juegan numerosos factores en este fenómeno considerado el problema fundamental de la Biotecnología Vegetal.

Dentro de las vías de regeneración de plantas, la embriogénesis somática (ES) es considerada como el método más eficiente. Sin embargo, diversos grupos de investigación han catalogado al género *Capsicum* como recalcitrante a la morfogénesis *in vitro*. *Capsicum annum* fue la especie del género con la que se reportó por primera vez regeneración de brotes *in vitro*. En estos trabajos se documentó la baja reproducibilidad y eficiencia del proceso (Agrawal y Chandra 1983; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996; Husain *et al.*, 1999; Binzel *et al.*, 1996). La mayoría de los reportes son de organogénesis y pocos trabajos de embriogénesis somática se han reportado para esta especie (Harini y Lakshmi-Sita, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Khan *et al.*, 2006). Sin embargo, los protocolos de embriogénesis somática han tenido baja eficiencia, son poco reproducibles y presentan un alto número de embriones deformados. Para *C. chinense* se han publicado varios trabajos de embriogénesis somática por las diferentes vías de regeneración (directa e indirecta), éstos son altamente eficientes

INTRODUCCIÓN

y reproducibles (Avilés-Viñas y Santana-Buzzy, 2007; Zapata-Castillo *et al.*, 2007; López-Puc *et al.*, 2006; Avilés-Viñas *et al.*, 2012). Cabe mencionar, que las especies del género *Capsicum* para las que se ha reportado la embriogénesis somática tienen un problema en común, una vez que los embriones se han formado, la mayoría de ellos se deforman y no alcanzan los estadios posteriores de desarrollo (Santana-Buzzy *et al.*, 2009). Steinitz *et al.* (2003), clasificaron las anomalías más frecuentes en la histodiferenciación del meristemo caulinar (SAM, del inglés shoot apical meristem) como: fusión de embriones, ausencia de cotiledones, solo un cotiledón o cotiledones deformados. Por ello, la necesidad de realizar estudios que permitan determinar la expresión de aquellos genes íntimamente relacionados con el desarrollo del SAM y por ende del embrión.

En 2013 se reportó por Avilés-Viñas y colaboradores, un protocolo de Embriogénesis Somática (ES) directa en medio líquido para *C. chinense*, con el cual es posible obtener 1.77×10^4 embriones somáticos (ESs) por litro de medio de cultivo. Sin embargo, aún persiste la incapacidad de los ESs para convertirse en plantas, debido al alto índice de embriones somáticos (ESs) deformados. En este contexto, se están llevando a cabo diversos estudios (histológicos, bioquímicos y moleculares) con el propósito de entender y solucionar esta problemática (Santana-Buzzy *et al.*, 2005, Lopez-Puc *et al.*, 2006, Zapata-Castillo *et al.*, 2007, Valle-Gough *et al.*, 2015, Regla-Márquez *et al.*, 2016). Sin embargo, existen evidencias de que a partir del cultivo *in vitro* de anteras es posible obtener embriones cuya morfología es normal y son capaces de germinar y convertirse en plantas. En este trabajo nos proponemos establecer las condiciones para inducir la androgénesis en *C. chinense* y *C. annuum* a partir de anteras.

CAPÍTULO 1

1. ANTECEDENTES

El chile (*Capsicum* spp. es un producto con gran demanda nacional e internacional. El chile habanero (*C. chinense* Jacq.) aunque se considera originario de Sudamérica, Yucatán está reconocido como centro importante de diversidad genética. Se encuentra entre los principales productos agrícolas de la península, ya que es altamente demandado por la industria farmacéutica, química y militar, por sus altos contenidos de capsaicina, alcaloide que le confiere alta pungencia a sus frutos, considerados los más picantes de todas las especies vegetales conocidas. No obstante, existe el riesgo de la pérdida de este recurso genético a causa de fenómenos meteorológicos, la introducción de nuevas variantes, baja calidad fisiológica y genética de la semilla, la falta de tecnologías adecuadas para conservarla y la recalcitrancia propia de la especie.

El chile tiene una larga tradición en la dieta alimentaria de la población mexicana, siendo uno de los atributos que la identifica y ha sido apreciado como condimento desde tiempos prehispánicos. En México, existe una gran diversidad de chiles cultivados y silvestres en una amplia gama que va desde los muy picantes, hasta las variedades dulces (Pozo *et al.* 1991; Martínez 2000; Perez 2000).

En la península de Yucatán existe una gran variación de chiles locales (*C. annum* y *C. chinense*). Sin embargo pese a su diversidad e importancia existe un conocimiento limitado de este germoplasma, y no se cuentan con estudios suficientes de la variabilidad morfológica verdaderamente existente en los mismos, que sirva de base a los programas de mejora genética y estudios relacionados a este cultivo (Teran y Rasmussen 1998).

Por otro lado, el entendimiento de la variación genética presente en este cultivo es además indispensable para establecer una estrategia efectiva de conservación y mejoramiento tanto por la vía tradicional como biotecnológica.

1.1 CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

La clasificación botánica de los *Capsicum* ha sido difícil, debido al alto número de variedades, a la falta de características definidas y a que no existen barreras marcadas para

CAPÍTULO I

la hibridación de algunas especies. Por esto los criterios para clasificar *Capsicum* han variado, desde algunos antiguos que reconocen más de 30 especies, hasta autores modernos que sostiene que existe sólo una especie (Casali y Couto, 1984). No todas las especies del género *Capsicum* han sido descritas hasta ahora ya que no se ha explorado completamente la diversidad de estas especies. Existen alrededor de 25-30 especies de *Capsicum* de las cuales 5 son las más distribuidas (y cultivadas) en las regiones subtropicales y países templados: *C. annum* L., *C. frutescens* Mill., *C. baccatum* L., *C. chinense* y *C. pubescens* (Csille'ry 2006). El chile es uno de los ingredientes de más variedad alrededor de las cocinas del mundo. El valor nutritivo del chile es alto y es una excelente fuente de vitaminas C, A, complejo B y E, es rico en minerales como molibdeno, manganeso, folatos, potasio y tiamina (Simonne *et al.* 1997). Es también una especie de cultivar muy conocida y su uso se extiende como ingrediente de salsas, colorantes y agente pungente en alimentos además de sus aplicaciones farmacéuticas.

Uno de los cultivares de chile que presenta mayor pungencia es el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacquin), su origen se reconoce en el Amazonas y fue introducido a Centroamérica, la región peninsular de Yucatán y las islas del Caribe. Fue erróneamente llamado "chinense" (de China) por Nikolaus Von Jacquin, físico alemán en 1777 (DeWitt y Bosland, 1993) cuadro 1.1.

Esta especie cuenta en la actualidad con denominación de origen en Yucatán, dado a que la mayor diversidad se presenta en la región y ha sido reconocida en el mundo desde 2010.

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de *Capsicum chinense* Jacq. (USDA, 2003).

REINO	<i>Plantae</i>
SUBREINO	<i>Tracheobionta</i>
SUPERDIVISIÓN	<i>Spermatophyta</i>
DIVISIÓN	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida – Dicotiledóneas</i>
SUBCLASE	<i>Asteridae</i>

ORDEN	<i>Solanales</i>
FAMILIA:	<i>Solanaceae</i>
GÉNERO	<i>Capsicum</i>
ESPECIE	<i>C. chinense Jacq</i>

1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El chile habanero posee una raíz principal de tipo pivotante, la cual profundiza de 0.40 a 1.20 m, con raíces secundarias extendidas en el suelo. Su tallo es erecto, de color verde con o sin coloración violeta de los nudos; con una altura de 0.3 a 1.2 m. Dependiendo de la variedad posee 4 ramas primarias y 4 secundarias, carece de pubescencia a veces puede estar cubierto de pelos o tricomas (Alpizar, *et al.* 2003) La planta de *C. chinense* crece una altura de 40 a 75 cm (Long-Solís, 1998). La planta tiene de dos a cinco flores por nódulo, con pedicelos generalmente declinantes, pero los hay erectos también. El cáliz carece de dientes, es glabro pero presenta una pigmentación marcada entre la base y el pedúnculo. El color más común de la corola es amarillo verdoso y blanco verdoso y las anteras son azules. El fruto puede ser de forma esférica o alargada, con pericarpio liso o arrugado. Ciertos cultivares tienen forma de trompo, con áreas hundidas. El color del fruto puede ser blanco, anaranjado, amarillo, salmón, rojo o café. En la base del fruto es característico que el cáliz presente una constricción anular. Las semillas son arrugadas, color paja irregularmente con bordos

1.3 BIOLOGÍA FLORAL

Los chiles muestran un grado variable de polinización cruzada, que puede llegar en casos extremos hasta un 60% (Csillery, *et al.* 1986). El chile se considera un cultivo de autopolinización (Bosland, 1996). Las tasas de cruzamiento van del 7 al 91%. *Capsicum* podría considerarse una especie de polinización cruzada facultativa. El cruzamiento está asociado con la polinización natural por insectos. Las flores de los chiles se abren en las primeras horas de la mañana y poco después las anteras comienzan a descargar su polen.

CAPÍTULO I

La posición del pistilo, situado entre las anteras, hace posible que en la mayoría de los casos haya autopolinización. Sin embargo, en estudios experimentales, así como en los cultivos comerciales, se ha observado que hay un buen porcentaje de polinización cruzada, la que en ciertos casos llega hasta el 15%. Esto explica porque mucha de la variabilidad que se observa en los *Capsicum* puede atribuirse a la hibridación (León, 1987).

1.4 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

En conjunción, las técnicas usadas que a partir de una muestra vegetal, ya sea desde una célula hasta un organismo completo permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de esta bajo condiciones controladas, artificiales y axénicas de patógenos se les llama Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999). El conocimiento para establecer estos cultivos requiere de varias disciplinas de estudio ya que implica la selección del explante, el medio químico donde será incubado, controles de asepsia y el conocimiento para guiar las condiciones ambientales del lugar de incubación.

En lo referente al medio de cultivo, existe una gran prioridad de la dependencia del éxito en el cultivo, ya que de este se derivan los nutrientes disponibles y factores que regulan el estado de crecimiento del organismo. Actualmente se les llama reguladores del crecimiento a este grupo de sustancias que afectan el desarrollo de la planta a lo largo de su vida. El grupo mayor y más estudiado comprende a las Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Ácido Abscísico y Etileno; el siguiente grupo que ha sido menos estudiado pero que toma importancia en la actualidad engloba a las Poliaminas, Jasmonatos, Ácido Salicílico y los Brasinoesteroides (Davies, 1995).

Un avance que se obtuvo en un principio para lograr el cultivo *in vitro* fue cuando se usaron en conjunto estos tratamientos de reguladores aunados a un medio rico en nutrientes, donde se logró la formación de brotes, raíces y tejido calloso usando combinaciones de Auxinas y Citocininas. Desde entonces, el medio de cultivo MS se ha usado ampliamente como formulación básica para el cultivo de tejidos vegetales (Murashige & Skoog, 1962).

Como parte de la biotecnología de plantas, el cultivo de tejidos vegetales ha sido implementado para generar nuevas variedades de cultivares, conservación de especies a

través del germoplasma, multiplicación de especies y generación de nuevos modelos de estudio que resuelvan problemáticas para géneros específicos (Brown y Thorpe, 1995). En la figura 1.2 se muestra la embriogénesis como una parte del complejo de técnicas biotecnológicas vegetales usadas en la micropropagación esta será de interés especial durante el desarrollo del presente trabajo.

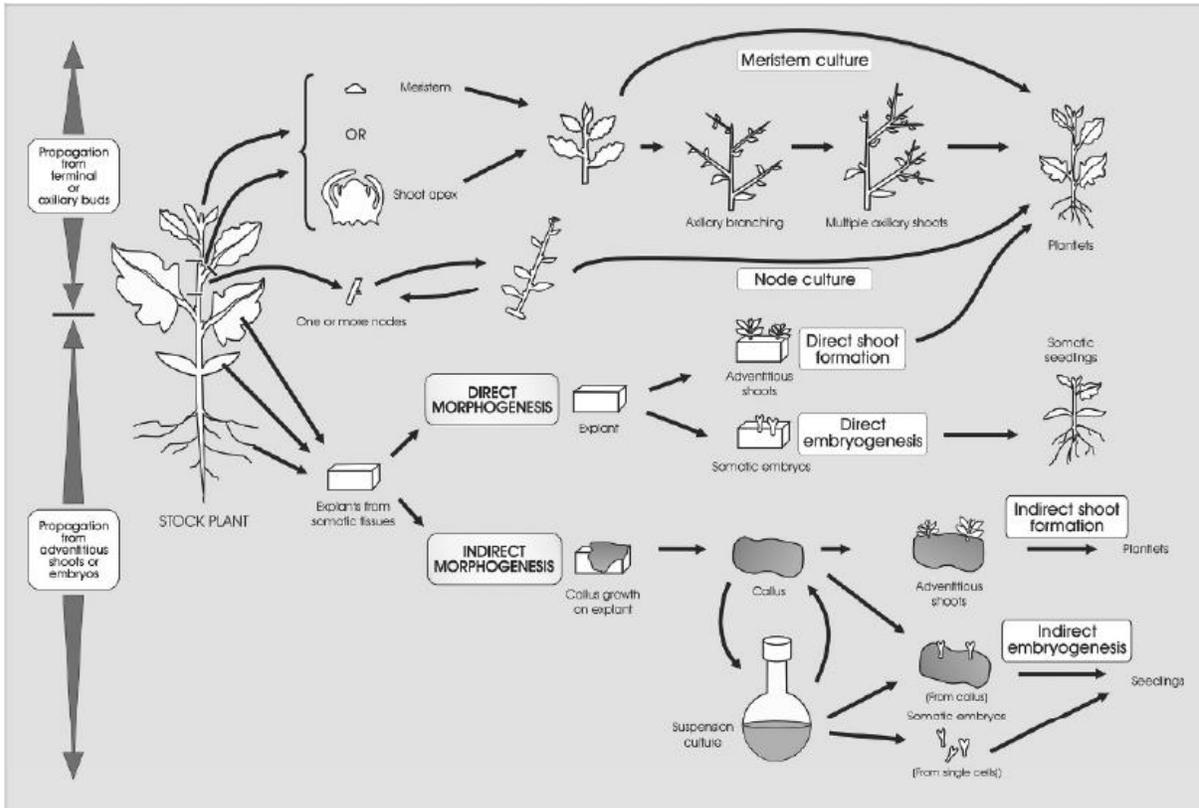


Figura 1.1 Principales métodos de micropropagación (George *et al.*, 2008).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales se ha explorado la embriogénesis somática, que hace referencia al desarrollo del embrión a partir de una célula gametofítica. Las condiciones para generar la embriogénesis en este tipo de cultivos conllevan una desprogramación de las células del explante para así ser inducido *de novo* el estadio embrionario. Esto es posible gracias a tratamientos adicionales a los reguladores de crecimiento como por ejemplo imponiendo condiciones de estrés, ya sea bioquímico o físico.

CAPÍTULO I

En general, para lograr la propagación, regeneración o multiplicación clonal de la planta se toman en cuenta los siguientes detalles: requerimientos de nutrición y otros factores como vitaminas, cantidad y combinación de los reguladores de crecimiento, tiempos de tratamientos, naturaleza del explante y factores abióticos como luz, temperatura y humedad además de sus posibles variaciones, por ejemplo; edad de la planta, condiciones de solidificación del medio (ya sea líquido o semisólido) periodos de tratamiento y trasplante y muy en especial cuidado la asepsia durante el proceso y el control de infecciones o patógenos (George *et al.*, 2008).

1.5 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las células somáticas en las plantas, contienen toda la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional (Von, 2008); es por ello, que la Embriogénesis Somática (ES) es una de las pruebas más notables de la totipotencia celular (Kiran y Thorpe., 1995). La ES es el proceso por el cual, células somáticas, bajo condiciones de inducción, generan células embriónicas, las cuales atraviesan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que resultan en la formación de un embrión somático (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

El desarrollo de los Embriones Somáticos (ESs), ocurre de manera muy similar al de los embriones cigóticos (ECs) (Kiran y Thorpe, 1995). Poseen una estructura con dos polos opuestos, un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras deben ser capaces de crecer y formar plantas normales (Litz y Jarret, 1993). Mediante el proceso de ES, se pueden obtener fácilmente una gran cantidad de ESs en diferentes y definidas etapas de desarrollo (Von y Clapham, 2007).

Debido a que los ESs son generados a partir de un proceso asexual, la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial (Kiran y Thorpe, 1995). Aunque en ciertos aspectos, los ESs mantienen una similitud con los ECs tanto *in vivo* como *in vitro*, pueden ocurrir algunas anomalías en su desarrollo (Litz y Jarret, 1993).

1.6 ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Existen dos tipos de ES *in vitro*, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). En la ESD, los embriones se producen directamente del explante original; mientras que en la ESI, es indispensable obtener un tejido calloso o una suspensión celular embriogénica a partir de la cual se obtendrá la diferenciación de los ES en un segundo paso (Pérez-Molphe *et al.* 1999).

El proceso de ES consta de diferentes etapas, en cada una de las cuales se requieren diferentes estímulos y ocurren diferentes fenómenos (Merkele *et al.* 1995). Estas etapas son: *inducción*, *histodiferenciación*, *maduración* y *germinación* (Fig. 1.2; Pérez-Molphe *et al.*, 1999):

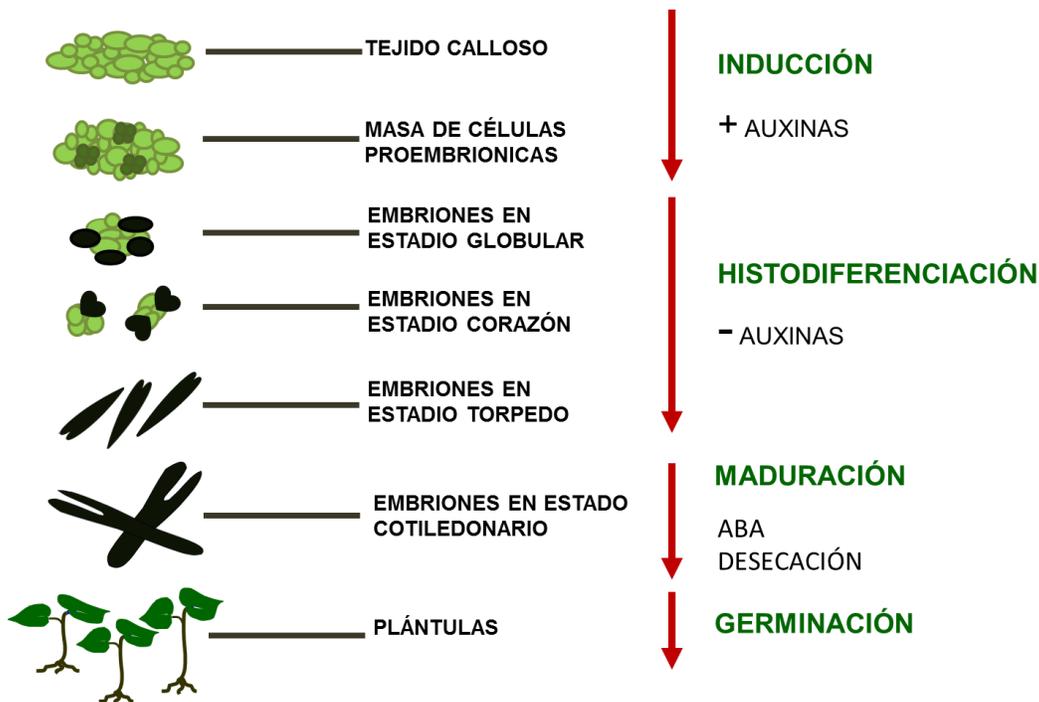


Figura 1.2 Proceso de embriogénesis somática indirecta (Modificado de Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

En la gran mayoría de las plantas, la embriogénesis tiene lugar en el gameto femenino posterior a la fusión de los gametos femenino y masculino (fertilización), el proceso inicia con la formación del cigoto unicelular. El cigoto atraviesa por varias etapas de división celular y fases de histodiferenciación hasta formar un embrión morfológicamente completo;

CAPÍTULO I

en esta forma simple, comprende los meristemos apicales, los cuales producirán los nuevos órganos de la planta después de la germinación, el hipocotilo (tallo embrionario) y los cotiledones.

El reino vegetal es caracterizado por un alto nivel de plasticidad en su desarrollo, incluyendo la habilidad de las plantas para formar embriones que provengan de otras células que no sean del cigoto. Este fenómeno se refiere a la totipotencialidad y se muestra a lo largo del desarrollo normal de varias plantas, como en la apomixis, además de poder ser inducida a través del cultivo de tejidos vegetales.

Dos grandes tipos de totipotencialidad *in vitro* observado en plantas se distinguen por el origen del explante. La embriogénesis somática es inducida de tejidos vegetativos y genera plantas de la misma ploidía y composición genética que la planta donante (Gaj 2001, 2004; George *et al.* 2008; Zimmerman, 1993). Otra forma de totipotencialidad es la embriogénesis gametofítica, en la cual, ya sea el gameto femenino o masculino asociado a las células accesorias son inducidos a formar embriones (Bohanec, 2009. Reynolds, 1997; Seguí-Simarro, 2010). Estas células se originan post-meiosis, por tanto; los embriones que le prosiguen representan la progenie haploide de la planta parental.

En general, la inducción del embrión desde el desarrollo del gametofito masculino es más comúnmente aplicada y estudiada que el gametofito femenino. Esto es en parte debido al gran número de gametofitos masculinos contenidos en una sola antera en comparación con el único gametofito femenino por ovulo, y en parte debido a la facilidad con que las anteras y la poblaciones puras derivadas de estos gametofitos que pueden ser aisladas.

Diferentes términos han sido usados para describir esta forma de embriogénesis gametofítica, incluidos androgénesis, embriogénesis de microesporas y embriogénesis de polen. En el presente trabajo se usará más comúnmente el término “embriogénesis de microesporas” para referirse al cultivo *in vitro* del gametofito masculino inmaduro, independientemente del estado de las células que formarán el embrión.

La utilización de la embriogénesis a partir de microesporas es una herramienta biotecnológica que se ha extendido a un rango diverso de plantas (Ferrie y Caswell 2011; Maluszynski *et al.*, 2003). La habilidad para formar embriones haploides es altamente

dependiente de la especie y el genotipo de la planta donadora; por tanto, un protocolo eficiente, de ajustes finos y para cada caso es básico y necesario según la variedad de la planta. Un parámetro decisivo requerido para inducir el crecimiento embrionario en el cultivo de tejidos es la aplicación de un tratamiento de estrés, usualmente por temperatura, nutriente u osmolar, además de sus posibles combinaciones (Islam & Tuteja, 2012; Shariatpanahi *et al.*, 2006).

1.4 IMPLICACIONES DEL CULTIVO DE HAPLOIDES

Aunque muchos sistemas de dobles haploides han sido ampliamente explotados, aún existen varios cuellos de botella que necesitan ser superados para que un sistema más eficiente sea establecido para un específico cultivar o genotipo. Una limitación mayor es la baja eficiencia en la producción del haploide y la baja conversión de este a plántulas (Germaná, 2006). A pesar del uso de la embriogénesis de microesporas que se ha extendido a muchas familias de plantas (Ferrie *et al.*, 2011; Ferrie, 2013; Seguí-Simarro *et al.*, 2011), aún existen especies de importancia agronómica (ejemplo las Solanáceas) o de relevancia científica (*Arabidopsis*) que permanecen recalcitrantes a este proceso.

Algunos métodos biotecnológicos, como es la obtención de plantas doble haploides, tienen el potencial de complementar los métodos de mejora tradicional en las plantas (Thomas *et al.*, 2003). Eficientes métodos para establecer líneas doble haploides más uniformes son esenciales para los investigadores para elaborar mapas del trasfondo genético o de acertar en los tratamientos agronómicos para obtener rendimientos óptimos así como los procesos de obtención de nuevos híbridos y variedades homogéneas.

Aunque el cultivo de anteras es un prometedor método de producción de plantas dihaploides, un protocolo para cada genotipo independiente no se ha establecido del todo (Irikova *et al.*, 2011). El paso más crítico es la producción de estructuras similares a las embrionales y la subsecuente generación de la planta, considerando el genotipo y las condiciones de la planta donante. La recolección de botones florales en el estadio óptimo y los tratamientos de estrés, además del medio y las condiciones del cultivo (Irikova *et al.*, 2011). Se ha establecido que la composición del medio tiene gran influencia en la eficiencia

CAPÍTULO I

del cultivo de microesporas en cualquier especie. Además, la cantidad de publicaciones hechas sobre el cultivo de microesporas del género *Capsicum* aún es limitado. Dos de los medios que han tenido mejor éxito en el cultivo de microesporas son NLNS (Kim *et al.*, 2008), que es una versión modificada del medio NLN (Lichter, 1982) y el medio W14mi (Lantos *et al.*, 2009). En estos primeros experimentos, la androgénesis fue inducida por dos vías; una libre de reguladores de crecimiento y otra añadiendo 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) en conjunto con Cinetina. Es claro que el entendimiento de estos reguladores de crecimiento y su efecto en los medios de cultivo requieren muchos más estudios.

1.4.1 ESTABLECIMIENTO DE LA POLARIDAD E HISTODIFERENCIACIÓN

La división celular y la formación de un patrón de organización durante la embriogénesis cigótica en las plantas ha sido ampliamente descrita, en lo particular con *Arabidopsis*. Esta organización del embrión está influenciada en un principio por señas de posición que están presentes antes de la fertilización en el gametofito femenino. En *Arabidopsis*, el óvulo ya está polarizado aunque pierde esta polarización brevemente tras la fecundación (Ueda *et al.*, 2011). Los cambios posteriores en la organización del citoplasma y de la pared celular después de la fertilización (Mansfield and Briarty, 1991; Mansfield *et al.*, 1991) dan lugar al cigoto, que tiene una estructura polar vacuolada (Dodeman *et al.*, 1997; Zhang and Laux, 2011).

El cultivo de plantas haploides es más efectivo en comparación con el convencional de líneas puras de diploides homocigotos. Estas líneas son obtenidas en la primera generación de haploidía, mientras que se necesitan varias generaciones de cultivo usando métodos tradicionales. El método más usual para obtener estas plantas haploides es a través del cultivo de anteras.

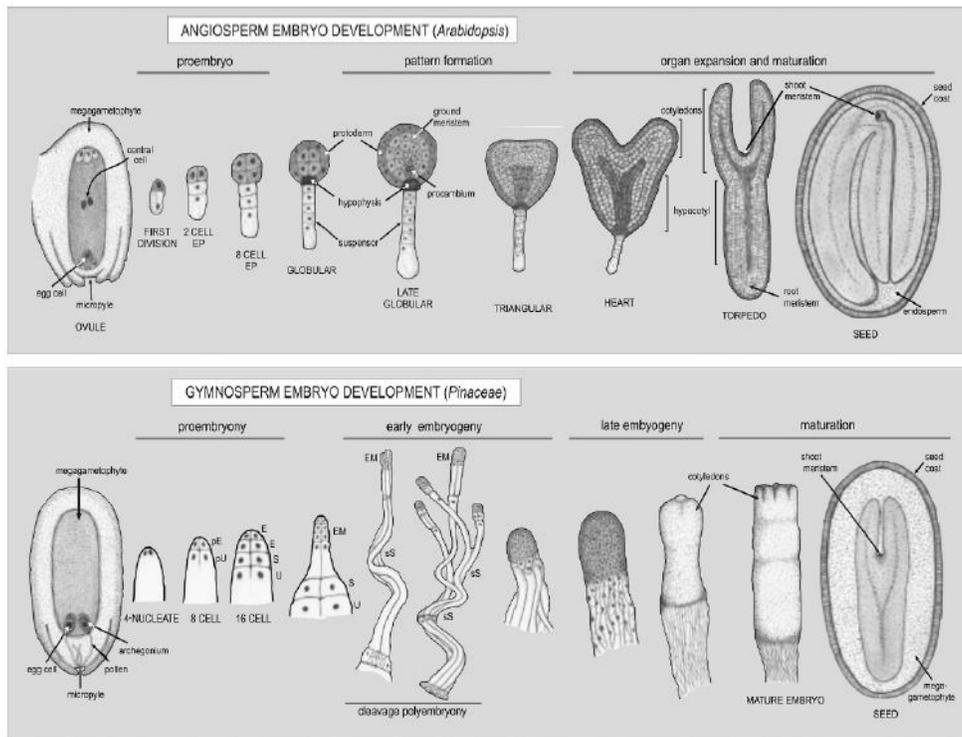


Figura 1.3 Esquema de desarrollo durante la embriogénesis (George *et al.*, 2008).

1.4.2 EMBRIOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE MICROESPORAS

El uso de aislados de microesporas (más que el uso de la antera íntegra) es ahora un método realista de producción de embriones para muchas especies de plantas (Davies and Morton, 1998). Algunas de las ventajas que tiene este método, son: Primero; el cultivo de microesporas evita la formación de callo proveniente del tejido de la antera. En todos los embriones formados se tiene la certeza que proviene de microesporas, y por tanto, se espera que todas las plantas regeneradas provengan de haploides o dobles haploides. Segundo; al tener acceso directo a las microesporas aisladas se optimizan las condiciones del medio de cultivo. Tercero; el cultivo de microesporas produce un mayor número de embriones que en el cultivo de anteras. Por ejemplo, en un estudio hecho con cebada bajo condiciones óptimas de cultivo se logró una mayor cantidad de embriones (hasta 200 veces más) que en el cultivo hecho con antera (Davies and Morton, 1998). Cuarto; todo el proceso puede ser fácilmente monitoreado a través del microscopio (Indrianto *et al.*, 2001). Y finalmente y muy importante; debido a que las microesporas son haploides y unicelulares,

CAPÍTULO I

la generación de haploides y doble haploides de estos aislados ofrece grandes oportunidades de transformación genética, mapeo de genes y selección del deseado recesivo/dominante a comparación de la producción de homocigotos (Graner, 1996; Polsoni *et al.*, 1988; Stöger *et al.*, 1995).

Existen numerosos reportes de protocolos que permiten inducir la embriogénesis y la regeneración de plantas en chile (*Capsicum annum*), a partir de microesporas (Bárány *et al.* 2001, 2005; Dumas de Vaulx *et al.*, 1981; Mitykó y Fári 1997). Algunos de estos experimentos en inducir la embriogénesis han resultado en la formación de estructuras multicelulares solamente (González-Melendi *et al.* 1996; Mitykó y Fári 1997; Regner 1996). Bárány *et al.* (2001) han reportado la formación de embriones del cultivo de microesporas de chile, aunque el sistema resultó con muy baja eficiencia, obteniendo un solo embrión germinado y plántula que no alcanzó a desarrollarse. Más recientemente, Supena *et al.* (2006) desarrolló un protocolo para producir plantas haploides usando anteras como explantes, en lugar de aislados de microesporas.

1.3 EMBRIOGÉNESIS EN EL GENERO *CAPSICUM*

En el año 1993 se reportó por primera vez la embriogénesis somática en *Capsicum* (Harini and Lakshmi-Sita, 1993). En sus experimentos utilizaron como explante el embrión cigótico, y un medio de cultivo adicionado con 2,4-D y agua de coco. En el **Cuadro 1.2** se presentan otros reportes de ES en *Capsicum annum* y *C. chinense*, donde se utilizan diferentes explantes (embrión cigótico, hipocótilo, cotiledón, hojas, anteras y micrósporas), y diversos reguladores de crecimiento. En la mayoría de los casos se ha utilizado una auxina como el 2,4-D en alguna parte del proceso (Avilés-Viñas *et al.*, 2013; Bárány *et al.*, 2005; Binzel *et al.*, 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Lakshmi Sita, 1993; Khan *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Koleva-Gudeva *et al.*, 2007; López-Puc *et al.*, 2006; Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Steinitz *et al.*, 2003; Supena y Custers, 2011; Zapata-Castillo *et al.*, 2007). Steinitz *et al.* (2003), evaluaron el efecto de diferentes auxinas; 2,4-D, Centrofenoxina y Quinclorac, sobre la inducción de ESD en *C. annum* a partir de embrión cigótico. Estos autores lograron la ES utilizando las tres auxinas; sin embargo la concentración requerida para ello varió

considerablemente, 4.5 μM , 13 μM y 40 μM , respectivamente. Lo que sugiere variaciones en la eficiencia de estas auxinas para inducir este proceso.

Existen numerosos reportes que argumentan la recalcitrancia del género *Capsicum* a la morfogénesis *in vitro*. En el género, este fenómeno se manifiesta a través de: 1) La baja eficiencia de los sistemas de regeneración, 2) La baja reproducibilidad de los protocolos de regeneración, 3) El alto índice de embriones somáticos deformados, y 4) La baja tasa de germinación y/o conversión de los embriones somáticos en plantas (Steinitz *et al.*, 2003). La elaboración de protocolos de regeneración del género *Capsicum* ha avanzado lento comparado con otros miembros de la familia de las Solanáceas. Los diferentes estudios realizados han identificado algunos problemas relacionados con una naturaleza recalcitrante a la morfogénesis del género, como la formación de brotes en roseta, la ausencia del meristemo apical en ESs y la dependencia genotípica lo que han clasificado al género como recalcitrante (Kothari *et al.*, 2010).

El cultivo de anteras es una técnica para la producción de haploides y/o plantas diploides las cuales son un gran potencial para los mejoradores de plantas. La haploidía puede intervenir en el mejoramiento de las plantas autógenas de dos modos diferentes. De una parte, ella facilita la identificación y selección de mutantes recesivos a nivel de plantas y de células. De otra parte, la inducción de haploides en los híbridos, seguido de un doblamiento cromosómico permite la obtención de líneas perfectamente homocigóticas evitando una larga serie de autofecundaciones. La haploidía acelera notablemente los programas de selección después del cruzamiento. Los éxitos en el cultivo de anteras han sido descritos por muchos investigadores (Niizeki and Oono, 1968; Guha, *et al.*, 1970; Guha, 1973; Oono, 1975; Chen and Lin, 1976; Chaleff, 1979; Chaleff *et al.*, 1981; Zapata *et al.*, 1981, 1987). El cultivo de anteras ha demostrado ser una técnica útil para acelerar la introgresión de características deseables en poblaciones de mejoramiento. Pero el uso de la técnica del cultivo de anteras se ha visto limitada por la baja frecuencia de producción de callos y regeneración de plantas verdes en genotipos. Varios investigadores han notado que la inducción de callos y la regeneración de plantas verdes están influenciados por el genotipo utilizado, el estado de desarrollo de la microspora, las condiciones de desarrollo de los padres donantes (fotoperíodo e intensidad de la luz), tratamiento físico de las anteras antes de su inoculación, medio definido, etc.

Cuadro 1.2 Relación de trabajos de ES desarrollados en *Capsicum* spp.

Especie	Explante	Regulador	Referencias
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico inmaduro	10% CW, 2,4-D	Harini y Lakshmi Sita (1993)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico maduro	2,4-D	Buyukalaca and Mavituna (1996)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico inmaduro	2,4-D y TDZ	Binzel et al. (1996)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico	2,4-D y Centofenoxina	Steinitz et al. (2003)
<i>C. annuum</i>	Micrósporas	2,4-D	Bárány et al. (2005)
<i>C. annuum</i>	Hipocótilos	TDZ y IBA	Khan et al. (2006)
<i>C. annuum</i>	Anteras	2,4-D y IAA	Koleva-Gudeva et al. (2006)
<i>C. annuum</i>	Micrósporas	Choque térmico	Kim, M., Jang, I. et al. (2008)
<i>C. annuum</i>	Micrósporas	AIA y Zea	Supena, E., y Custers, J. (2011)
<i>C. chinense</i>	Hoja, cotiledón, hipocótilo, embrión cigótico	2,4-D	López-Puc et al. (2006)
<i>C. chinense</i>	Hoja, cotiledón, hipocótilo, embrión cigótico	2,4-D	Zapata-Castillo et al. (2007)
<i>C. chinense</i>	Hipocótilos	2,4-D	Santana-Buzzy et al. (2009)
<i>C. chinense</i>	Hipocótilos	2,4-D	Avilés-Viñas et al. (2012)

Steinitz *et al.*, (2003) encontraron que durante el proceso de ES los ESs se desarrollan a partir de la epidermis y sub-epidermis del embrión cigótico (Figura 1.4). La eficiencia del proceso (número de embriones por explante) resultó baja. En promedio se formaron 6 embriones por explante. Una vez transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento se observaron deformaciones que no permitieron la conversión a planta. Alguno de estos embriones carecía de meristemo apical, o bien tenían cotiledones fusionados, un solo cotiledón o no tenían cotiledones, o embriones fusionados. En las fotografías, se muestra el proceso utilizando Centofenoxina y Quinclorac. Pero no lo compara con el efecto del 2,4-D.

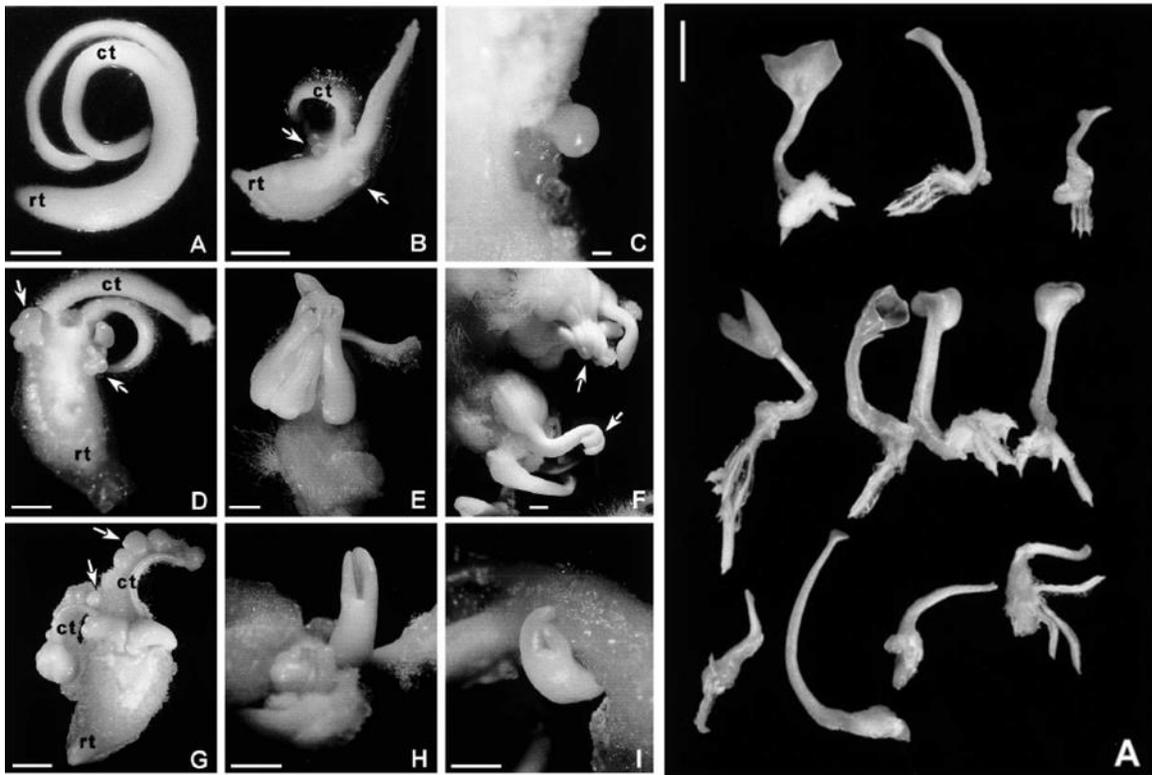


Figura 1.4 Estadios y desarrollo de la ES en *C. annuum* L. Fuente: (Steinitz *et al.*, 2003)

Existen pocos reportes relacionados con la ES en *C. chinense* Jacq. El primero fue realizado por López-Puc *et al.* (2006). Uno de los objetivos de su trabajo era evaluar la eficiencia para que se desarrolle el proceso embriogénico implicando diferentes explantes (embrión cigótico, embrión cigótico germinado, hojas cotiledonares e hipocótilo) en donde se adiciono al medio $9.05 \mu\text{M}$ de 2,4-D para la inducción (Figura 1.5). Posteriormente evaluó 21 tratamientos durante la etapa de histodiferenciación, siendo el más efectivo el tratamiento de 2,4-D a $9.05 \mu\text{M}$ utilizando hipocótilo como explante (Figura 1.6). Una de las ventajas de este tratamiento es el alto número de embriones que se puede obtener por explante, en promedio 175 embriones.

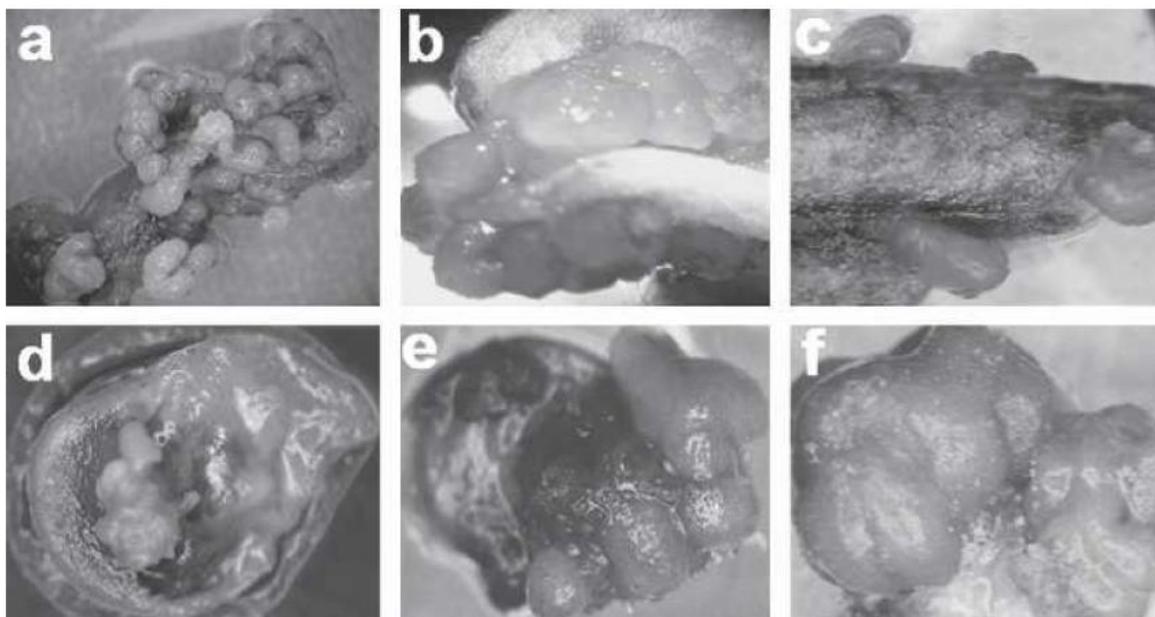


Figura 1.5 Embriogénesis somática directa inducida con medio MS adicionado con $9.05 \mu\text{M}$ de 2,4-D a partir de diferentes explantes: (a) Embrión cigótico, (b y c) Cotiledones y (d, e y f) Embrión cigótico inmaduro. Fuente: (López-Puc *et al.*, 2006).

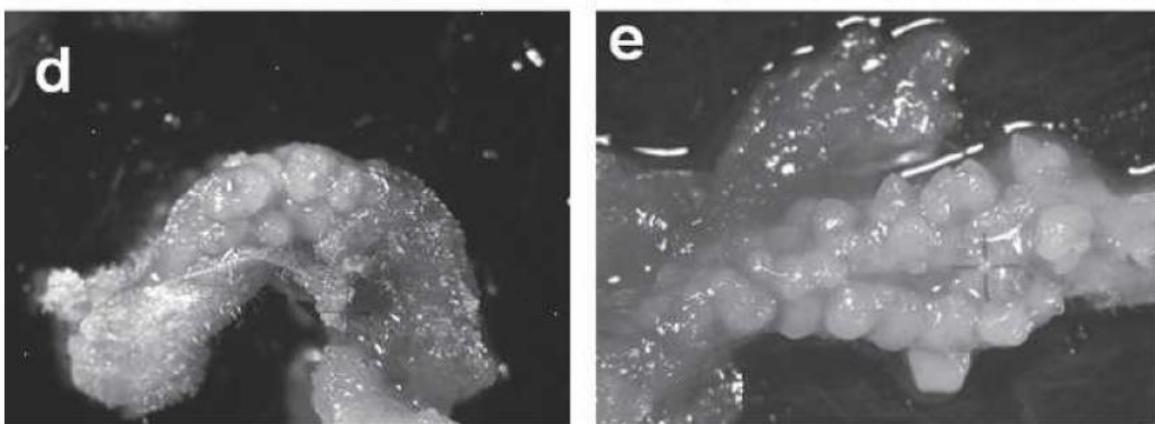


Figura 1.6 Embriogénesis somática directa inducida a partir de hipocótilo de chile Habanero con medio MS adicionado con $9.05 \mu\text{M}$ de 2,4-D: (d y e) ESs formado de la parte interna del hipocótilo. Fuente: (López-Puc *et al.*, 2006)

En el trabajo reportado por Santana-Buzzy (Santana-Buzzy *et al.*, 2009), se describe detalladamente la ontogénesis de la ES en *C. chinense* utilizando el protocolo antes mencionado. Estos autores descubren el gran número de deformaciones que se presentan durante la histodiferenciación de los ESs en esta especie (Figura 1.7).

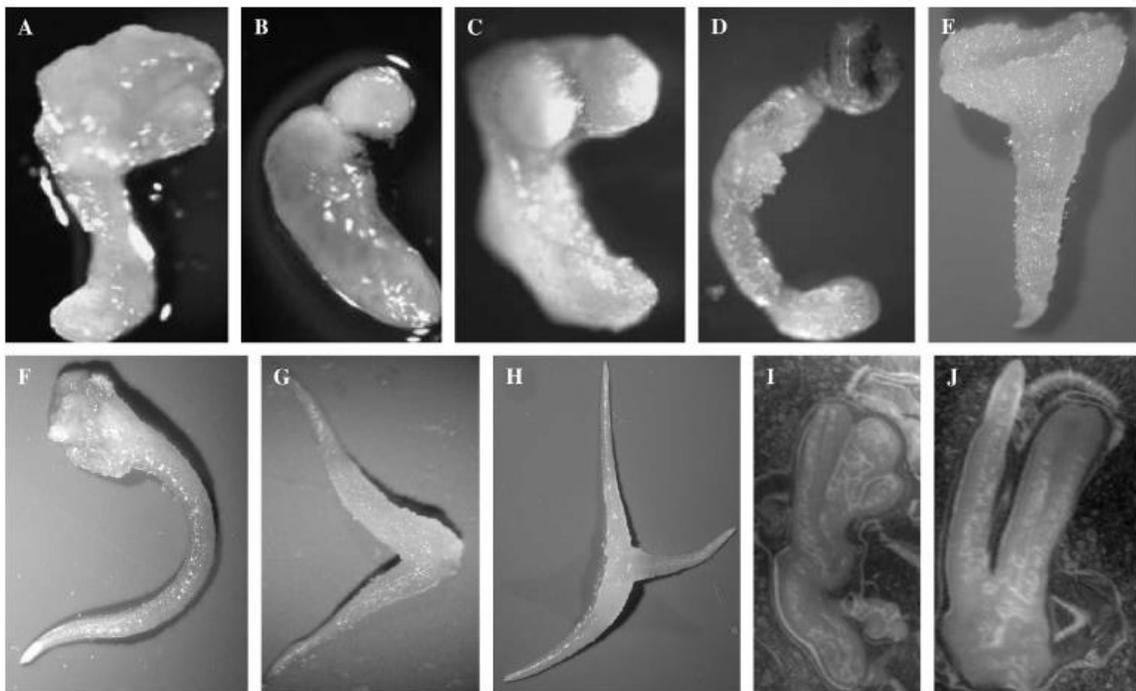


Figura 1.7 Anormalidades más frecuentemente observadas durante la histodiferenciación de ESs en *C. chinense*. Fuente: (Santana-Buzzy *et al.*, 2009)

El trabajo más reciente realizado sobre la ES en *C. chinense* es el de Avilés-Viñas *et al.* (2013). Estos autores evaluaron diferentes tiempos de exposición (30 días, 45 días y 60 días) y tres concentraciones ($0 \mu\text{M}$, $4.52 \mu\text{M}$, y $9.05 \mu\text{M}$) de 2,4-D, en medio sólido y líquido. Se logró una mejor armonía en la formación de ambos polos (apical y radicular), observándose un mayor desarrollo de la radícula. Sin embargo, a pesar de esta mejoría los ESs no desarrollan un adecuado meristemo apical por lo tanto no se convirtieron en planta (Figura 1.8).

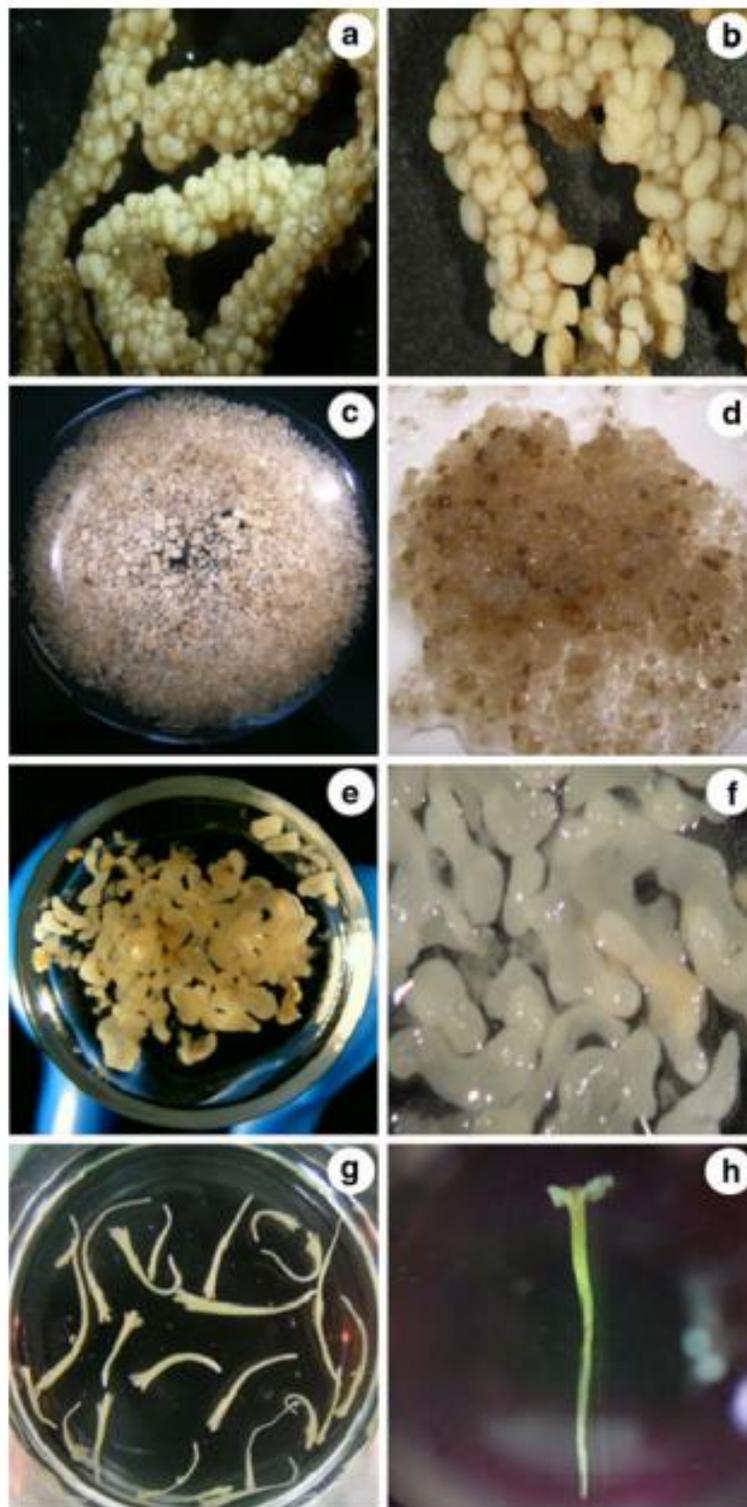


Figura 1.8 Embriogénesis somática en chile Habanero. Fuente: (Avilés-Viñas *et al.*, 2013)

1.4 MARCADORES MORFOLÓGICOS

Durante la microesporogénesis y la microgametogénesis el desarrollo de la microespora y el grano de polen es paralelo a cambios en la antera y en el botón floral. Estos cambios están relacionados a la antera y el botón son en tamaño, forma y color además de algunos otros. El estudio de estos cambios correlativos es importante para la identificación de marcadores visibles que nos permiten inferir sobre el estado de las microesporas y el polen en su desarrollo contenido en la antera, es en otras palabras, un método no invasivo evitando la escisión o rompimiento del botón floral.

Los marcadores morfológicos tienen varias aplicaciones prácticas, donde el polen o la microespora pueden ser identificados en particulares estados de desarrollo. En la esporogénesis o gametogénesis se han empleado para seleccionar el momento de la estación de RNA o guiar el momento de observación a través del microscopio. Otro ejemplo con más perspectiva de uso pueden ser las técnicas que incluyan el uso del aislamiento de polen para almacenamiento o para pruebas de vigor y viabilidad además del cultivo in vitro de estos granos de polen para estudiar el desarrollo (Shivanna 2003).

Al paso de estos marcadores morfológicos, se considera de suma importancia la identificación de los botones florales en relación con las anteras con microesporas en estado óptimo para ser inducidas a la androgénesis.

En la mayoría de las especies inducibles, se ha aceptado que la inducción de la androgénesis solo puede hacerse durante un lapso corto que fluctúa alrededor de la mitosis del grano de polen. Esto se refiere a que las anteras (y por tanto los botones florales) contienen las microesporas vacuoladas y recién divididas. Este estado debe ser precisamente identificado ya que la eficiencia en la inducción de la androgénesis puede ser dramáticamente mermada (Seguí-Simarro 2010).

1.4.1 MEIOSIS

La meiosis es un proceso de la división celular que se produce sólo en las células germinales y es fundamental para la formación de gametos. El propósito principal de esta

CAPÍTULO I

división de célula especializada es producir gametos que son haploides, es decir, con un solo conjunto de cromosomas. Las células germinales logran esta reducción en el número de cromosomas al someterse a dos rondas de división nuclear después de la replicación del ADN, en vez de uno como es normal en las células somáticas en la mitosis. En la primera división meiótica, los dos conjuntos de cromosomas se separan y un juego completo pasa a cada una de las células hijas resultantes. Por tanto, esta división logra la reducción a la mitad del número de cromosomas. En la segunda división meiótica, las dos cromátidas resultantes de cada cromosoma replicado son separados y segregados a diferentes células hijas. Por tanto, el producto final de la meiosis es células con un número haploide de cromosomas no replicados. La restauración del número diploide normal se produce después de la fecundación o en modelos experimentales con la fusión de dos haploides resultando un organismo doble haploide.

1.4.1.1 ETAPAS DE LA MEIOSIS.

La división celular se describe como una serie de etapas que se definen por la apariencia y el comportamiento de los cromosomas. Así se describe a la profase como la condensación de cromosomas, la metafase como el período en que los cromosomas se unen a los microtúbulos del huso y se orientan en el ecuador del husillo y la anafase el período en que las cromátidas se separan.

La meiosis sigue esta convención, los dos ciclos de división se denominan meiosis I y meiosis II; La etapa más larga de la meiosis es la profase I, cuando los cromosomas se someten a dos rasgos característicos e importantes del comportamiento de los cromosomas, el apareamiento es decir la recombinación y homología de los cromosomas.

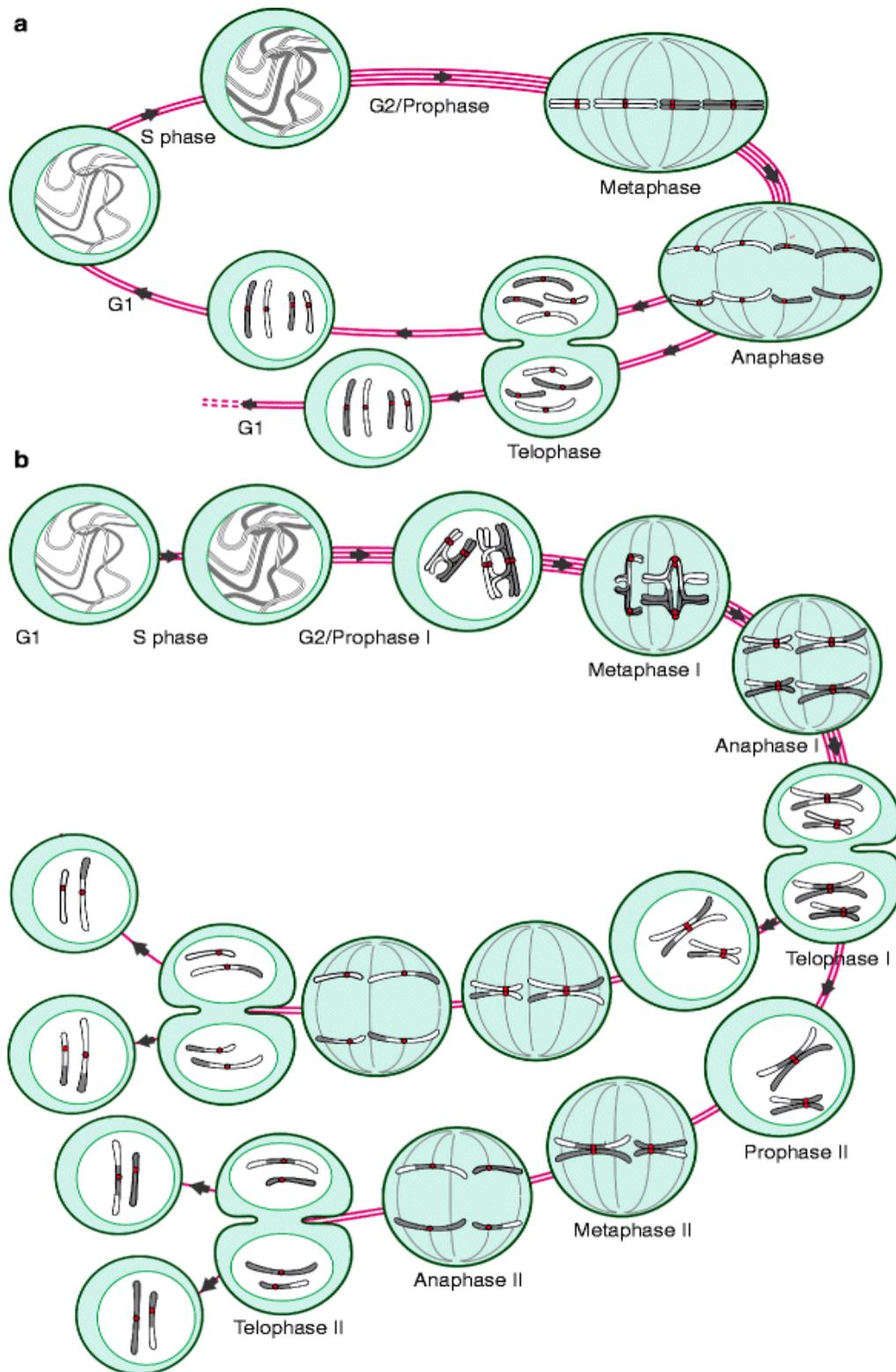


Figura 1.9 Representación de a) mitosis y b) meiosis, durante el ciclo meiótico de una célula progenitora $2n$.

CAPÍTULO I

La meiosis tiene que ser muy específica, ya que por definición, los gametos o esporas haploides tienen exactamente uno de los miembros de cada una de las parejas de los cromosomas homólogos. En contraste, al comienzo de la meiosis los cromosomas homólogos forman parejas; es decir, sufren Sinapsis. Cada estructura en sinapsis es denominada bivalente que finalmente dará lugar a la tétrada. Por consiguiente, para alcanzar la haploidía son necesarias dos divisiones

Leptoteno: En esta subfase, el material cromatínico interfásico comienza a condensarse y los cromosomas se hacen visibles. A lo largo de cada cromosoma se encuentran los cromómeros. Pruebas recientes demuestran que es durante este periodo cuando comienza el proceso de búsqueda de homólogo.

Zigoteno: En el proceso de búsqueda del homólogo, los cromosomas sufren un alineamiento inicial entre sí, a medida que prosigue la meiosis se forma un componente ultraestructural denominado complejo sinaptinético. Cuando termina el Zigoteno los homólogos apareados constituyen una unidad bivalente. Aunque los dos miembros de cada bivalente ya han replicado su DNA todavía no es aparente que cada miembro es una estructura doble.

Paquiteno: durante esta fase, ya es evidente que cada homólogo es una estructura doble, lo que proporciona una prueba visual de la anterior replicación del DNA. Así pues, cada bivalente tiene cuatro cromátidas.

Diploteno: En cada tétrada, cada par de cromátidas hermanas comienza a separarse, sin embargo, uno o más puntos permanecen en contacto, que es por donde las cromátidas se han entrelazado. Cada uno de tales puntos se denomina Quiasma y representa el lugar donde las cromátidas no hermanas han sufrido intercambio genético mediante el proceso de entrecruzamiento, este es una fuente de variabilidad genética.

Diacinesis: la subfase final de la profase 1 es la diacinesis, los cromosomas se separan pero las cromátidas no hermanas permanecen asociadas mediante los quiasmas. A medida que progresa la separación, los quiasmas se desplazan hacia los extremos de la tétrada. Este proceso se denomina Terminalización. En esta última fase el nucléolo y la envoltura

nuclear desaparecen, al final, los centrómeros de cada tétrada se encuentran en la placa ecuatorial de la célula.

Metafase 1: Durante esta fase, los cromosomas se acortan y engrosan. Son visibles los quiasmas terminales de cada tétrada y estas interactúan con las fibras del huso. La mitad de cada tétrada es arrastrada a uno u otro polo.

Anafase 1: La mitad de cada tétrada (llamada Diada) se separa a cada uno de los polos de la célula en división, este proceso es llamado Disyunción. Ocasionalmente es aquí donde se producen errores en la meiosis y no se consigue dicha separación.

Telofase 1: Es en esta fase donde se forma una membrana nuclear alrededor de las diadas y a continuación el núcleo entra en un periodo de interfase, aunque exista este periodo, los cromosomas no se duplican, ya que ya están formados por dos cromatidas.

1.5 JUSTIFICACIÓN

Se conoce que los embriones formados a partir de microsporas o de anteras en el género *Capsicum*, presentan una baja tasa de deformaciones, contrario a lo que ocurre cuando son obtenidos a partir de cualquier otra parte de la planta. La mayoría de los estudios que se han realizado sobre los factores que pudieran estar involucrados en este comportamiento recalcitrante (2, 4-D, proteínas, genes, etileno, poliaminas, etc.), han utilizado como testigo el embrión cigótico. Sin embargo, se requiere un patrón de comparación (testigo) al menos similar, por su origen y procedencia, al embrión somático. Establecer un protocolo que permita obtener embriones normales, nos permitirá entender o acercarnos más a la verdadera causa que provoca esta incapacidad, no sólo en la especie *C. chinense*, sino en todo el género *Capsicum*.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el momento del desarrollo del botón floral y las condiciones de cultivo para establecer un protocolo de inducción de embriones a partir del cultivo *in vitro* de anteras en dos especies del género *Capsicum* (*C. chinense* Jacq. y *C. annuum*).

1.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer una metodología eficiente y reproducible para el manejo, desinfección y disección de las anteras de ambas especies de Chile.
- Determinar los marcadores morfológicos que están relacionados con la fase de microsporogénesis, durante el desarrollo del botón floral
- Establecer mediante técnicas citogenéticas (DAPI, Carmín/propiónico) la relación que existe entre el tamaño del botón floral y la fase de meiosis, durante el desarrollo del botón floral.
- Evaluar la respuesta de anteras de las dos especies en estudio, cultivadas en medio MS suplementado con diferentes combinaciones de citocininas (Cinetina y Zeatina) auxinas (2,4-D y AIA).

1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

- Establecer las variedades donantes (chile habanero y pimiento) en condiciones de invernadero
- Determinar mediante técnicas cito-genéticas el momento adecuado para la inducción de la embriogénesis a partir de los marcadores morfo-fisiológicos del botón floral.
- Implementar un protocolo eficiente para la extracción de microesporas a partir de la antera
- Establecer un método de desinfección con alta reproducibilidad y eficacia para el cultivo de anteras.
- Evaluar la respuesta de las anteras en diferentes tratamientos, empleando combinaciones de reguladores del crecimiento vegetal (Cinetina, Zeatina, 2,4-D y AIA).

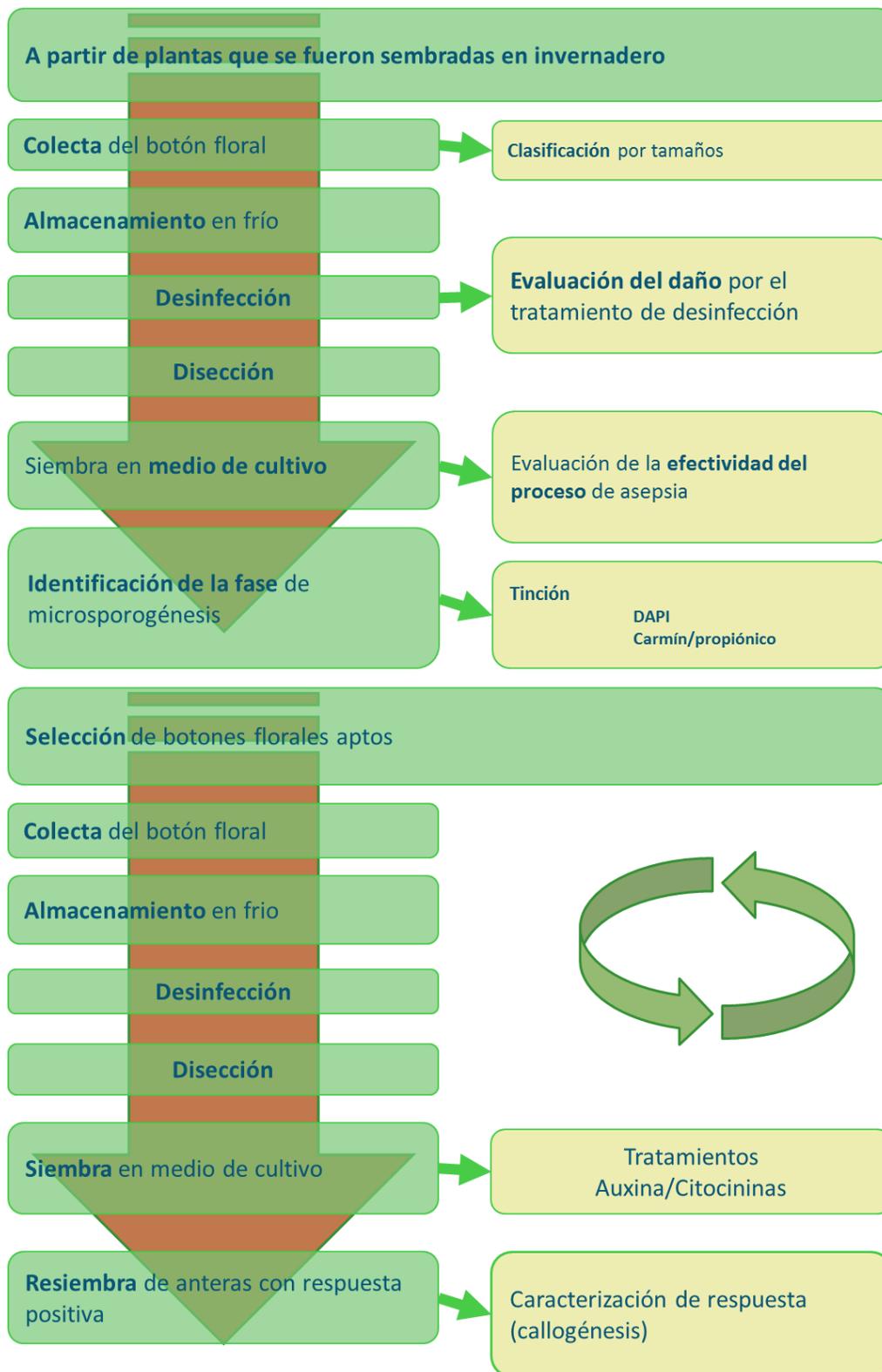


Figura 1.10 Diagrama experimental.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 MATERIAL VEGETAL

Para el presente trabajo, se utilizó la variedad de chile habanero “Mayan Ba’alché”, esta fue cultivada bajo condiciones de invernadero con riego por goteo y fertilización NPK en la planta productora de semillas ubicada en el parque científico de Yucatán. Durante los meses de enero a septiembre que presentó un periodo de floración constante entre los meses de mayo, junio y julio principalmente. La colecta se realizó cuidadosamente a mano, seleccionando los botones de crecimiento primario (puntual en la rama de floración) de acuerdo a los caracteres visuales selectivos tales como; estado de mínimo estrés hídrico, tamaño uniforme entre si y menor daño en el tejido. En cada colecta se reunieron alrededor de 70 botones florales. Para su manejo y transporte se almacenaron en cajas tipo “Magenta” y reservado en un contenedor en frío (17 ° C).

2.2 CLASIFICACION Y ALMACENAMIENTO

Antes de su almacenamiento en el laboratorio, se clasificaron según el tamaño y la relación de desarrollo entre el crecimiento del pétalo y el sépalo (Cuadro 2.1.). Se descartaron aquellas muestras que presentaron daño físico o algún estado de oxidación, así como la apertura incipiente de los pétalos.

Cuadro 2.1 Clasificación de los botones colectados de *C. chinense*.

Botón F. (B)	Pétalo (P)	Sépalo	P/B	Índice de Relación
3	1	2	0.33	R1
4	2	2	0.50	R2
5	3	2	0.60	R3
6	3	3	0.50	R4
7	4	3	0.57	R5
8	5	3	0.63	R6

CAPÍTULO II

Para realizar una selección rápida de los botones colectados, se agruparon en las siguientes clasificaciones basados en el desarrollo en longitud del botón, ya que las inferencias de distintos factores como el clima o el estrés hídrico hicieron variar los tamaños del botón floral; sin embargo las proporciones en cuanto al largo del botón y el desarrollo en protrusión de los pétalos se conservaba.

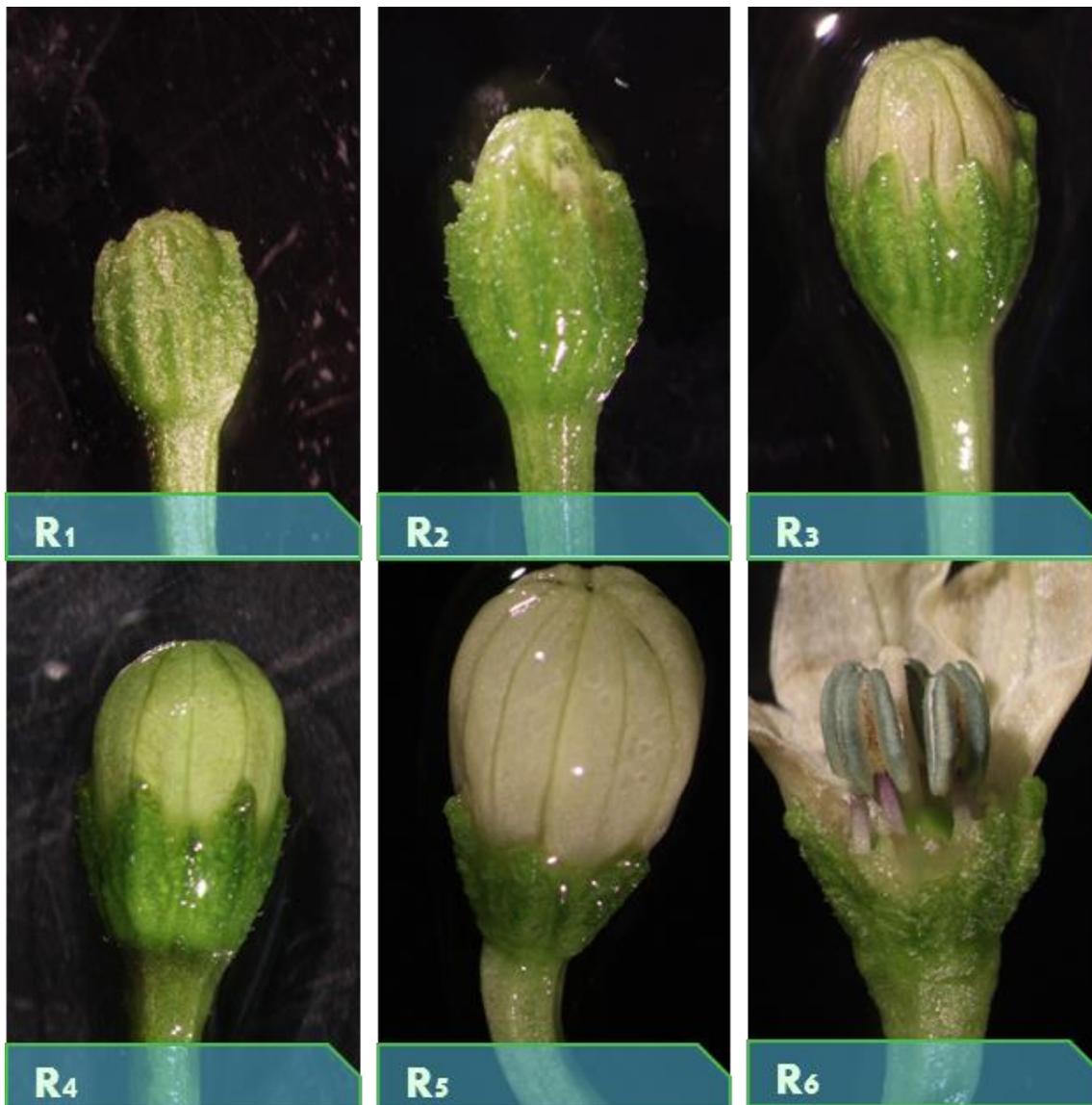


Figura 2.1. Clasificación de botones florales (*C. annuum*).

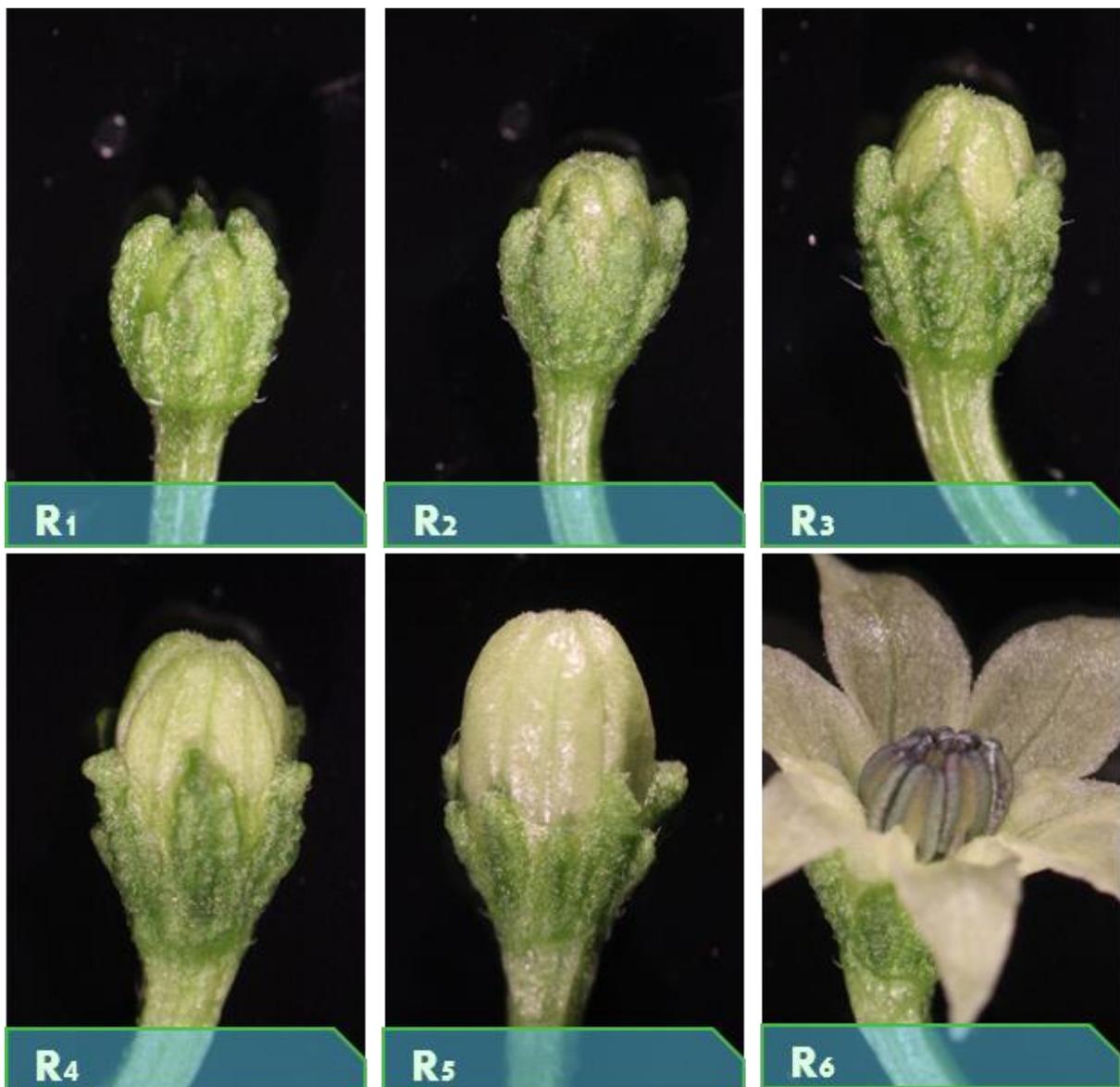


Figura 2.2. Clasificación de botones florales (*C. chinense*).

El trabajo se hizo a la par usando *Capsicum annuum* como una referencia pues existen reportes previos que establecen una relación de los marcadores morfológicos.

CAPÍTULO II

2.2 DESINFECCIÓN Y DISECCIÓN

2.2.1 DESINFECCIÓN DE BOTONES FLORALES

Tanto la intensidad como la el tiempo de exposición al tratamiento durante el proceso de desinfección, son factores muy importantes para determinar el procedimiento a seguir durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Ambos factores dependen del desarrollo del botón floral el cual por fragilidad y delicadeza le confiere un alto grado de vulnerabilidad ante cualquier agente químico. El hipoclorito de sodio (cloro comercial) fue empleado tomando en cuenta que ha sido un desinfectante ampliamente utilizado, con resultados positivos en el cultivo de tejidos vegetales.

2.2.2 PROCESO DE DESINFECCIÓN

La desinfección del botón floral se llevó a cabo en dos fases; en la primera se usaron distintas concentraciones de NaClO y posteriormente; en la segunda fase, se usaron distintos tiempos de inmersión en el agente desinfectante para minimizar el daño. Todos estos procesos se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar bajo las condiciones de asepsia pertinentes al cultivo de tejidos vegetales.

Los botones florales clasificados y seleccionados se colocaron (30 botones) en 100ml de DDH₂O con Extran (1/100 v/v) por 10 min en agitación suave para eliminar contaminantes, pesticidas y restos orgánicos. Se enjuagaron sobre un colador con abundante DDH₂O para después ser sumergida en una solución de NaClO (los tratamientos usados se muestran en el cuadro 2.2.), agitando suavemente a intervalos de 5 min por 25 min, al cabo de este tiempo, se realizó un último enjuague con DDH₂O.

2.2.3 DISECCIÓN DEL BOTÓN FLORAL

La extracción de la antera se realizó auxiliándose de pinzas de tipo “relojero” , sujetando por la base del cáliz , y removiendo en sentido exterior , iniciando por el tejido del cáliz para después continuar con los pétalos. En cada proceso es recomendable esterilizar las puntas de la pinza. Una vez descubierta la antera y el gineceo, es posible tomarla con un movimiento suave para evitar que se lastimen las tecas o fragmentar esta.

CONTAMINACION DEL CULTIVO DE ANTERAS

Se sembraron 24-30 anteras por caja petri que fueron monitoreadas cada 24 horas en el microscopio estereoscópico para verificar el crecimiento de patógenos (hongos, bacterias) se realizó el conteo de las anteras con contaminación y de aquellas que permanecían viables. El análisis estadístico se realizó tanto en ANOVA como porcentaje de contaminación para un análisis rápido.

2.3 MARCADORES MORFOLÓGICOS

Durante la microsporogénesis, el desarrollo de la microspora y del polen es paralelo a cambios en la antera y el botón floral. Estos cambios son relativos al tamaño y coloración en sí. Estos cambios correlativos ofrecen un indicador para clasificar de forma no invasiva las microsporas /polen en su fase de desarrollo.



Figura 2.3. Botón floral colectado y clasificado de acuerdo al tamaño.

Aquellos botones que presentaron apertura del pétalo fueron descartados. Con base a la clasificación establecida fue posible una rápida agrupación para su manejo en el laboratorio.

2.3.2 RELACION SÉPALO/PÉTALO

El largo de los pétalos y del sépalo ha sido usado por muchos autores como parámetro, además de la coloración por antocianinas que relacionan el desarrollo de la antera y la fase de la microspora y polen (Dunwell 2010; Koleva-Gudeva *et al.* 2007; Nowaczyk y Kisiala 2006; Lantos *et al.* 2009).

CAPÍTULO II

Cuadro 2.2 Clasificación de los botones florales usando distintas índices de relación entre longitudes.

Botón F. (B)	Sépalo (S)	Pétalo (P)	S/P	P/B	S/B
3	2	1	2.00	0.33	0.67
4	2	2	1.00	0.50	0.50
5	2	3	0.67	0.60	0.40
6	3	3	1.00	0.50	0.50
7	3	4	0.75	0.57	0.43
8	3	5	0.60	0.63	0.38

Las variables consideradas fueron: el tamaño del pétalo, color del pétalo, relación plástido/cloroplasto, tamaño del sépalo, color de la antera* (en un gradiente de antocianinas).

Cuadro 2.3. Estimación de la coloración en relación con el grado de desarrollo del botón floral.

Grado de madurez	Proximal (base)	Distal (punta)
<i>Inicial</i>	R2	
<i>Menor</i>	R3	
<i>Media</i>	R4	
<i>Mayor</i>	R5	
<i>Completa</i>	R6	

*Color de la antera: Se determinó según la intensidad y sección cubierta por la coloración violeta, debido a la presencia de antocianinas en relación con el grado de maduración.

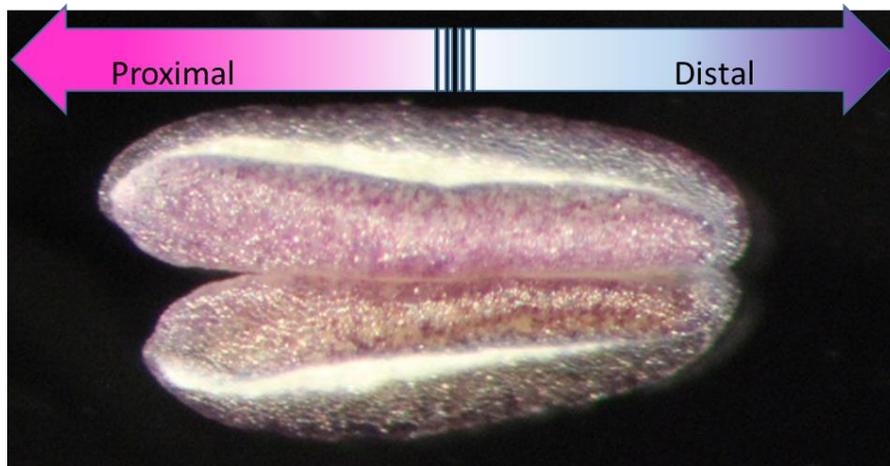


Figura 2.4. Ubicación de la pigmentación en la antera; la parte distal corresponde a la punta que se encuentra más alejada de la base del botón floral.

2.5 DESARROLLO DE LA MICROSPORA

2.5.1 OBTENCIÓN DE LAS MICROSPORAS/GRANOS DE POLEN

Una vez clasificados los botones florales en los distintos rangos (R1-R6), estos fueron diseccionados bajo el microscopio estereoscópico; se utilizaron un mínimo de 25 anteras para cada tamaño. Dichas anteras fueron fotografiadas, medidas y analizadas en cuanto al grado de pigmentación. Posteriormente, para extraer las microsporas/polen, se colocaron 5 anteras sobre un portaobjetos, cada una fue cortada transversalmente con un bisturí estéril, se colocó un cubreobjetos y mediante la técnica de “squash” fueron exprimidas. Para evitar el desliz de la muestra y como medio de montaje se adicionó 10 μ l de glicerol por antera. Una vez que las microsporas/polen fueron suspendidas en el glicerol, se retiró con mucho cuidado el tejido restante de las tecas.

ANÁLISIS CITOGENÉTICO

2.5.2 TINCIÓN CON DAPI

Se realizó la tinción de la microspora con DAPI para observar el estado de desarrollo de la misma. El proceso de tinción se realizó inmediatamente al obtener la muestra en el extracto sobre el portaobjetos; como ya se ha mencionado. Se realizaron 5 repeticiones para cada

CAPÍTULO II

muestra. A continuación, se observaron a través del microscopio confocal con el fin de identificar la fase de desarrollo de la microspora (figuras 12-16).

Para cada fase de madurez de la antera, el total de microsporas fueron categorizadas en 5 estados para simplificar su manejo; A) microsporocito B) meiocito-tétrada C) microspora vacuolada D) Polen juvenil y E) Polen maduro.

2.5.3 TINCIÓN CON CARMIN/PROPIÓNICO

Del mismo modo que se obtuvieron las muestras para la tinción con DAPI para la identificación de la fase de desarrollo, se prepararon para usar una tinción rápida que permitiera hacer el conteo de muchas muestras, esto con fines de analizar y procesar los datos estadísticos. Dicho proceso de tinción fue realizado con colorante Carmín resuspendido en ácido propiónico. El proceso de montaje consistió en agregar 40 μ L de carmín/propiónico (1%) a 50 μ L de la muestra de microsporas en suspensión de glicerol. La muestra fue incubada en obscuridad por 45min. El conteo se llevó a cabo con una cámara Neubauer. Se realizaron 5 repeticiones hasta contabilizar 300 granos de polen/microsporas (figuras 17 y 18). Estos parámetros se utilizaron para guiar la inducción del crecimiento del callo con las anteras que tuvieran mayor probabilidad de responder.

2.6 INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO

Se han usado diversos medios de cultivo con respuesta positiva en la obtención de dobles haploides a partir del cultivo de anteras, entre los cuales el medio MS y NN han sido tomados como principio a posteriores modificaciones. La composición final del medio es modificada a fin de superar la eficiencia en la producción.

Sacarosa es la fuente más común de carbohidratos usado como suplementación en el medio, con 3% como concentración que ha mostrado la mayor respuesta en la eficiencia del cultivo de anteras (Morrison *et al.* 1986; Binzel *et al.* 1996; Supena *et al.* 2006). Para el presente trabajo, se decidió usar el medio NN además suplementado con carbón activado 0.5% (Custers *et al.* 1999).

2.6.1 EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

Existe una diversidad de reguladores de crecimiento que son usados para estimular la embriogénesis a partir de microsporas. Kinetina y 2,4-d son usados en concentraciones desde 0.01 hasta 0.5 mg/L, incluso sus variantes de relación, bajando las concentraciones para estimular la embriogénesis o usando tratamientos a mayor concentración para generar callo (Sibi *et al.* 1979; Dumas de Vaultx *et al.* 1981; Chambonnet 1988; Yoon *et al.* 1991; Matsubara *et al.* 1998; Prayantini 2006). En algunos géneros recalcitrantes, se ha optado por usar Acido Indol-acético para inducir la división del polen cuando es deseada la morfogénesis de modo haploide, aunque en estos casos menos del 0.15 llegan a desarrollarse como plántulas.

Efectos positivos se han demostrado con el uso de tratamientos donde se varía a lo largo del periodo del cultivo la relación auxina/citocinina. Por ejemplo, Supena *et al.* 2004 demostraron que 2.0 mg/L de AIA y 5mg/l de Zeatina fueron suficientes para iniciar el proceso de embriogénesis a partir de microsporas de *C. Annuum*.

2.6.2 INDUCCIÓN DE CALLO EN ANTERA.

Para determinar la concentración y tipo de tratamiento con fitohormonas con mejor respuesta, se realizó una matriz de barrido para las distintas combinaciones para cada tratamiento (Cuadros 3.3 y 3.4). Tomando como limites superior e inferior las referencias previamente consultadas. En un principio se consideró como respuesta positiva a las anteras que presentaron un desarrollo de callo en un periodo de 5-10 días, este periodo fue determinado basándose en el reporte de Supena *et al.* (2006) por ser la especie más cercana a *C. Chinense*.

TRATAMIENTO CON REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Las anteras diseccionadas y desinfectadas fueron sembradas en cajas Petri (100x15mm) con medio NN (pH 5.8), suplementado con carbón activado 1%, sacarosa 3% y Gelrite® como agente gelificante; en cada medio se aplicó el tratamiento correspondiente (1-18) y el

CAPÍTULO II

control fue llevado a cabo sin usar reguladores de crecimiento, el pH fue ajustado después de agregar los reguladores y fueron esterilizados en autoclave (1.1kg cm²) por 20 min a 120°C. Las cajas fueron selladas para mantener su esterilidad. Posteriormente fueron sembradas las anteras en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar para ser incubadas en obscuridad a 27°C durante 15 días, periodo en el cual fueron monitoreadas cada 12 horas. Para aquellas que presentaron contaminación, las anteras fueron resembradas en un medio nuevo estéril cuidando la continuidad del tratamiento. Para cada tratamiento se hicieron un mínimo de 10 repeticiones, colocando en cada caja con el medio alrededor de 25 anteras de distintos botones florales (R2 y R3) como se resume en el Cuadro 3.4.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 EFECTIVIDAD DE LA DESINFECCIÓN DE ANTERAS

Durante la primera fase (a tiempo fijo = 25 min), las anteras diseccionadas fueron colocadas en medio NN suplementado con sacarosa 3% y carbón activado 1% para incubarse en obscuridad hasta por 15 días , siendo monitoreadas cada 12 horas para evaluar el porcentaje de contaminación . Aunque, efectivamente un tratamiento a mayor intensidad permite la descontaminación mejor, este también es dañino para el tejido; resultando en una antera de apariencia decolorada y de consistencia esponjosa. Aunado a esto, a pesar de la poca contaminación tanto alrededor de la entera como sobre esta misma, el tejido no mostró respuesta en proliferación celular, es decir; el NaClO resultó ser más agresivo al punto que el tejido moría. Es por esto que se optó por seleccionar el tratamiento limite donde se aún existía respuesta por parte de la antera aunque hubiera mínima contaminación en el medio, la concentración usada para lograr esto fue a NaClO 1.25%.

Para la segunda fase, se consideró la duración de la exposición del tratamiento, logrando con esto aumentar la efectividad de la desinfección mientras que la antera resistiera el proceso. Se repitió la siembra de las anteras variando los tiempos de exposición del botón floral en NaClO 1.25%.

Como se muestra en el Cuadro 3.1, el tratamiento seleccionado no fue el de mayor tiempo de exposición ya que este presentaba la dificultad que al mantener más tiempo inmerso los botones florales, estos tienden a abrir y las anteras quedan expuestas directamente al desinfectante, provocando muerte por quemadura de las mismas. Considerando la gran sensibilidad de los botones florales al agente desinfectante, se diseñó un experimento donde se evaluó el efecto de una concentración baja del agente desinfectante (1.25%) a mayores tiempos de exposición (Cuadro 3.2). El tratamiento seleccionado fue NaClO 1.25% y 25 min como condiciones de desinfección.

Cuadro 3.1. Tratamientos de [NaClO] usados para desinfectar el botón floral.

Tratamiento de desinfección		
Tratamiento [NaClO] (%)	Anteras tratadas (total)	Anteras contaminadas (%)
1	140	57.14
1.25	142	33.10
1.5	144	22.92
1.75	154	19.48
2	141	14.18

Tiempo = 25min

Cuadro 3.2. Efectividad de los tiempos de exposición al tratamiento seleccionado.

Tratamiento de desinfección		
Tiempo de exposición (min)	Anteras tratadas (total)	Anteras contaminadas (%)
20	151	80.13
25	144	40.28
30	153	39.87
35	135	20.00
40	155	10.32

Concentración de NaClO = 1.25%

3.2 DAÑO A LA ANTERA POR NaClO

El proceso de desinfección es un paso riguroso a seguir si se desea eliminar los patógenos del cultivo, sin embargo; cualquier agente químico es una variante más que puede influir.

Aunque NaClO ha demostrado tener un alto grado de eficacia al momento de eliminar patógenos, también puede afectar al tejido vegetal. Esto quedó demostrado durante el proceso de desinfección, donde un tratamiento de mayor concentración resulta ser agresivo al tejido a la vez que efectivo, como se muestra en las fotografías, el daño se hace evidente en los cambios de color y marchitamiento de los botones. Es por ello que se tomó la determinación de usar una menor intensidad en el tratamiento a pesar de la contaminación pero que garantizara la viabilidad del tejido.



Figura 3.1 Resistencia del tejido del botón floral a la exposición baja [NaClO].

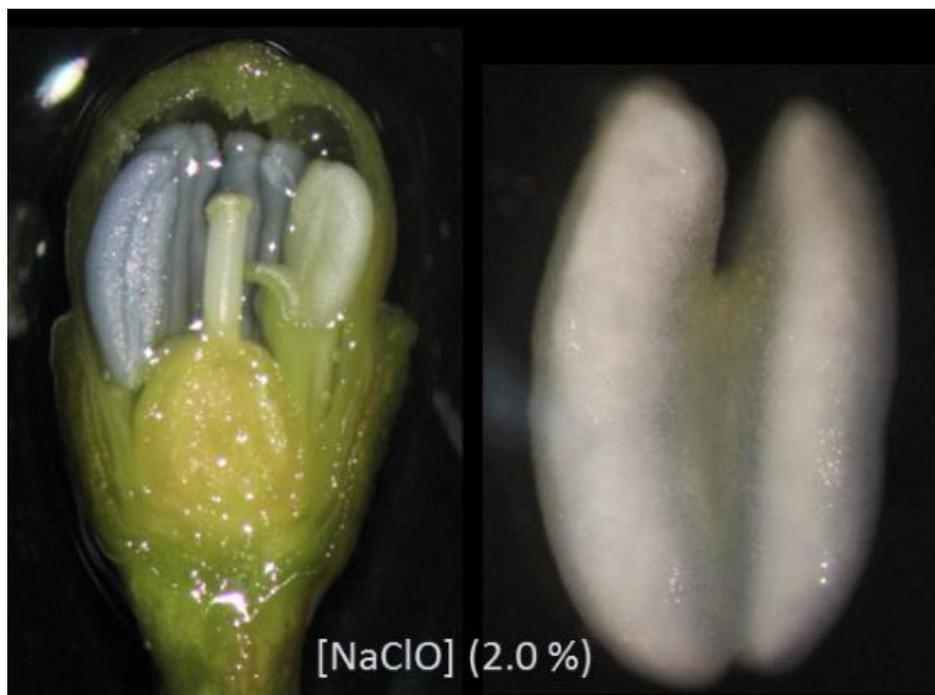


Figura 3.2 Daño mostrado por el tejido del botón floral por la exposición al [NaOCl].

3.3 MARCADORES MORFOLOGICOS

3.3.1 ESTADO DE DESARROLLO DE LA MICROSPORA

Para determinar el estado de desarrollo de la microspora, se realizó el análisis citológico extrayendo la microspora de la antera clasificada en distintos estados de desarrollo del botón. Dichos criterios fueron aplicados en forma de relación recíproca, con los siguientes índices de clasificación (figura 3.3), posterior a esto se realizó la tinción con DAPI para su observación y determinación del estado fisiológico.

3.4 DESCRIPCION DE RASGOS MORFOLÓGICOS DE *C. annuum* Y *C. chinense*.

A continuación se ilustran los resultados correlativos de los distintos botones florales en sus correspondientes fases de desarrollo para *C. chinense* y adicionalmente un comparativo

con *C. annuum*. Dicha comparación fue necesaria ya que existen reportes anteriores para los marcadores morfológicos en *C. annuum* (Parra-Vega *et al*, 2012).

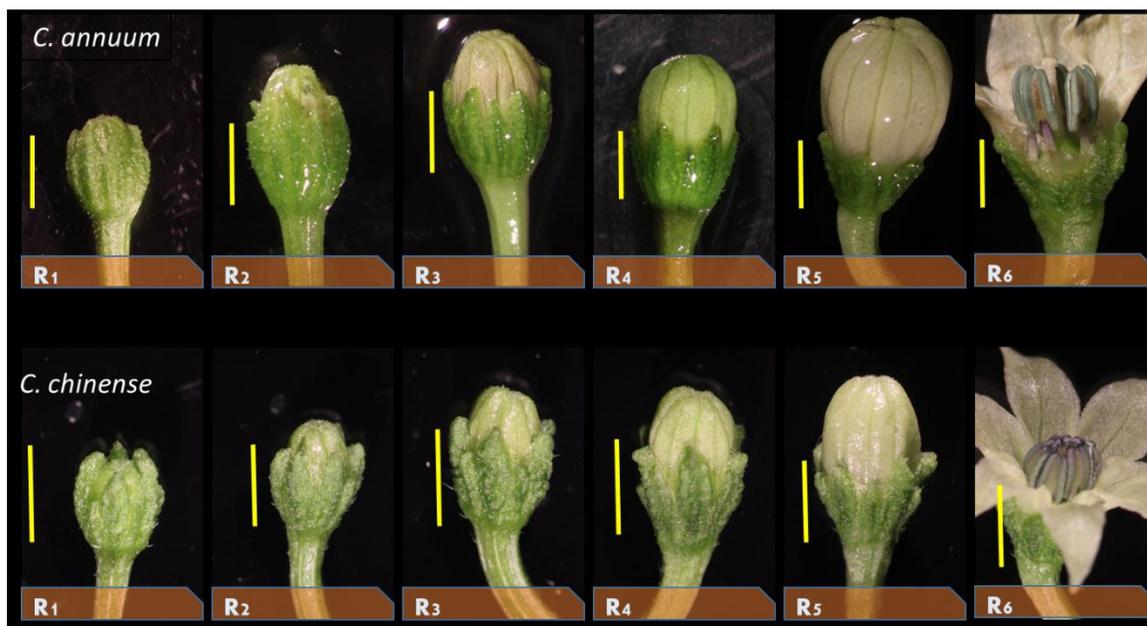


Figura 3.3 Botones de *C. annuum* y *C. chinense* respectivamente en comparación (barra = 5 mm).

3.5 BOTÓN FLORAL

Ambos botones florales presentan rasgos morfológicos similares, sin embargo, la primera diferencia que salta a la vista es el tamaño, comparativamente *C. annuum* es mayor a *C. chinense*. Un análisis más detallado ha mostrado que son un 25% más grande, y en cuanto a la estructura de los pétalos, estos tienden a ser más globulares en el primero. Otra característica notable es la rigidez y firmeza del botón en general, mientras que en *C. chinense* es más débil al manejo, detalle que otorga una dificultad al momento de hacer la disección. Para *C. annuum*, esta resistencia mecánica le otorga mayor facilidad de manejo y menor daño durante el proceso de desinfección. En cuanto al proceso de antesis, *C. annuum* ha mostrado ser más regular y con un cambio en la coloración de los pétalos al pasar de la fase R4 a R5, que se puede interpretar como una maduración más tardía si se compara a *C. chinense*; en este, la maduración de los botones denota una susceptibilidad

CAPÍTULO III

al estrés hídrico y el calor, lo cual puede acelerar el proceso de antesis. La maduración del botón se presenta en la transición de la fase R3 a R4. Se puede afirmar por tanto que; *C. chinense* es un botón de mayor fragilidad, menor tamaño y maduración precoz.



Figura 3.4 Corte longitudinal de botones de *C. annuum*.



Figura 3.5 Corte longitudinal de botones de *C. chinense*.

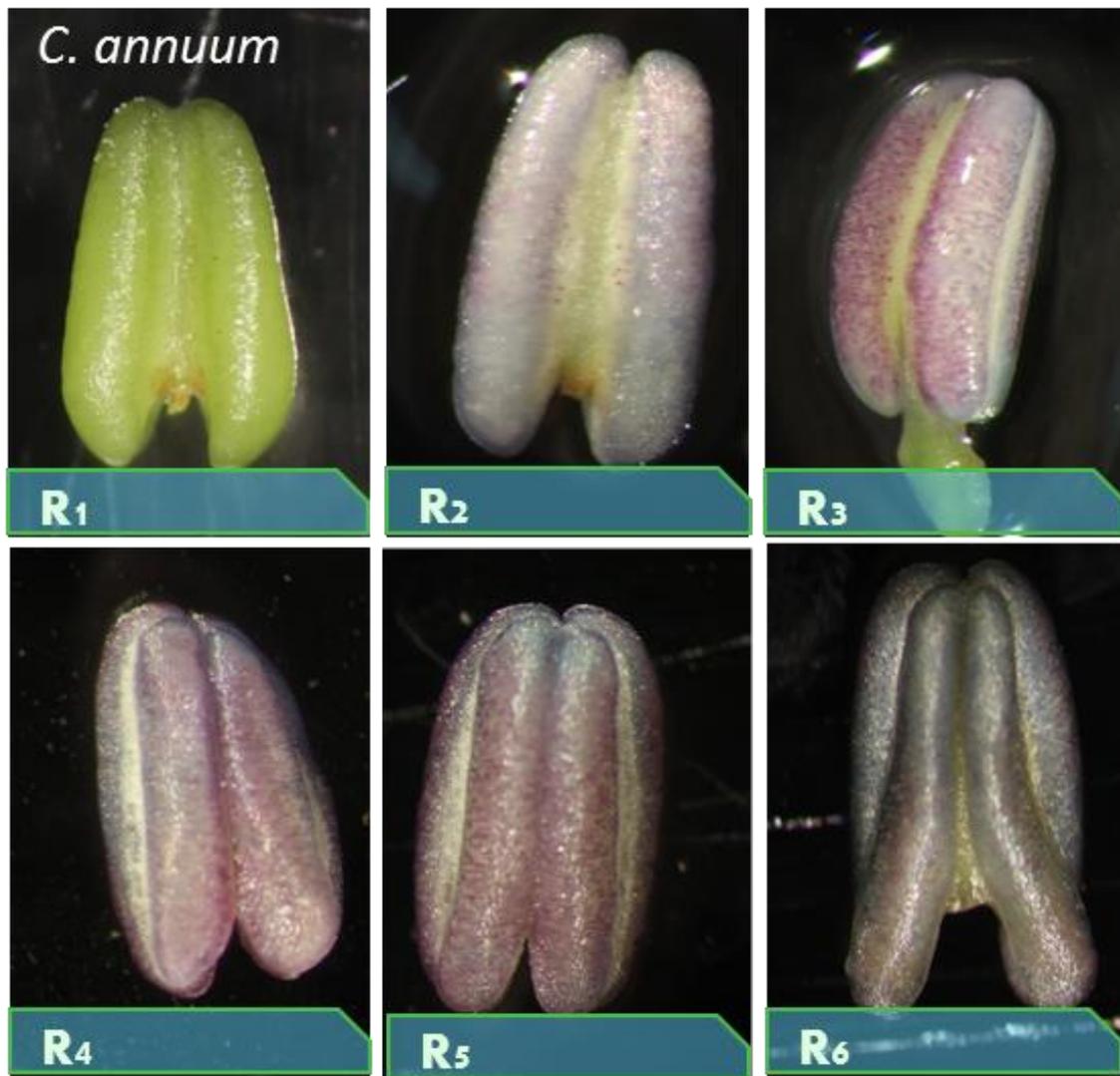


Figura 3.6 Fases de maduración de antera de *C. annuum*.

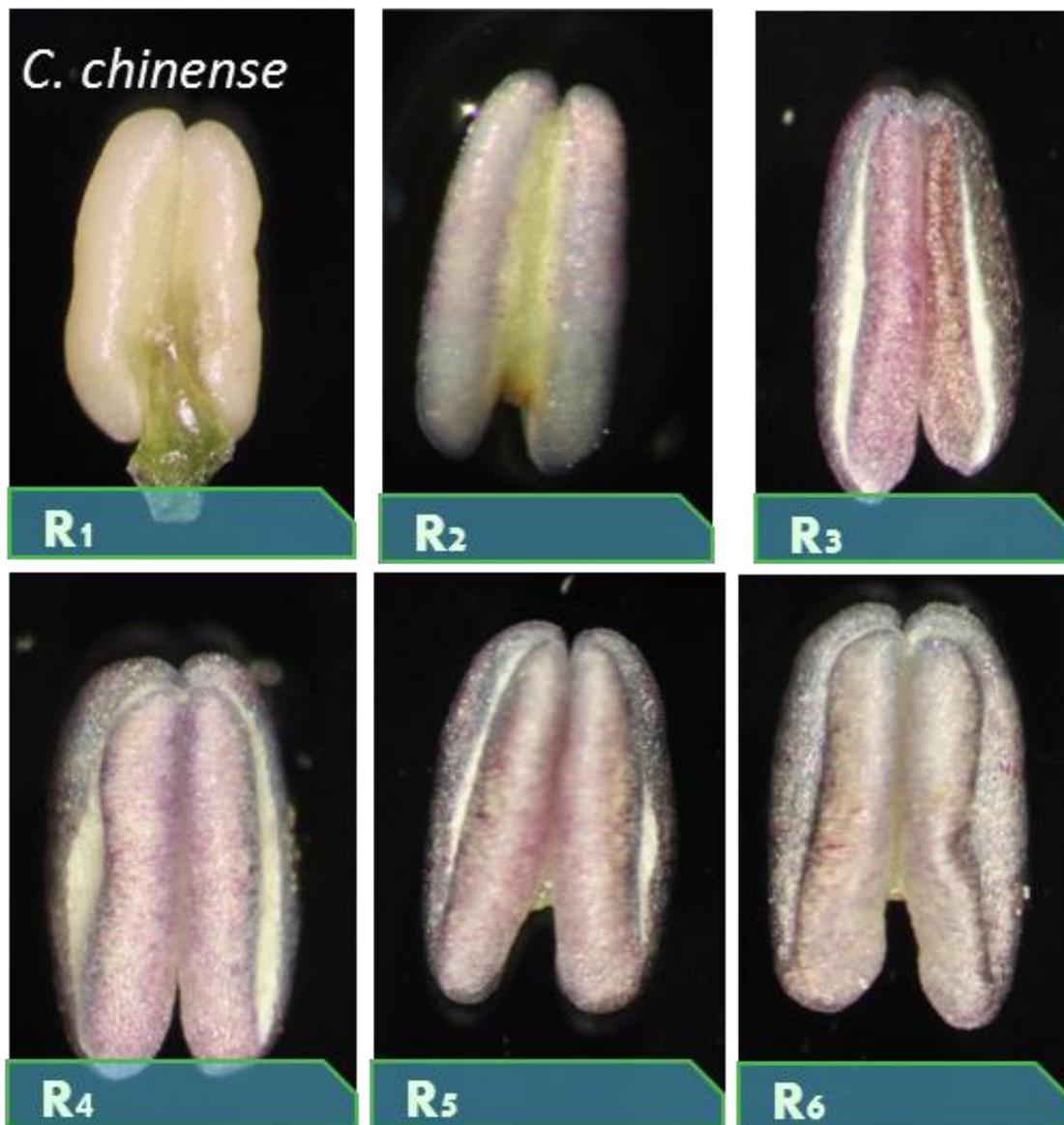


Figura 3.7 Fases de maduración de antera de *C. chinense*.

3.6 ANTERA

Similar a las condiciones del botón floral, como es de esperarse, *C. chinense* presenta mayor susceptibilidad y suavidad en el tejido vegetal. Esto es, al disectar la antera, el tejido de las tecas es frágil y de una firmeza inferior a *C. annuum*. El tamaño es similar y solo presenta un 10% mayor longitud en *C. annuum*. Pero, la maduración es diferencial, ya que: *C. annuum* se ha reportado que tiene una maduración tardía relacionada a la tinción en la

CAPÍTULO III

antera, esta se presenta durante la fase de R2 a R3. Es en dichas fases que corresponde al estado de maduración de la microspora con mayor importancia para este estudio.

La estructura firme de la antera en *C. annuum* le hace de una versatilidad mayor para el cultivo in vitro, sin embargo, para *C. chinense*; ya que la mayoría de las microsporas en la fase de interés se encuentran entre la fase R2-R3 la suavidad del tejido la hace más complicada de manejar al evitar el daño físico o su vulnerabilidad a la contaminación y agentes desinfectantes.

3.7 IDENTIFICACION DE LAS FASES DE DESARROLLO DE LA MICROSPORA

El análisis citogenético realizado con las tinciones de DAPI permitió identificar la fase de desarrollo del grano de polen, a este se le hizo seguimiento para conocer en qué etapa de maduración de la antera se encontraba. La tinción nos revelaba en principio el progreso del núcleo e incluso su desplazamiento, este debido al crecimiento de la vacuola.

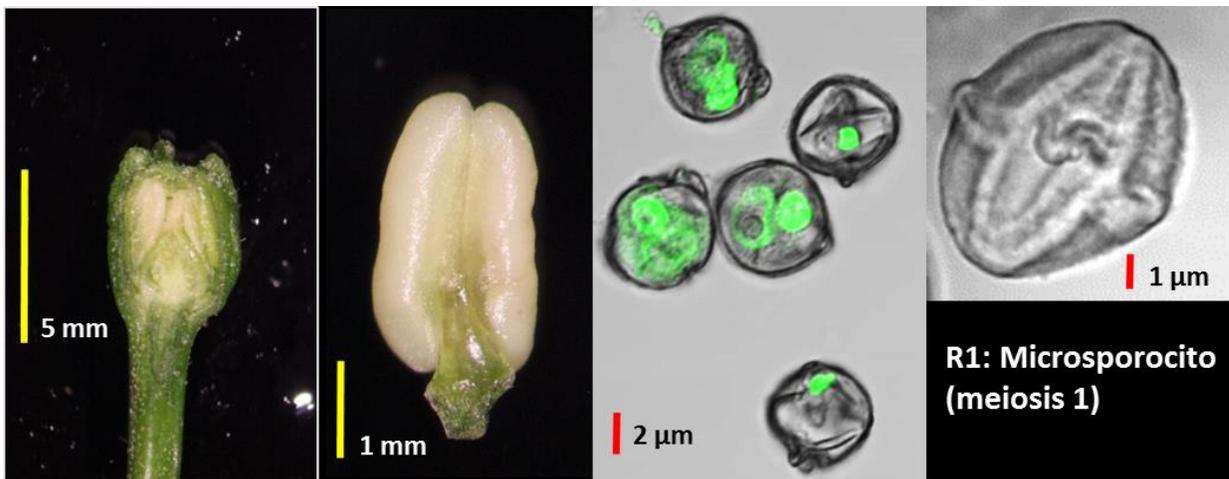


Figura 3.8 Marcador morfológico establecido para la clasificación R1; botón floral sin pétalos expuestos, antera inmadura y carente de coloración; abundancia de microsporocitos.

Los botones florales más juveniles que se colectaron corresponden a la clasificación R1. Se estableció la relación entre el tamaño del botón y la ausencia (visualmente) de los pétalos. Es un botón pequeño, en ocasiones menor a 5 mm, al hacer la disección, tanto la antera como el gineceo ya están desarrollados, sin embargo la antera no está madura ni presenta coloración debido a la presencia de antocianinas. La estructura presenta turgencia

pero el tejido no tiene resistencia mecánica, es decir; es una estructura suave. Es aquí donde comienza a madurar el esporocito, presuntamente se haya finalizado la primera división meiótica.

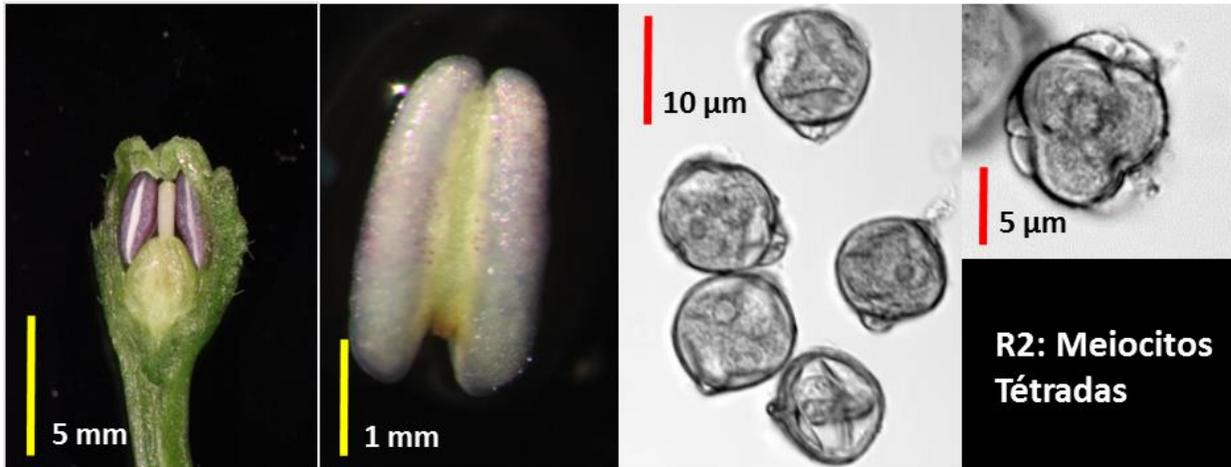


Figura 3.9 Marcador morfológico para la clasificación R2; botón floral con mínima exposición de pétalos y estos con color verde aún, antera inmadura y de escasa pigmentación primordial en la parte distal; abundancia de meiocitos en fase “tétrada”.

El siguiente estado de clasificación (R2) es fácilmente identificado por la protuberancia de los pétalos en el crecimiento del botón floral, aun sin la coloración típica y con un verde similar al sépalo. En cuanto a longitud, sobrepasa los 5 mm correspondientes al largo del cáliz. Es en esta fase cuando la antera comienza a acumular antocianinas debido al proceso de maduración de la microspora, que se encuentra tras finalizar la segunda división meiótica y por consiguiente en fase haploidal. Las células que llaman la atención son aquellas que se encuentran agrupadas en tétradas, estructura de mayor tamaño al esporocito pues aún no se han separado, la tétrada es de forma piramidal tetraédrica. Durante esta fase de desarrollo, el cambio de meiocito a tétrada es rápido, no obstante se puede hallar una tasa constante para relacionar el marcador morfológico y debido a este cambio rápido, se sugiere usar este tamaño de botón si se planea dar un tratamiento acondicionado por estrés.

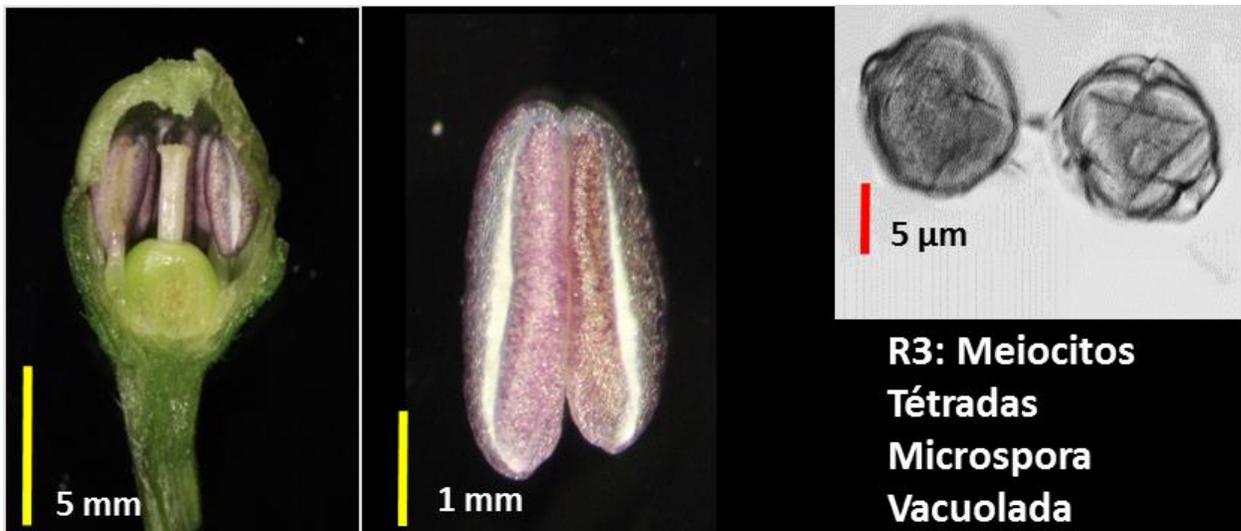


Figura 3.10. Marcador morfológico para la clasificación R3; botón floral con mediana exposición de pétalos y estos con coloración verde, antera inmadura y con la mayor parte de la superficie pigmentada desde la zona distal hasta la zona basal en rosa; abundancia de meiocitos en fase “tétrada” y varios en forma vacuolada.

El tamaño R3 fue el elegido para el cultivo de anteras, ya que presentaba diversas ventajas, en principio es más fácil de identificar a simple vista pues el desarrollo de los pétalos es más visible y aun carente de coloración, de proporción un poco menor al 50% del tamaño total del botón floral y en general, el botón es de mayor tamaño (~8 mm) y permite su fácil manipulación y disección. La antera, por su parte, se encuentra con coloración total por antocianinas aunque no en alta intensidad, que se puede evaluar visualmente por la pigmentación rosa en todo el tejido. El desarrollo de la microspora llega a una fase acelerada donde rápidamente ya se han formado las tétradas y comienzan a disgregarse en microsporas individuales que como siguiente paso empiezan a acumular sustancias en el interior de la vacuola y es notorio el desarrollo y empuje del núcleo.

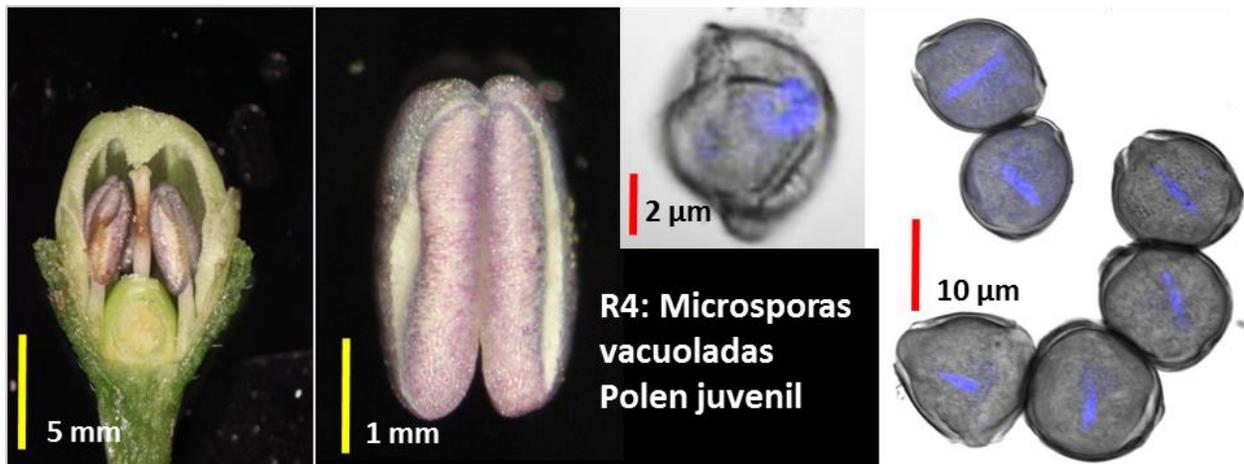


Figura 3.11. Marcador morfológico para la clasificación R4; botón floral con mayor exposición de pétalos y estos con coloración blanca, antera madura y con pigmentación total desde la parte distal a la basal además, se observa la acumulación de pigmento morado en la parte distal; abundancia de polen juvenil, microsporas y escasas microsporas vacuoladas.

Algo que resultó de llamar la atención fue que en la clasificación R4 que es donde *C. annuum* era más usado para el cultivo de anteras, *C. chinense* ya tenía un desarrollo mayor, es decir; se mostraba “precoz” en comparación. El botón floral ya es de mayor tamaño y con una madurez visible, los pétalos sobresalen del resto de la estructura y tiene color blanco típico de la flor madura. La antera muestra signos de madurez al acumular antocianinas en la parte distal, una punta morada. Además, se denota el crecimiento de la antera y mayor firmeza del tejido. Para fines prácticos del estudio, este tamaño fue descartado pues se encontró que el contenido celular fue en su mayoría granos de polen juvenil, esto dificulta el cultivo androgénico pues la microspora y sigue una vía de desarrollo a polen.

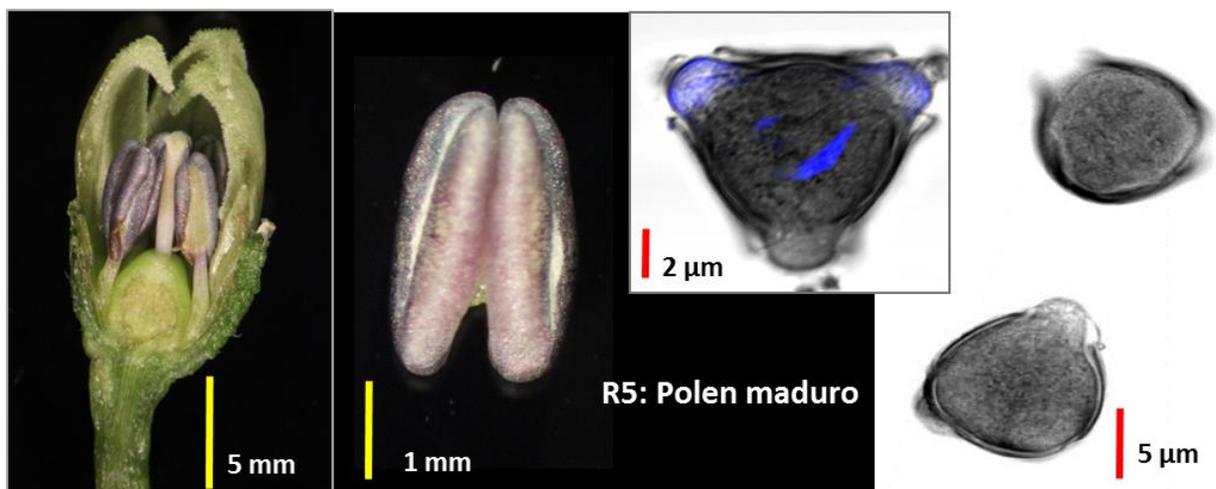


Figura 3.12. Marcador morfológico para la clasificación R5; botón floral con apertura de pétalos en madurez y estos con coloración blanca total, las anteras completamente maduras y de pigmentación completa en color morado además, las tecas se encuentran próximas a abrir; en este estado se puede encontrar el polen maduro y de forma escasa polen juvenil.

R5; Justo antes de la antesis. El botón floral ha crecido en tamaño, y los pétalos están a punto de separarse, para llegar a la antesis, abarcan en un 80% del total del tamaño del botón. La antera tiene la coloración morada típica de la flor en madurez, y como es de esperarse, más del 90% de las microsporas ya han crecido y se han convertido en granos de polen, con protuberancias y grecas típicas de este.

3.8 ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y ABUNDANCIA DE LAS MICROSPORAS EN LAS FASES DE DESARROLLO DEL BOTÓN FLORAL

Como se ha explicado ampliamente, la fase del desarrollo de la microspora es determinante para inducir la embriogénesis; no obstante, esta maduración no se da con igual sincronía dentro de la antera. Por ello fue necesario usar un análisis estadístico que revelara la abundancia relativa de cada fase de maduración de la microspora en relación a la clasificación del botón floral. Los resultados de este conteo se resumen en la figura 3.13, en la cual nos interesa denotar aquellas que tienen una abundancia mayor. Afortunadamente, y como la maduración de la microspora es un proceso consecutivo, los

cambios de un estado de la microspora al siguiente permitieron que se encontraran dos o tres fases a lo mucho en cada distinción del botón floral.

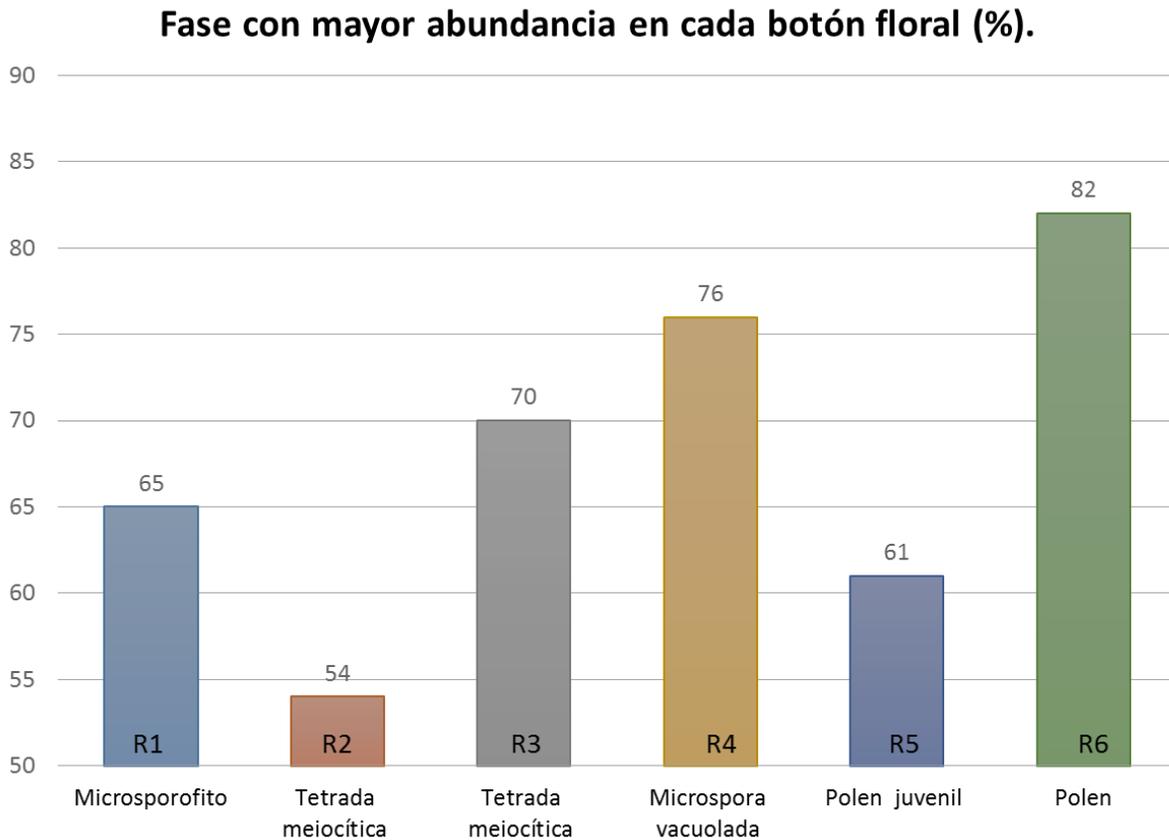


Figura 3.13. Porcentaje de microsporas según su fase de desarrollo en relación a la clasificación por tamaño del botón floral

Es de llamar la atención que existe una permuta notable al pasar entre R1-R2 y R3; así como en R4-R5 y R6. Esto lo podemos interpretar como una maduración rápida al separarse la tétrada e independizarse para iniciar la fase de crecimiento. Esta es la fase de interés, pues en este cambio la célula se considera con mayor potencial embriogénico. La microspora en esta fase conserva la estructura celular toti-potencial sin la interrupción del crecimiento vacuolar, que es una resistencia a la conversión del potencial embriogénico. Por lo cual, se extraen dos consideraciones: 1) El lapso de maduración confinado a R2 y R3 presenta microsporas aventajadas para inducir la embriogénesis, y 2) Los cambios

CAPÍTULO III

propios a la maduración de la microspora en este mismo lapso de tiempo son relativamente cortos.

Al respecto del tiempo entre la fase R5 y R6, cabe resumir que los cambios fisiológicos son acelerados, la maduración del polen es rápida como es de esperar. Esta fase responde a prioridades en el ciclo celular, la especialización de la célula gamética y la formación de la exina como capa externa.

Así mismo, era de interés ubicar para cada tamaño de botón floral la abundancia de microsporas en la fase de utilidad; tétrada y vacuolar fueron contadas en cada uno de los distintos tamaños de botón floral que se clasificaba considerando que existía la posibilidad de que hubiera en mayor cantidad en estados más avanzados de maduración del botón floral, pues también se iban acumulando las de estados anteriores (figura 3.14).

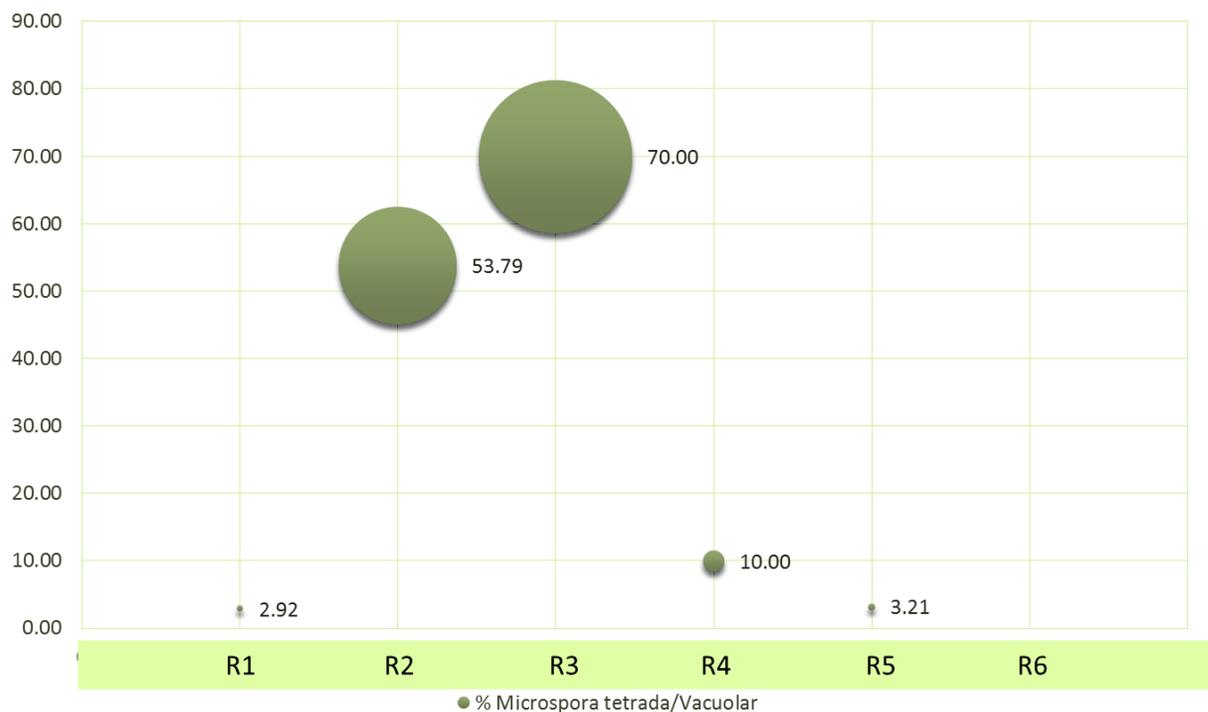


Figura 3.14 Abundancia de las microsporas que resultan de interés (tétrada y vacuolar) en los distintos tamaños del botón floral

El conteo de estas microsporas solo confirmó que los cambios en la maduración de la microspora corresponde a una serie consecutiva inequívoca donde se pone en juego la descendencia de la planta; es decir, está en sincronía la producción final de granos de polen que serán liberados durante la antesis. Por ello se denota que en las últimas fases hay escases de las microsporas en fase tétrada/vacuolar, o más bien dicho; que se han retrasado para completamente virar a la siguiente fase celular en la fase R6.

Por añadidura se puede observar que sigue siendo recomendable utilizar los botones correspondientes a R2 y R3 ya que son estos los que presentaron la abundancia en microspora tétrada y vacuolar.

3.9 RESPUESTA DE LA ANTERA A LOS TRATAMIENTOS

3.9.1 VALORACIÓN DE LA RESPUESTA

Para evaluar la efectividad del tratamiento, fueron tomados en cuenta dos criterios; la coloración y la textura del callo formado. El periodo de respuesta se observó a partir de los 5 días, tiempo en el cual era observable la proliferación celular en forma de callo, a partir de esta fecha, se categorizaron en una primera fase en anteras con respuesta (callogénesis) y después se aplicaron los criterio de coloración y textura del callo para determinar si estos tenían la posibilidad de ser embriogénicos o no (Figura 3.15).

Cuadro 3.3. Tratamientos usados para inducir callogénesis en anteras de *C. chinense*.

Tratamiento	AIA (mg/L)	ZEATINA (mg/L)	Tratamiento	2,4-D (mg/L)	CINETINA (mg/L)
1	0.05	0.05	10	0.05	0.05
2	0.05	0.1	11	0.05	0.1
3	0.05	0.2	12	0.05	0.2
4	0.1	0.05	13	0.1	0.05
5	0.1	0.1	14	0.1	0.1
6	0.1	0.2	15	0.1	0.2
7	0.2	0.05	16	0.2	0.05
8	0.2	0.1	17	0.2	0.1
9	0.2	0.2	18	0.2	0.2
Control	0.0	0.0		0.0	0.0

CAPÍTULO III

La categorización de los tratamientos responde a un barrido mínimo requerido para evaluar las distintas respuestas al balance de Auxinas/Citocininas. Por ello se inició con tratamientos de menor intensidad que fueron aumentando en una matriz de [3:3].

Las respuestas a los tratamientos fueron de naturalezas variadas, para comprender la utilidad de estas se establecieron criterio de ventaja como callo embriogénico. En primera instancia, se consideró respuesta positiva al tratamiento el crecimiento de callo poniendo especial atención que este emergiera del interior de la antera. A efecto de esto, la siguiente prioridad fue valorar el callo en cuanto a si puede o no ser embriogénico. Como ya se ha citado en otras fuentes, es de rendimiento embriogénico aquel que presenta una coloración parda sin fenolizar y de apariencia poco compacta o friable (figura 3.15).

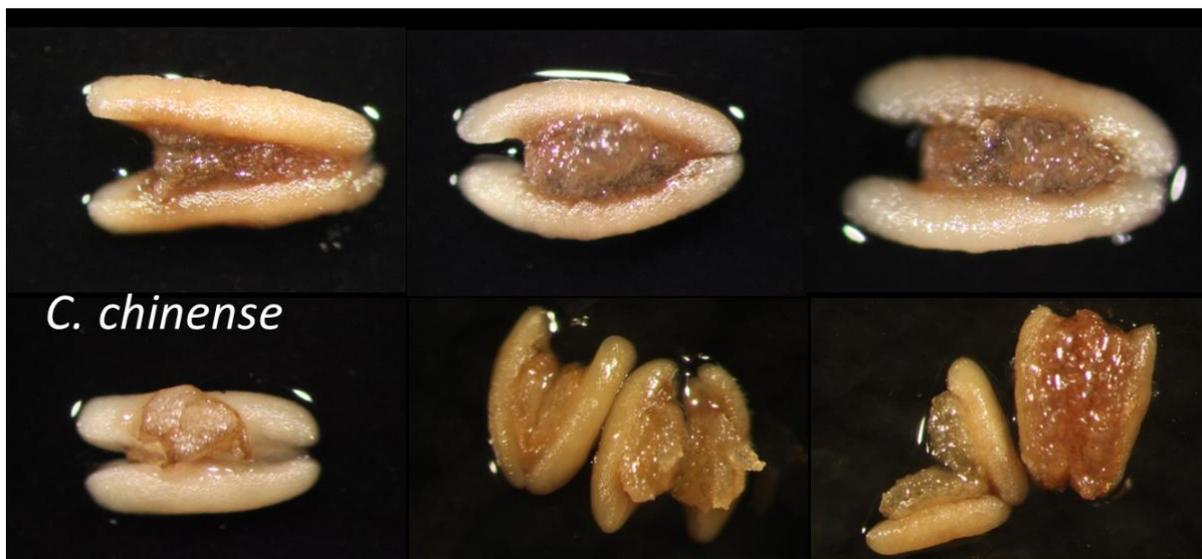


Figura 3.15. Distintas respuestas en la formación de callo.

Con base a los criterios anteriores y el análisis de las muestras, se designaron posibles tratamientos candidatos para producir la respuesta embriogénica (Cuadro 3.4) calificando los tratamientos 7, 9 y 18 por ser los que produjeron un gran número de anteras con callo, no obstante, usando el segundo criterio de discriminación para el callo, se descartó el tratamiento 9 ya que presentaba una compactación y coloración típica de una multiplicación celular no dirigida a embriogénesis.

Cuadro 3.4. Respuesta de las anteras a los distintos tratamientos. La respuesta se considera positiva si hubo formación de callo.

TRATAMIENTO	# ANTERAS totales	% ANTERAS con respuesta	E=
AIA / Zeatina			
1	238	2.10	± 0.909
2	240	1.67	± 0.384
3	240	1.25	± 0.567
4	245	4.90	± 0.950
5	250	8.00	± 2.104
6	238	5.04	± 2.065
7	240	15.42	± 1.369
8	244	9.43	± 1.495
9	252	15.87	± 2.132
2,4-D / Cinetina			
10	240	0.83	± 1.908
11	260	0.38	± 0.993
12	234	0.85	± 1.304
13	240	2.08	± 1.894
14	242	4.96	± 2.163
15	240	5.00	± 3.016
16	230	3.04	± 3.059
17	240	5.00	± 2.282
18	230	13.91	± 1.984

Como se ha comentado a lo largo del trabajo, la androgénesis es un fenómeno que responde a distintos factores y sin duda los reguladores del crecimiento vegetal son actualmente agentes que desencadenan dicha respuesta. El balance de Auxinas/Citocininas fue analizado obteniendo distintas respuestas en intensidad y calidad de potencial del tejido embriogénico.

Los efectos del tratamiento 18 responde en primer instancia a un pulso de alta intensidad de Auxinas/Citocininas sin embargo se observó que este tratamiento tan alto puede ser perjudicial en un plazo mayor, ya que 2,4-D es mutagénico, por lo cual se optó por suspender al plazo de 10-15 días de incubación. Algo similar sucedió con el tratamiento 7, pero esta respuesta fue menos exacerbada posiblemente a la proporción alta/baja de

CAPÍTULO III

Auxinas/Citocininas respectivamente. En ambos casos se considera como nueva variante a introducir los tiempos variados del pulso de tratamientos en incubación.

La facultad de la célula vegetal de ser “totipotencial” implica que en algún momento existe una designación para continuar por una vía u otra, por ejemplo como se hizo en este trabajo, se detuvo la nominación de la microspora para desarrollarse como grano de polen (sin llevar a cabo una reprogramación) para desviarla a embriogénesis. Por lo cual se caracterizó el desarrollo de la microspora y su relación con los cambios fisiológicos del botón floral y la antera.

La respuesta androgénica es algo multifactorial y complejo que aún precisa de más estudios para conocer su funcionamiento; sin embargo, existen numerosos factores que influyen en la respuesta de las anteras al cultivo *in vitro*. En el presente trabajo, se establecieron las condiciones de cultivo las condiciones de asepsia y se establecieron los parámetros morfológicos para la inducción de plantas dihaploides. Fueron establecidos además, los marcadores morfológicos y en consecuencia parámetros de desarrollo del botón floral, ambos parámetros determinante para el éxito de la inducción y se evaluaron diferentes tratamientos con reguladores del crecimiento.

DISCUSIÓN

La obtención de líneas puras u homocigotas puede requerir al menos seis ciclos de autofecundación usando las técnicas convencionales (Polci *et al.*, 2004). El empleo de herramientas como la producción *in vitro* de haploides y doble haploides, permite obtener líneas homocigotas hasta en una generación, reduciendo tiempo y costo de producción de estas líneas (González y Jouve, 2003; Polci *et al.*, 2004; Maraschin *et al.*, 2005). Además, la regeneración de plantas haploides tiene aplicación en estudios citogenéticos y genómicos (Jauhar, 1993; Aleza *et al.*, 2003), para la construcción de mapas genéticos (Oliver *et al.*, 2000) y en la evaluación de diversidad genética (Maraschin *et al.*, 2005). En varias especies hortícolas se han regenerado plantas completas a partir del gametofito masculino (granos de polen) con un número haploide de cromosomas el cual se diploidiza para generar líneas puras doble haploides (Dolcet-Sanjuan y Clavería, 2003). En *Capsicum annuum* el método más empleado para la obtención de haploides es el cultivo *in vitro* de anteras; se han desarrollado varios protocolos para la inducción de embriogénesis a partir de microsporas y la regeneración de plantas haploides en diferentes variedades (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1997; Bárany *et al.*, 2001; Kim y Jang, 2001; Kim *et al.*, 2004; Supena *et al.*, 2006); no obstante, no se conocen reportes sobre la generación de haploides de genotipos de chile cultivados en México. Sin embargo, se conoce que es la única vía de regeneración de embriones en las que se obtienen embriones con una morfología normal y que alcanzan a convertirse en plantas (Supena *et al.*, 2006).

La creciente demanda del chile habanero se debe a sus características únicas de sabor y pungencia, además de la forma característica y color llamativo. Su elevado consumo en los últimos años ha generado la necesidad de desarrollar programas de mejoramiento y el uso de las herramientas biotecnológicas para lograr resultados con mayor eficiencia. Como parte de esto, se ha estudiado el proceso de embriogénesis, resultando la recalcitrancia el factor limitante para la regeneración de plantas del género. La androgénesis puede ser una ruta de gran utilidad para para lograr entender y solucionar la incapacidad de los embriones somáticos a convertirse en plantas completas, además de constituir una ruta excelente para acortar significativamente el tiempo de mejora a partir de la obtención de plantas homocigóticas o dihaploides. En este estudio se alcanzaron avances en los aspectos básicos para desarrollar un programa de cultivo de anteras exitoso. Se estableció la relación

CAPÍTULO IV

del botón floral, la antera y la microspora. A partir de este interés se establecieron marcadores morfológicos que nos indican la fase de la meiosis más propicia para que la antera sea una candidata segura para producir plantas haploides de respuesta al someterse a cultivo *In Vitro*. No obstante, se requiere establecer cultivos masivos de anteras con las características deseadas para propiciar una frecuencia de respuesta aceptable, aplicando los marcadores morfológicos establecidos en este estudio. El presente trabajo contribuye además, al avance en el desarrollo de la metodología para la obtención de líneas doble haploides que podrían ser utilizadas en los estudios genéticos de características deseables, e incluso para producir líneas para obtener híbridos comerciales de Chile.

CONCLUSIONES

- Se estandarizaron las condiciones para el manejo del botón floral y se estableció un protocolo para la desinfección del botón floral usando NaClO en concentraciones bajas (1.25%) durante 25 min. Estas condiciones responden no a la eficiencia de desinfección, más bien a la prioridad de conservar viable al tejido de interés que resulta la antera. Fue por esto que las condiciones de intensidad y tiempo dejaban un bajo pero perceptible índice de contaminación (~33%) a consecuencia de sacrificar estas, se garantizó la mayoría de respuesta lábil a partir de la antera y el resto de las condiciones de cultivo.
- Se establecieron las marcas visuales del desarrollo del botón floral, la madurez de la antera y por consiguiente las fases consecutivas del desarrollo del meiocito-microspora-grano de polen, para *C. chinense* y para *C. annuum*.
- Se determinó que para la inducción de la androgénesis a través del cultivo de anteras debe tomarse el botón en las fases R2 y R3 son las más adecuadas y con mayor probabilidad de encontrar la fase de tétrada y la vacuolar.

TRATAMIENTOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA ANDROGÉNESIS

- Los tratamientos con concentraciones de AIA 1.04 μM , Zea 0.04 μM y 2,4-D 0.9 μM , Cin 0.9 μM fueron los que obtuvieron la respuesta de mayor interés, ya que estos generaron callo de tipo embriogénico en las anteras de forma constante y regular.

PERSPECTIVAS

Los resultados que se presentan en este trabajo servirán de base para la realización de futuras investigaciones orientadas a desarrollar embriones que eviten las malformaciones y consecuentemente plántulas en *Capsicum chinense* Jacq., y particularmente asociadas con la recalcitrancia *in vitro* del género *Capsicum*. Dichos avances han ayudado a entender el proceso androgénico y la importancia de la fase de desarrollo de la microspora. Además, las estructuras que de este cultivo se obtengan serán de tipo haploidal, cuya importancia radica en la generación de nuevos modelos de estudio, la mejora genética y el aporte de nuevas herramientas biotecnológicas.

Ya que se ha visto que la duración y la intensidad de los tratamientos con reguladores de crecimiento son efectivos para estimular la respuesta androgénica, es recomendable estudiar más a fondo los periodos de estos, pues también pueden existir respuestas desfavorables. Así como explorar con otros factores estimulantes a la androgénesis como los fotoperiodos o tratamientos de estrés térmico.

El estudio de la microspora puede ser más claro si se desconecta de la antera, dentro de lo cual presenta un nuevo panorama de estudio a partir del cultivo de la microspora aislada.

BIBLIOGRAFÍA

- Bárány I, Testillano PS, Mityko J, Risueno MC (2001) The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int J Dev Biol* 45(S1):S39–S40
- Bárány I, Gonzalez-Melendi P, Fadón B, Mitykót J, Risueño MC, Testillano PS (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol Cell* 97:709–722
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*. 15:536-540.
- Bommert P, Werr W (2001) Gene expression patterns in the maize caryopsis: clues to decisions in embryo and endosperm development. *Gene* 271:131–142
- Brown, D.C., Thorpe, T.A. (1995) Crop improvement through tissue culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 409-415.
- Buyukalaca, S. and Mavituna, F. (1996), Somatic Embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 46: 227- 235.
- Comlekcioglu N, Buyukalaka S, Abak K (2001) Effect of silver nitrate on haploid embryo induction by anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). In: XIth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of capsicum and eggplant, Antalya, Turkey, pp 133–136
- Custers JBM, Snepvangers SCHJ, Jansen HJ, Zhang L, Van Lookeren Campagne MM (1999) The 35S-CaMV promoter is silent during early embryogenesis but activated during nonembryogenic sporophytic development in microspore culture. *Protoplasma* 208:257–264

CAPÍTULO VI

- Davies, P.J. (1995). *The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions*. In: Davies P.J. (Ed). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, pp 1-11.
- Davies PA, Morton S (1998) A comparison of barley isolated microspore and anther culture and the influence of cell culture density. *Plant Cell Rep* 17:206–210
- DeWitt D. y P.W.Bosland (1993). *The pepper garden*, Ten Speed Press. 219 p
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48:1493–1509
- Dumas de Vault R, Chambonnet D, Pochard E (1981) In vitro culture of pepper (*Capsicum annum* L.) anthers: high rate plant production from different genotypes by +35_C treatments. *Agronomie* 1:859–864
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnol J* 8(4):377–424. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x
- Ferrie A, Bethune T, Mykytyshyn M (2011) Microspore embryogenesis in Apiaceae. *Plant Cell Tiss Org Cult* 104:399–406
- Ferrie A, Caswell K (2011) Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tiss Org Cult* 104:301–309
- Ferrie AM, Möllers C (2011) Haploids and doubled haploids in Brassica spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell Tiss Org Cult* 104:375–386
- Ferrie AM (2013) Advances in microspore culture technology: a biotechnological tool for the improvement of medicinal plants *Biotechnology for Medicinal Plants*. Springer, Dordrecht, pp 191–206
- Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for in vitro regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64:39–46

- Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regul* 43:27–47
- Germaná MA (2006) Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Org Cult* 86:131–146
- George E.F., M.A.Hall y G.d.Klerk (2008). *Plant propagation by tissue culture. Volume 1: the background*, Springer-Verlag GmbH. 552 p.
- Graner A (1996) RELP-mapping the haploid genome of barley (*Hordeum vulgare* L.). In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 3. Kluwer, Dordrecht, pp 127–150
- Indrianto A, Barinova I, Touraev A, Heberle-Bors E (2001) Tracking individual wheat microspores in vitro: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta* 212:163–174
- Irikova T, Grozeva S, Rodeva V (2011) Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Physiol Plant* 33:1559–1570
- Islam S, Tuteja N (2012) Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Sci* 182:134–14
- Kim M, Jang IC, Kim JA, Park EJ, Yoon M, Lee Y (2008) Embryogenenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425–434
- Koleva-Gudeva L, Spasenoski M, Trajkova F (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. *Sci Hortic* 111:114–119
- Kothari S.L., A. Joshi, S. Kachhwaha and N. Ochoa-Alejo (2010) Chilli peppers — A review on tissue culture and transgenesis *Biotechnology Advances*, 28(1): 35-48

CAPÍTULO VI

- Lantos C, Ge´mes Juha´s z A, Somogyi Gy, O´ tvo´s K, Va´gi P, Miha´ly R, Kristo´f Z, Somogyi N, 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 Org Cult* 97(3):285–293
- Lantos C, Juha´s z A, Somogyi G, O´ tvo´s K, Va´gi P, Miha´ly R, Kristof Z, Somogyi N, 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 Tiss Org Cult* 97(3):285–293. doi:10.1007/s11240-009-9527-9
- Lichter R (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z Pflanzenphysiol* 105:427–434
- Liu F, Zhao H, Chen B, Zhang YY (2007) Embryogenesis of microspore derived multicells in *Capsicum annuum* L. *Fen Zi Xi Bao Cheng Wu Xue Bao* 40:371–379. <http://www.lib.bioinfo.pl/> pmid:18198578
- Lopez-Puc G. (2006) Direct Somatic Embriogenesis: A Highly Efficient Protocol for In Vitro Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) *HortScience* 41(7): 1645-1650.
- Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (2003) Doubled haploid production in crop plants: a manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Mansfield S, Briarty L (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can J Bot* 69:461–476
- Mansfield S, Briarty L, Erni S (1991) Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Can J Bot* 69:447–460
- Martínez, V.R. (2000). Estudio morfológico de 34 poblaciones de chile (*C. chinense* y *C. annumm*) en Yucatán. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2 de Conkal, Yucatan. 44p.

- Mitykó J, Fári M (1997) Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture. Hort Biotech In Vitro Culture Breed 447:281–288
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Nowaczyk P, Kisiala A (2006) Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *J Appl Genet* 47(2):113–117
- Page SL, Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789 Zickler D, Kleckner N (1999) Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 33:603–754
- Parra-Vega V., González-García B., Seguí-Simarro JM. (2013) Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) *Acta Physiol. Plant.* 35:627–633 DOI 10.1007/s11738-012-1104-x
- Pérez-Molphe-Balch, E., R. Ramírez-Malagón, H. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes (ed), Primera edición México. pp. 179
- Perez, P.M. (2000). Exploración de la diversidad morfológica de chiles (*C. annumm*) regionales un una comunidad de Yucatán, México. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2 de Conkal, Yucatán. 64p.
- Polsoni L, Kott LS, Beversdorf WD (1988) Large-scale microspore culture technique for mutation selection studies in *Brassica napus*. *Can J Bot* 66:1681–1685
- Pozo C. O., S Montes H., E. Redondo (1991). Chile (*Capsicum* spp.). In: R. Ortega, G. Palomino, F. Castillo, V.A. Gonzalez y M. Livera (eds.). *Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*. Sociedad Mexicana de Citogenética A.C. Mexico Pp. 217-238.

CAPÍTULO VI

- Regla-Márquez C.R. (2016) Cadaverine: a common polyamine in zygotic embryos and somatic embryos of the species *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 124: 253-264.
- Regner F (1996) Anther and microspore culture in *Capsicum*, In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 3. Kluwer, The Netherlands, pp 77–89
- Rodeva V (2001) *In vitro* regeneration in anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci Works Agricult Univ Plovdiv* 3:211–214
- Rodeva V, Irikova T, Todorova V (2004) Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study on effect of the genotype. *Biotechnol Biotechnol Equip* 3:34–38
- Santana-Buzzy N. (2005) Regeneration of Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *HortScience* 40(6): 1829-1831.
- Seguí-Simarro JM, Corral-Martínez P, Parra-Vega V, González- García B (2011) Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep* 30(5):765–778. doi:10.1007/s00299-010-0984-8
- Seguí-Simarro JM (2010) Androgenesis revisited. *Bot Rev* 76:377–404
- Shariatpanahi ME, Bal U, Heberle-Bors E, Touraev A (2006a) Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol Plant* 127:519–534
- Shariatpanahi ME, Belogradova K, Hessamvaziri L, Heberle-Bors E, Touraev A (2006b) Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment. *Plant Cell Rep* 25:1294–1299
- Shivanna KR (2003) *Pollen biology and biotechnology*. Science Publishers Inc., Enfield

- Supena EDJ, Suharsono S, Jacobsen E, Custers JBM (2006) Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep* 25:1–10
- Terán S. y C.H. Rasmussen (1998). *Las plantas de la milpa entre los mayas*. Fundacion Tun Bem Kin. A.C. Yucatán, México. 349p.
- Thomas WTB, Forster BP, Gertsson B (2003) Doubled haploids in breeding. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Kluwer, Dordrecht, pp 95–102
- Ueda M, Zhang Z, Laux T (2011) Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Dev Cell* 20:264–270
- Valle-Gough R.E. (2015) Polyamines and *WOX* genes in the recalcitrance to plant conversion of somatic embryos of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) *African Journal of Biotechnology* vol. 14(7), pp. 569-581.
- Wang LH, Zhang BX (2001) Advancement in the anther culture of *Capsicum annuum* L. *China Veg* 3:52–53
- Zapata-Castillo P. Y. (2007) Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. cinense* Jacq.) from Cell Suspensions. *HortScience* 42(2): 329-333.
- Zhang Z, Laux T (2011) The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sex Plant Reprod* 24:161–169
- Zimmerman J. L., (1993) Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5, 1411-1423

ANEXO

PROPUESTA DE PROTOCOLO PARA LA INDUCCION DE ANDROGÉNESIS EN *C. chinense*.

El siguiente protocolo para *C. chinense* se divide en tres fases importantes, 1) selección del explante, 2) desinfección y disección e 3) inducción de la androgénesis.

1) Selección del explante:

- Utilizar los botones florales correspondientes a la segunda floración y subsecuentes, esto es aproximadamente después de los 40 días de trasplante a invernadero (una vez adaptadas las plántulas). Los botones florales con mejor respuesta han sido los que presentan menor grado de deshidratación y (a juicio visual) presentan menor daño.
- Colectar los botones que se encuentran en R2 y R3, esto es; donde el desarrollo de los pétalos no ha sobrepasado en proporción al desarrollo del cáliz y aún tiene coloración verde debido a la presencia de cloroplastos y las anteras han pasado de la fase inicial de desarrollo a la fase juvenil, esto se puede confirmar por la coloración rosada en la mayoría de la superficie. Es preferible descartar las anteras que presentan pigmentación morada en las puntas, pues es un indicativo que las microsporas han madurado existen en poca abundancia en fase tétrada.
- La conservación del botón floral se hará en un ambiente fresco (17 °C) y húmedo, para ello se puede transportar en un contenedor térmico dentro de envases sellados a los cuales se ha agregado un poco de agua estéril en el interior.
- Para almacenar los botones en condiciones de laboratorio, se deben clasificar y agrupar, además de retirar la humedad y guardar en frío a 4 °C sin exceder de un periodo de 24 horas. A partir de este momento, el choque de estrés acelera la maduración de la microspora hacia el grano de polen.

2) Desinfección y disección

- El manejo del botón floral debe ser con mucha delicadeza, ya que por la naturaleza de este tejido es muy susceptible a daño, deshidratación y marchitamiento. Así mismo, el proceso de desinfección es poco agresivo aunque se sacrifica la esterilidad.
- Para el proceso de desinfección, utilizar solo botones que están cerrados, aquellos que abran como resultado del proceso de desinfección es preferible descartarlos, ya que no se obtendrá una respuesta positiva en la generación de callo durante los tratamientos con auxinas/citocininas.
- Colocar 30-50 botones florales en un vaso de PP. de 500 ml, conteniendo DDH₂O y extrán (100:1 v/v). Colocar en una parrilla de agitación a baja revoluciones por 10 min. Transcurrido este tiempo, enjuagar a través de un colador con abundante DDH₂O.
- Preparar previamente la solución de NaClO 1.25% y sumergir los botones florales, agitar suavemente con la mano por 25 min por intervalos de 5min. Repetir 3 veces el enjuague con DDH₂O y colocar en una caja Petri estéril. Con esto se obtiene más del 70% de anteras libres de contaminación.
- Dentro de la campana de flujo laminar, llevara a cabo la disección de la antera, siempre usando pinzas estériles en cada cambio y cuidando que no sobrepase la temperatura (para esto se pueden enfriar en DDH₂O). Sujetar por la base del botón con una pinza y con la otra mano retirar cada pétalo hasta dejar expuesto el interior de la flor. Adicionalmente, para los botones más compactos, es recomendable hacer una segunda disección para retirar partes del cáliz cuidando de no maltratar la antera. Aunque esto es un proceso muy laborioso es preferible pues deja al descubierto la antera y se reduce el riesgo de usar excesiva fuerza al momento de extraerla.

3) Inducción de la androgénesis.

- Las anteras seleccionadas se colocaran en cajas Petri con medio NN al cual se le agregará carbón activado 1%, sacarosa 3% y Gelrite como gelificante. los tratamientos con mejor respuesta son a) AIA 0.2 mg/L y Zeatina 0.05 mg /L y b) 2,4-D 0.2 mg/L y cinetina 0.2 mg/L. tanto el carbón activado como el Gelrite serán añadidos después de ajustar el pH a 5.8 (es de esperarse que le pH descienda después de ser esterilizado con calor) y esterilizar a 1.1 kg/cm² por 20 min a 120 °C.
- Colocar en cada caja Petri (100 x 15 mm) no más de 30 anteras, esto es ya que en el caso de contaminación poder retirarlas evitando el contacto entre sí.
- Incubar en obscuridad a 27 °C, y al cabo de 5 -10 días se puede observar el crecimiento de callo en la antera.

ANEXO

MEDIO NN (NITSCH & NITSCH 1969)

Soluciones concentradas:

Solución de macronutrientes (concentración 100X. volumen 1 litro)

Nitrato de amonio	NH_4NO_3	72.00 g
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.50 g
Nitrato de potasio	KNO_3	95.00 g
Fosfato monobásico de potasio	KH_2PO_4	6.8 g

Solución de micronutrientes (concentración 100X. Volumen 100ml)

Ácido bórico	H_3BO_3	1.00 g
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.5 g
Molibdato de sodio	NaMoO_4	25.0 mg
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g

Solución Fe-EDTA (concentración 100X volumen 1 litro)

Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78 g
EDTA disódico	Na_2EDTA	3.73 g

Solución de cloruro de calcio (concentración 100X. volumen 1 L)

Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16 g
-------------------	---	------