



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA FORMACIÓN Y
DESARROLLO DEL MERISTEMO CAULINAR EN
EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

CARLOS FERNANDO REGLA MÁRQUEZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Carlos Fernando Regla Márquez titulado “Análisis de la expresión de genes involucrados en la formación y desarrollo del meristemo caulinar en embriones cigóticos y somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)” fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 31 de Mayo de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Nombre: M. en C. CARLOS FERNANDO REGLA MÁRQUEZ

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

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado (Becario: 224259)

A la Dra. Nancy Santana Buzzy por todo su apoyo, confianza y amistad.

A los técnicos: M. en C. Adriana Canto Flick, M. en C. Eduardo Balam Uc y M. en C. Francisco Javier García Villalobos por su ayuda en el trabajo técnico.

A la Dra. Susana Aviles Viñas, Dr. Raúl E. Valle Gough y al M. en C. Pedro Osorio Montalvo por su apoyo técnico en el área de Biología Molecular.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dr. Gregorio Godoy Hernández y Dr. Raúl Tapia Tussell por sus sugerencias y críticas para el enriquecimiento de este trabajo.

A los miembros de mi comité evaluador: Dra. Sara E. Solís Pereira y Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés.

A mis compañeros de laboratorio: Liliana Saraí Muñoz Ramírez, Laura Patricia Peña Yam por su amistad.

DEDICATORIAS

A Dios, por darme vida, por su amor y protección.

A mi esposa Sara Villanueva Viramontes, por su amor, apoyo y motivación que me da cada día.

A mis hijos Dania y Dante que siempre dan alegría a mi corazón.

A mis padres Higinio Regla Vázquez y María Teresa Márquez Amezcua, a mis hermanos, Higinio y María Teresa que siempre me han brindado su amor, apoyo y ejemplo.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	v
LISTADO DE CUADROS	viii
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. CHILE HABANERO (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).	3
1.1 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE <i>Capsicum chinense</i>	3
1.2 EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA	4
1.2.1 FORMACIÓN DEL SUSPENSOR Y ELONGACIÓN DEL CIGOTO	7
1.3. MERISTEMO CAULINAR	8
1.3.1 GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DEL MERISTEMO CAULINAR	10
1.4. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	14
1.4.1. GENES EXPRESADOS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	17
1.5 REGENERACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>Capsicum</i> spp.	19

JUSTIFICACIÓN	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
CAPÍTULO II	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 CONDICIONES GENERALES	25
2.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL	25
2.3 INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	26
2.4 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc. DE EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i>	26
2.5 DISEÑO DE CEBADORES	27
2.6 REAMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS Y SECUENCIACIÓN.	28
2.7 ANÁLISIS DE SECUENCIAS MEDIANTE UNA INFERENCIA FILOGENÉTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS GÉNES DE ESTUDIO EN <i>Capsicum chinense</i> .	29
2.8 ANÁLISIS POR PCR TIEMPO REAL	32
CAPÍTULO III	33
RESULTADOS	33

3.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	33
3.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE DIFERENTES EXPLANTES DE <i>C. chinense</i> Y SÍNTESIS DE ADNc.	34
3.3. ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS GENES ESTUDIADOS DE <i>C. chinense</i> .	36
3.3.1 <i>WUS</i>	36
3.3.2 <i>PIN7</i>	39
3.3.3 <i>PIN1</i>	41
3.3.4 <i>CUC2</i>	44
3.3.5 <i>NAM</i>	46
3.3.6 <i>STM</i>	49
3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS PUTATIVOS EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i> .	53
3.4.1 PRUEBA DE CEBADORES PARA PCR TIEMPO REAL.	53
3.4.2 ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE <i>WUS</i> EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i> .	54
3.4.3 NIVELES DE TRANSCRITOS DE <i>PIN7</i> Y <i>PIN1</i> EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i>	54
3.5.4 ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE <i>CUC2</i> , <i>NAM</i> Y <i>STM</i> EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i> .	56
CAPÍTULO IV	59

DISCUSION	59
CAPÍTULO V	63
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	63
ANEXOS	65
BIBLIOGRAFÍA	85

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.1 Localización de las proteínas PIN7 (naranja) y PIN1 (rojo); flujo de auxinas en el embrión (flechas azules); percepción máxima de auxinas (verde) (Modificado de Jenik et al., 2007). 6
- Figura 1.2 Desarrollo del linaje apical basal. MC=meristemo caulinar, MR=meristemo radical (Bósca et al., 2011). 8
- Figura 1.3 Organización del meristemo caulinar de *Arabidopsis* (Modificado de Tucker y Laux, 2007). C1, C2, C3= Capa 1, 2 y 3; CO= Centro Organizador. 9
- Figura 1.4 Dominios conservados en WUS. HD: homedominio; WD: caja WUS; EAR: Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression. 10
- Figura 1.5 Dominios conservados en STM. 12
- Figura 1.6 Dominio NAC en la familia de genes CUC y NAM. 12
- Figura 1.7 Desarrollo del dominio apical en el embrión (Modificado de Laux et al., 2004) 13
- Figura 1.10 Diagrama experimental para el análisis de expresión los genes *WUS*, *PIN7*, *PIN1*, *CUC2*, *NAM*, y *STM* en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* 23
- Figura 3.1 a) Hipocótilo de *C. chinense* a los 45 días de inducción del proceso de embriogénesis somática. b) Embriones somáticos de *C. chinense* emitiendo únicamente la radícula. 34
- Figura 3.2 a) Extracción de ARN total de embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* b) Comprobación de calidad del ADNc de *C. chinense* por medio del gen constitutivo 18S. GC: embriones en etapa globular y corazón; TC: embriones en etapa torpedo y cotiledonar; MC: meristemo caulinar; B: blanco. 35
- Figura 3.3 Amplificación de un putativo de *WUS* (110pb) de *C. chinense*, en 36

LISTADO DE FIGURAS

embriones cigóticos, somáticos y meristemo caulinar (MC). GC: estadios globular-corazón, M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

Figura 3.4 Inferencia filogenética del gen *WUS*, mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros. 38

Figura 3.5 Amplificación de un putativo de *PIN7* (190pb) en meristemo caulinar de *C. chinense* con un gradiente de temperatura., M: Marcador de peso molecular (1 Kb). 39

Figura 3.6 Inferencia filogenética del gen *PIN7* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros. 41

Figura 3.7 Amplificación de un putativo de *PIN1* (pb) en meristemo caulinar de *C. chinense* con un gradiente de temperatura., M: Marcador de peso molecular (1 Kb). 42

Figura 3.8 Inferencia filogenética del gen *PIN1* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor. 43

Figura 3.9 Amplificación de un putativo de *CUC2* en meristemo caulinar de *C. chinense* con la combinación de cebadores CUC2 1-5. M: Marcador de peso molecular (1 Kb). 44

Figura 3.10 Inferencia filogenética del gen putativo *CUC2* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros. 46

Figura 3.11 Amplificación de *NAM* en meristemo caulinar de *C. chinense* con la combinación de cebadores NAM 1-4. 3b y 4b: gel de los cebadores NAM3 y NAM4 con mayor exposición. M: Marcador de peso molecular (1 Kb). 47

Figura 3.12 Inferencia filogenética del gen *NAM* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor. 48

Figura 3.13 Amplificación de un putativo de *STM* en meristemo caulinar de *C. chinense* utilizando diferentes gradientes de temperatura. a) Combinación STM1 (297 pb) b) Combinaciones STM2 (130 pb) y STM3 (137 pb) M: Marcador de peso 49

molecular (1 Kb).

Figura 3.14 Secuencias obtenidas de los cebadores STM1 y STM3 alineados con la 50
secuencia del gen *STM* de *N. tabacum* (JQ686930.1).

Figura 3.15 Dominio estructural homeodominio conservado en la secuencia putativa 51
de *STM* de *C. chinense*, base de datos NCBI.

Figura 3.16 Inferencia filogenética del gen *STM* mediante el método de Máxima 52
Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros.

Figura 3.17 Curva de disociación de los fragmentos putativos de *WUS* (a), *STM*(b), 53
CUC2(c), *NAM*(d), *PIN7*(e) y *PIN1*(f) de *C. chinense*.

Figura 3.18 Cuantificación de los niveles de transcritos de *WUS* en embriones 54
cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense*. Las señales de PCR fueron
normalizadas con β -tubulina. Valores son promedio \pm E.S. (n=4, p<0.05). Letras
diferentes indican diferencias significativas estadísticas. G-C, etapas globular-
corazón; T-C, etapas torpedo-cotiledonar.

Figura 3.19 Cuantificación de los niveles de transcritos de *PIN7* (a) y *PIN1* (b) en 56
embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense*. Las señales de PCR fueron
normalizadas con β -tubulina. Valores son promedio \pm E.S. (n=4, p<0.05). Letras
diferentes indican diferencias significativas estadísticas. G-C, etapas globular-
corazón; T-C, etapas torpedo-cotiledonar.

Figura 3.20 Cuantificación de los niveles de transcritos de *CUC2* (a), *NAM* (b) y *STM* 57
(c) en embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense*. Las señales de PCR
fueron normalizadas con β -tubulina. Valores son promedio \pm E.S. (n=4, p<0.05).
Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticas. G-C, etapas globular-
corazón; T-C, etapas torpedo-cotiledonar.

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Estados de México con mayor producción (Toneladas) de chile habanero en los últimos seis años registrados en el SIAP (SIAP, 2015).	4
Cuadro 2.1 Cebadores utilizados para <i>STM</i> , <i>CUC2</i> , y <i>NAM</i> .	28
Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para <i>WUS</i> , <i>PIN7</i> y <i>PIN1</i> .	28
Cuadro 2.3 Taxones utilizados como grupos externos e internos en el análisis filogenético, obtenidos del NCBI y del Sol Genomics Network*.	30
Cuadro 3.1 Cuantificación y rango de absorbancia 260/280 de las muestras de ARN de embriones somáticos (ES), cigóticos (EC) y meristemo caulinar (MC) de <i>C. chinense</i> .	34
Cuadro 3.2 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de <i>WUS</i> de <i>C. chinense</i> de la base de datos NCBI.	37
Cuadro 3.3 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de <i>WUS</i> de <i>C. chinense</i> en la base de datos de Sol Genomics Network.	37
Cuadro 3.4 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de <i>PIN7</i> de <i>C. chinense</i> de la base de datos NCBI.	40
Cuadro 3.5 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de <i>PIN7</i> de <i>C. chinense</i> en la base de datos de Sol Genomics Network.	40
Cuadro 3.6 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de <i>PIN1</i> de <i>C. chinense</i> de la base de datos NCBI.	42
Cuadro 3.7 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de <i>PIN1</i> de <i>C. chinense</i> en la base de datos de Sol Genomics Network.	43
Cuadro 3.8 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia	45

LISTADO DE CUADROS

putativa de *CUC2* de *C. chinense* en la base de datos del NCBI.

Cuadro 3.9 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *CUC2* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network. 45

Cuadro 3.10 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *NAM* de *C. chinense* en la base de datos del NCBI. 47

Cuadro 3.11 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *NAM* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network. 48

Cuadro 3.12 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *STM* de *C. chinense*, de los cebadores STM1, BLASTX (Altschul *et al.*, 1997), en la base de datos del NCBI. 51

Cuadro 3.13 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *STM* de *C. chinense*, de los cebadores STM1, BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos de Sol Genomics Network. 51

ABREVIATURAS

18S	Gen 18S ribosomal
2,4D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AG ₃	Ácido giberélico
ARN	Ácido ribonucleico
dNTPs	Nucleótidos trifosfatados
EC	Embrión cigótico
ES	Embrión somático
MC	Meristemo caulinar
MS	Murashige y Skoog
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
qRT-PCR	PCR cuantitativa con transcriptasa reversa/ PCR en tiempo real

RESUMEN

Los embriones somáticos (ES) de *Capsicum chinense* Jacq., presentan una persistente deformación del meristemo caulinar (MC) que los incapacita para formar órganos y posteriormente plantas. El MC es formado en el apice, entre los cotiledones en de las plantas dicotiledóneas. Una vez formado, el MC juega un papel central en la formación de órganos postembriogénicos. Conociendo el papel de los genes *WUSCHEL* (*WUS*), *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), los genes de la familia *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*)/*NO APICAL MERISTEM* (*NAM*) y de la familia *PIN-FORMED* (*PIN*), en la formación y mantenimiento del MC, así como en los límites de los primordios de los cotiledones, se propuso en el presente estudio, analizar el patrón de expresión de *WUS*, *CUC2*, *NAM*, *STM*, *PIN1* y *PIN7*, a fin de conocer la posible implicación de estos genes en las malformaciones del MC de los ESs de *C. chinense*. Los resultados de los patrones de expresión de *STM* y de *PIN1* en los ES fueron completamente opuestos a lo detectado en embriones cigóticos (EC). Por otra parte, *NAM* y *PIN7* mostraron una sobreacumulación de transcritos en ESs, comparados con el patrón de expresión de estos genes en ECs. Estas alteraciones en el patrón de expresión pudieran obedecer a una deficiente regulación de las funciones de estos genes, que estén provocando, alteraciones irreversibles en el patrón de desarrollo del MC. Este constituye el primer reporte sobre alteraciones en el patrón de expresión de genes claves en el desarrollo del ES y su posible implicación en la persistente deformación del MC en el género *Capsicum*.

ABSTRACT

The somatic embryos (ESs) of *Capsicum chinense* Jacq. present a persistent deformation of the apical meristem (MC) that incapacitates them to form organs and later plants. The MC is formed in the apex between the cotyledons in the dicotyledonous plants. Once formed, MC plays a central role in the formation of postembryonic organs. Knowing the role of the genes *WUSCHEL* (*WUS*), *SHOOT MERISTEMLESS* (*STM*), the genes of the family *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC*)/*NO APICAL MERISTEM* (*NAM*) and *PIN-FORMED* (*PIN*) family, in the formation and maintenance of the MC as well as in the limits of the cotyledon primordia, we set out to analyze the expression pattern of *WUS*, *CUC2*, *NAM*, *STM*, *PIN1* y *PIN7*. In order to have a diagnosis that allows us to elucidate the possible implication of these genes in the malformations of the MC. The results show that the expression patterns of *STM* and *PIN1* in ES were completely opposite to the respective expression patterns of both genes, obtained in zygotic embryos (EC). On the other hand, *NAM* and *PIN7* showed an overaccumulation of transcripts in ESs, compared to the expression pattern of these genes in ECs. These alterations in the expression pattern could obey to a poor regulation of the functions of these genes, consequently causing, irreversible alterations in the pattern of development of MC. This is the first report on alterations in the pattern of expression of key genes in the development of ES and its possible implication in the persistent deformation of MC in *Capsicum* genus.

INTRODUCCIÓN

Capsicum chinense Jacq. (chile habanero) es una especie de gran importancia para la industria alimentaria, cosmética y de defensa personal, por su alto grado de pungencia conferido por su contenido de capsaicinoides (Kim *et al.*, 2014; Kothari *et al.*, 2010; Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Canto-Flick *et al.*, 2008; Oboh *et al.*, 2007; Tun-Dzul, 2001; Pozo *et al.*, 1991). Las variedades de *C. chinense* existentes en México cuentan con mayor concentración de capsaicinoides de entre los países productores de esta especie (Antonious *et al.*, 2009). Siendo la Península de Yucatán el área de mayor producción (SIAP, 2016). Es importante señalar que el estado de Yucatán es considerado el centro de diversificación de *C. chinense* (Tun-Dzul, 2001), el germoplasma de chile habanero de este estado presenta características únicas, como lo son forma, sabor, aroma, color y calidad, por lo que el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual le concedió en el 2010 se le concedió la denominación de origen Chile Habanero de la Península de Yucatán.

Sin embargo, este cultivo presenta problemas en cuanto a la prevalencia de plagas y pérdida de diversidad genética (Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Latounerie-Moreno *et al.*, 2002; Pickersgill, 1997). La mejora biotecnológica de este cultivo brinda una alternativa promisoriosa para lograr avances en la producción y micropropagación de las plantas mejoradas (Kothari *et al.*, 2010). Dentro de estas técnicas biotecnológicas destaca la utilidad de la embriogénesis somática. Esta es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* (Avilés-Viñas, 2007).

Esta técnica, fue aplicada por primera vez en el género *Capsicum* en la especie *C. annum*, en esta se obtuvo respuesta a la inducción de diferentes procesos morfogénicos *in vitro*, con baja reproducibilidad y eficiencia (Steintz *et al.*, 2003; Husain *et al.*, 1999; Binzel *et al.*, 1996; Szasz *et al.*, 1995; Arroyo y Revilla, 1991; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Agrawal y Chandra, 1983;). La mayoría de los estudios en *C. annum* son de organogénesis (Binzel *et al.*, 1996; Fári y Andrásfalvy, 1994; Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Agrawal *et al.*, 1989) y pocos trabajos de embriogénesis somática (Khan *et al.*, 2006; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Lakshmi-Sita, 1993). Para *C. chinense* se han reportado varios trabajos de organogénesis (Raj *et al.*, 2015; Kehie *et al.*, 2013; Kehie *et al.*, 2012; Bello-Bello *et al.*, 2010; Sanatombi

y Sharma, 2008; Santana-Buzzy *et al.*, 2006; Santana-Buzzy *et al.*, 2005). Por otro lado, se han reportado varios trabajos de embriogénesis somática por las diferentes vías de regeneración (directa e indirecta) en *C. chinense*, siendo altamente eficientes y reproducibles (Avilés-Viñas *et al.*, 2013; Avilés-Viñas, 2007; Zapata-Castillo *et al.*, 2007; López-Puc *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha reportado que la embriogénesis somática en el género *Capsicum*, una vez que los embriones somáticos (ESs) se han desarrollado 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 del meristemo caulinar (MC) en la histodiferenciación de los ESs de *C. annuum* como: fusión de embriones, ausencia de cotiledones, solo un cotiledón o cotiledones deformados. Esto ha llevado a reconocer al género *Capsicum* como recalcitrante a la embriogénesis somática (Avilés-Viñas *et al.*, 2013; Steinitz *et al.*, 2003). La falla en el establecimiento de un MC embriogénico funcional es uno de los mayores factores que limitan la aplicación de las prácticas de propagación *in vitro* (Yeung, 2002). Por lo que es necesario entender las diferencias moleculares entre un MC funcional y uno defectuoso para ampliar nuestro conocimiento sobre los meristemos (Elhiti *et al.*, 2013).

Bajo este contexto, es importante realizar estudios que permitan determinar la expresión de aquellos genes íntimamente relacionados con el desarrollo del MC y por ende del embrión. Con el fin de contribuir a la comprensión de las causas subyacentes de esta permanente recalcitrancia, se desarrolló el presente estudio con el propósito de determinar los niveles de transcritos de los genes *WUS*, *PIN1*, *PIN7*, *CUC2*, *NAM* y *STM* tanto en embriones cigóticos como somáticos de *C. chinense* y analizar su posible relación con la incapacidad de los ESs de esta especie para convertirse en plantas *in vitro*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.).

Capsicum chinense (Solanaceae), es una planta anual (hasta 12 meses de vida), de crecimiento semi-indeterminado. Presenta una altura de 75 a 120 cm (en los cultivares comerciales). Su tallo es grueso, erecto y robusto, generalmente tiende a formar tres tallos en la primera ramificación (entre la décima y duodécima hoja), para después continuar bifurcándose. Presenta una raíz pivotante y un sistema radicular bien desarrollado, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, las características del suelo y las prácticas de manejo que se le proporcionen; ésta puede alcanzar longitudes mayores a los 2 m. Sus hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable (hasta 15 cm de longitud y ancho) lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonos de verde dependiendo de la variedad. Pueden ser glabras o pubescentes; el grado de pubescencia depende de la variedad. Presenta flores de color blanco con una corola de 1.5 a 2.5 cm de diámetro, éstas se emiten en cada ramificación y se pueden presentar en racimos hasta de seis flores, dando lugar a un promedio de tres frutos. Cada flor contiene de cinco a siete sépalos y pétalos. Su fruto es una baya poco carnosa, hueca y con tres o cuatro lóbulos. Las semillas son lisas, ovaladas, y pequeñas, de 2.5 a 3.5 mm, con una testa de color café claro a café oscuro. Las semillas se alojan en placentas blancuzcas y secas. Los frutos suelen ser de tamaño y forma variables, con membranas en los lóbulos que generalmente no se prolongan hasta el centro (Eshbaugh, 2012). El color a la maduración puede ser amarillo, rojo, naranja, morado o café, y su sabor siempre es picante, aunque el grado de pungencia depende de la variedad. El sabor picante se debe a la presencia de los capsaicinoides, sustancias muy irritantes en estado puro y cuya mayor concentración se encuentra en la placenta de las semillas. El periodo de germinación varía entre ocho y quince días (Canto-Flick *et al.*, 2008).

1.1 IMPORTANCIA ECONOMICA DE *Capsicum chinense*

El chile habanero se cultiva a lo largo y ancho de América Latina. Sin embargo, México destaca como el productor más grande (González-Estrada *et al.*, 2015). De acuerdo a los datos colectados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la

Península de Yucatán ha el mayor productor en los últimos seis años (Cuadro 1.1), siendo el estado de Yucatán de los mayores productores, cuyo valor de producción en el 2015 fue de \$57'238,170.00 (SIAP, 2016).

Cuadro 1.1 Estados de México con mayor producción (Toneladas) de chile habanero en los últimos seis años registrados en el SIAP (SIAP, 2015).

Estado	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Yucatán	3,446.63	3,403.36	3,040.52	2,574.12	2,172.65	2,670.04
Tabasco	520.00	1,401.21	4,545.75	2,342.12	2,006.80	3,055.46
Campeche	235.65	461.70	577.62	570.38	732.65	734.15
Chiapas	175.00	340.00	144.00	170.00	441.60	382.21
Nuevo León	986.00	240.00	568.80	687.50	1014.00	7.00
Quintana Roo	3,100.55	1,366.77	802.57	1,475.33	1,323.72	1,000.98

La producción del chile habanero en Yucatán se comercializa en el mercado local, regional, nacional e internacional (Biles *et al*, 2015). De esta manera, la producción de *C. chinense* genera un gran número de salarios y valor agregado en su producción primaria en la agricultura del estado de Yucatán.

1.2 EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA

En las plantas con flores, el cigoto es formado por la fusión del óvulo con las dos células espermáticas liberadas por el tubo polínico (Lau *et al.*, 2012). El nuevo cigoto formado sufre una serie de reorganizaciones celulares antes de dividirse asimétricamente, la vacuola central heredada del óvulo se fragmenta, seguido de una elongación rápida de aproximadamente tres veces la longitud del óvulo y finalmente, una vacuola larga es reensamblada en la base mientras el núcleo migra al ápice (Jeong *et al.*, 2012). El cigoto se divide transversalmente de manera asimétrica para dar origen a dos células hijas. La célula basal de mayor tamaño y vacuolada, forma el suspensor extra embriogénico y algunos componentes del meristemo radical. La célula apical citoplasmática da origen a la mayoría del embrión con excepción de parte del meristemo radical. Inicialmente la célula apical sufre dos divisiones longitudinales que dan origen al embrión de cuatro células (cuadrante).

La división asimétrica del cigoto establece diferentes repertorios para la percepción y transporte de auxinas en el suspensor y proembrión en desarrollo. El primer transportador de auxinas que muestra una distribución polar clara es PIN-FORMED INFLORESCENCE7 (PIN7), localizado en la membrana plasmática apical de las células del suspensor presumiblemente promueve la acumulación de auxinas en la célula apical del pro-embrión (Figura 1.1, Figura 1.2) (Friml *et al.*, 2003). La localización de PIN1 en el proembrion permanece difusa antes de la etapa media globular, cuando la acumulación basal en las células del nivel inferior marcan el establecimiento del transporte de auxinas apical-basal (Friml *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 1999).

Inmediatamente después de la división del cigoto, PIN7 es localizado en el lado apical de la célula basal y sus derivados, probablemente conduciendo el transporte de auxinas a la célula apical. En la etapa de 32 células, PIN7 invierte la polaridad a membranas basales de las células del suspensor, probablemente resultando en el transporte de auxinas hacia las células del suspensor. Por otra parte, PIN1 es expresado en todos los límites de las células del embrión desde la etapa de 1 célula a la de 16 células. Al llegar a la etapa de 32 células PIN1 es restringido a los límites basales de las células subepidermales. Desde la etapa tardía en adelante, PIN1 se localiza en los primordios de los cotiledones (Friml *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 1999). La percepción máxima de auxinas en el embrión puede ser visualizado por el uso de un constructo DR5 que consiste un promotor sintético AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF)/ responsivo a auxinas fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) (Jenik *et al.*, 2007).

La primera división transversal del embrión produce al embrión de ocho células (octante). La capa superior de células son las precursoras del tallo, incluyendo al MC, mientras que la capa inferior da origen al hipocótilo y a la raíz embriogénica. El embrión de ocho células sufre una serie de divisiones periclinales (paralela a la superficie del embrión) formando la protodermis, separando esta última de las células internas. Posteriormente, las células elongadas de la mitad inferior indican el inicio del desarrollo vascular, y se establece la etapa globular del embrión. En la etapa globular, divisiones periclinales en los costados resulta en el brote de los primordios de los cotiledones. Después, son visibles las tres capas de células del MC entre los cotiledones crecientes en la etapa de corazón. Por otro lado, la célula basal experimenta una serie de divisiones transversales para producir la

hipófisis y el suspensor. La hipófisis es el derivado superior de la célula basal, este sirve como precursor del centro quiescente del meristemo radical y de las células centrales de la cofia (Boscá *et al.*, 2011; Harada y Kwong, 2002).

En la etapa corazón temprana, PIN1 se redistribuye para dirigir el flujo de auxinas hacia los primordios de cotiledones incipientes (Figura 1.1). En este momento, las células madre emergen restringidas al área donde las auxinas son bajas, marcado por la expresión de *CLV3* inducido por *WUS*. En las mutantes *pin7* y *pin1*, defectos en el establecimiento de los polos apical y basal del embrión se presentan en estos sitios de respuesta a auxinas por la alteración del gradiente de auxinas. En consecuencia, Su y Zhang (2009) sugirieron que el establecimiento de gradiente de auxinas regulado por PIN debe ser importante para la embriogénesis cigótica.

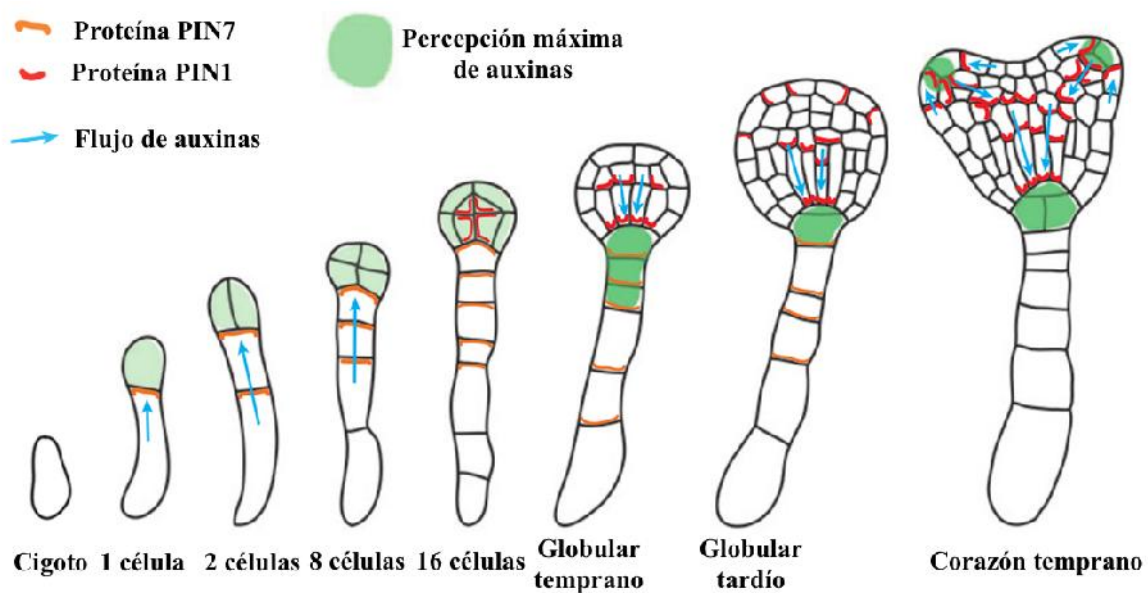


Figura 1.1 Localización de las proteínas PIN7 (naranja) y PIN1 (rojo); flujo de auxinas en el embrión (flechas azules); percepción máxima de auxinas (verde) (Modificado de Jenik et al., 2007).

La mayoría de las divisiones celulares y los eventos asociados con el tejido embriogénico y formación de órganos son completados en la etapa de torpeda. En esta etapa esencialmente se detiene el desarrollo morfológico del embrión. Durante la etapa de maduración tardía de la embriogénesis, ocurren eventos asociados con la preparación del embrión y de la semilla a los procesos de: desecación, quiescencia (inactividad) metabólica y germinación. Las reservas macromoleculares se acumulan primero,

incluyendo proteínas y lípidos de almacenamiento y carbohidratos. Estas reservas se acumulan en organelos de almacenamiento dentro del embrión y/o endospermo. La expansión celular que sufre el embrión durante la maduración ocurre en gran manera como resultado de la acumulación de reservas. Posteriormente, el embrión adquiere gradualmente la capacidad de soportar el estrés de la desecación impuesto por la pérdida de agua al final de la etapa de maduración. Se han identificado algunas clases de carbohidratos y proteínas implicadas en este proceso. Por último la germinación parece ser suprimida activamente durante la etapa de maduración, mediada inicialmente por el ácido abscísico y posteriormente por la toma de agua restringida. El inicio de las señales de desecación indica el final de la embriogénesis e induce un periodo de inactividad metabólica (Harada y Kwong, 2002).

1.2.1 FORMACIÓN DEL SUSPENSOR Y ELONGACIÓN DEL CIGOTO

En plantas mutantes de la MAPKK cinasa *YODA* (*YDA*) o su MAP cinasa *MPK3/MPK6* (que se encuentra corriente abajo), el cigoto falla en elongar y subsecuentemente en dividirse simétricamente, produciendo una célula apical de tamaño normal y una célula basal anormalmente pequeña. Aunque no se ha identificado el blanco directo de la cascada de fosforilación de *YDA* se conoce que el factor de transcripción tipo RWP-PK GROUNDED(*GRD*)/*RKD4* es un efector indirecto y crucial de la señalización de *YDA*. Las mutantes de *grd* se asemejan a *yda* y *mpk3/mpk6*. Ya que todas estas mutantes fallan en generar apropiadamente el suspensor. La señalización de *YDA* también tiene un papel importante en especificar el destino del suspensor. *YDA* es activada por una cinasa citoplasmática tipo receptor SHORT SUSPENSOR (*SSP*), cuyo ARNm es transmitido por la célula espermática para ser traducida en el cigoto. Por lo tanto la activación de la señalización de MAPK *YDA*, provocada por un componente provisto paternalmente, conecta al evento de fertilización con el de elongación del cigoto y la iniciación de la embriogénesis (Ueda y Laux, 2012).

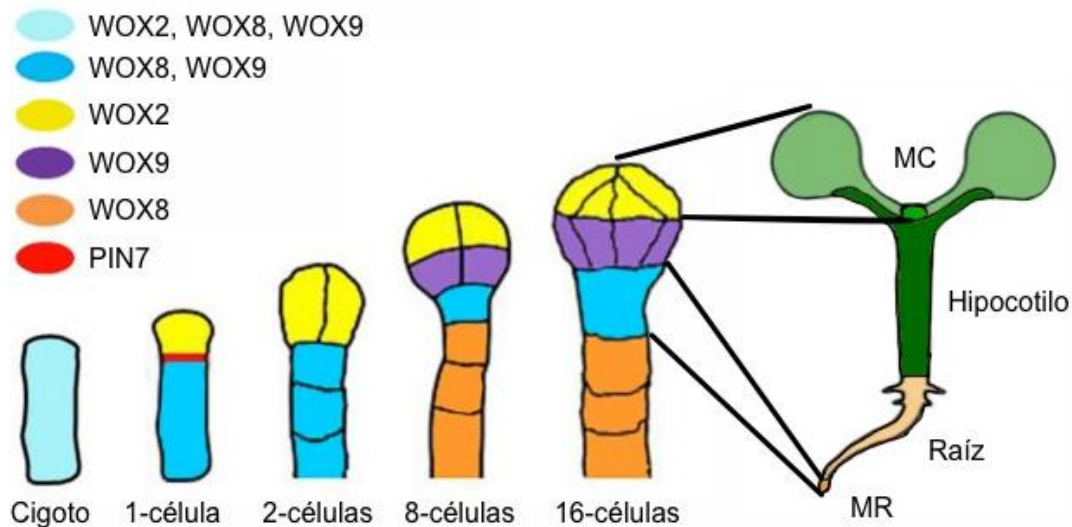


Figura 1.2 Desarrollo del linaje apical basal. MC=meristemo caulinar, MR= meristemo radical (Bósca *et al.*, 2011).

1.3. MERISTEMO CAULINAR

El MC se define como un grupo de células indiferenciadas que continuamente producen órganos y tallos en un patrón regular (Takada y Tasaka, 2002). En *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynhold, el MC embriogénico es inicialmente reconocido como un pequeño cúmulo de células entre los dos primordios cotiledonares, en la etapa de cotiledón. El cuerpo del embrión, es establecido a lo largo de los ejes apical-basal y radial durante la fase de embriogénesis temprana. El proceso de modelado a lo largo del eje apical-basal, ubica al MC en la parte superior apical del embrión, mientras que a lo largo del eje radial se localiza en el centro de éste (Takeda y Aida, 2011). El MC tiene dos funciones primordiales para la morfogénesis de las plantas, en primer lugar mantiene pluripotentes las células madre en su centro apical, y por último provee de células que dan origen a los órganos diferenciados en las regiones circundantes (Takeda y Aida, 2011). El MC está organizado en capas celulares interpuestas y en dominios (Figura 1.3). En *Arabidopsis* ésta consiste de tres capas de células, L1 - L3, las cuales permanecen clonalmente distintas una de la otra debido a sus patrones de división celular específicos. Las capas simples de células L1 y L2 comprenden la túnica y se dividen anticlinalmente, es decir perpendicularmente al plano del meristemo. Estas capas de células generan los siguientes tejidos: la epidermis y subépidermis, capa uno y dos respectivamente (Figura

1.3), de los brotes, hojas y flores. La capa tres está compuesta por varias capas de células formando el corpus, el cual al dividirse en todos los planos generan los tejidos internos (Tucker y Laux, 2007). Los distintos dominios funcionales del MC son: zona central, la cual está localizada en la cima del MC y contiene la población de células madre. Esta región actúa como un reservorio de células madre. La división de las células madre repone la zona central y desplaza a las células hijas hacia el exterior dentro de la zona periférica circundante, donde las células se están dividiendo rápidamente y nuevos órganos se están desarrollando, de la misma manera se desplazan hacia abajo dentro de la zona medular, la cual provee de células a los tejidos internos del tallo y órganos laterales. En la parte superior de la zona medular está posicionado un pequeño grupo de células llamado centro organizador (CO), el cual actúa como un nicho que sustenta al reservorio de células madre superpuestas. A pesar de que no se han observado límites claros entre los tres dominios, los estudios de expresión revelan que las células en cada zona tienen diferentes patrones de expresión de genes y por lo tanto características funcionales y moleculares distintas (Ha *et al.*, 2010).

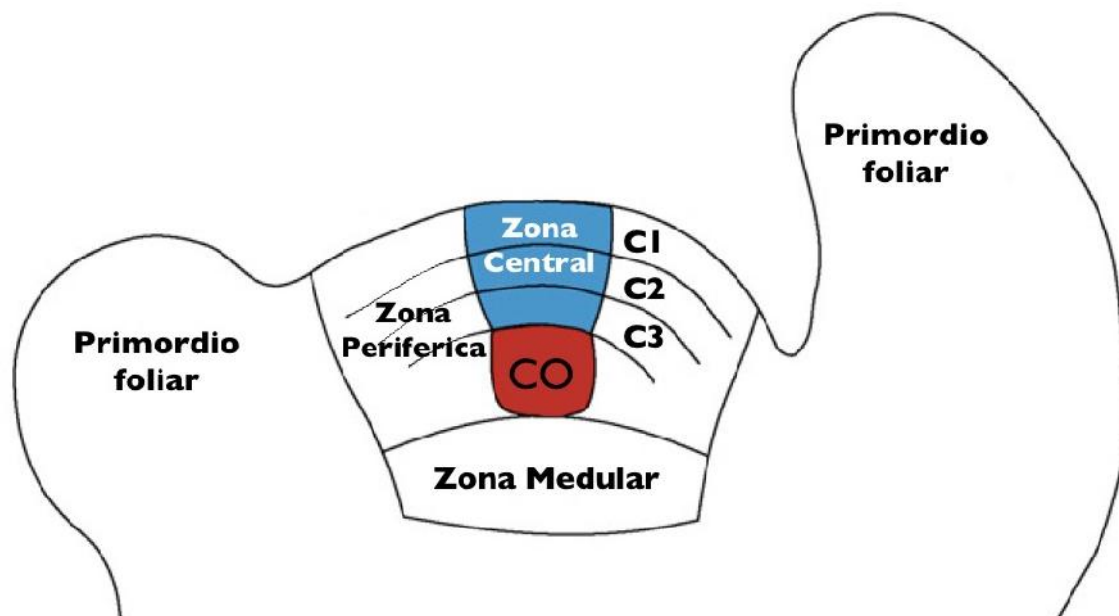


Figura 1.3 Organización del meristemo caulinar de *Arabidopsis* (Modificado de Tucker y Laux, 2007). C1, C2, C3= Capa 1, 2 y 3; CO= Centro Organizador.

1.3.1 GENES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO Y MANTENIMIENTO DEL MERISTEMO CAULINAR

Uno de los primeros genes expresados en las células subepidermales de la zona apical, en la etapa de 16 células de la embriogénesis, es *WUSCHEL* (*WUS*) (Figura 1.2). El patrón de expresión de *WUS* gradualmente se va limitando a regiones más profundas del MC a medida que se forma, dando origen al CO (Mayer *et al.*, 1998). La proteína *WUS* es miembro prototipo de la familia homeobox relacionada a *WUS* (*WOX*), uno de los miembros de la familia de factores de transcripción homeobox de plantas (Figura 1.2). Además del homeodominio (HD), *WUS* contiene la caja *WUS* (WD), y el dominio tipo EAR, el cual está involucrado en la represión transcripcional (Figura 1.4) (Kieffer *et al.*, 2006). Se ha observado en plantas de *Arabidopsis* mutantes para el gen *WUS*, fallas en la organización apropiada del meristemo caulinar en el embrión. El meristemo caulinar defectuoso postembriogénico desarrolla prematuramente estructuras planas aberrantes (Laux *et al.*, 1996).



Figura 1.4 Dominios conservados en *WUS*. HD: homeodominio; WD: caja *WUS*; EAR: Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression.

Solís-Ramos *et al.* (2009), realizaron la transformación genética de *Capsicum chinense* sobreexpresando el gen heterólogo *WUS* de *Arabidopsis*. Después de 15 días de inducción, los segmentos de tallos transformados comenzaron a formar estructuras globulares, mientras que el control tipo silvestre no. Estos resultados sugirieron que *WUS* heterólogo fue activado e involucrado en el proceso de embriogénesis. Los explantes transformados inducidos mostraron la expresión de *WUS* en un Northern reverso, mientras que el control tipo silvestre no. El análisis histológico de los tallos transformados inducidos, mostraron el desarrollo de nódulos meristemáticos y la formación de embriones somáticos globulares, que no continuaron su desarrollo en otras etapas de embrionarias o en planta. Los resultados mostraron que la sobreexpresión del gen *WUS* en tallos de *C. chinense*, promueve la formación de estructuras embriogénicas pero se estancan en su crecimiento, sugiriendo que otras señales pueden ser necesarias para la inducción del desarrollo adecuado del embrión en esta especie.

En *Capsicum chinense* también se han analizado los perfiles de expresión de genes de la familia WOX: *WUS*, *WOX1* y *WOX3* y se encontró que los niveles de transcritos difirieron significativamente entre EC y ES. Se observó que los EC presentaron los mayores niveles de transcritos, pero al añadirle espermina se produjo un incremento de los niveles de transcritos en los ES. Al parecer de manera particular el gen *WOX1* llegó a presentar patrones similares al del EC (Valle-Gough, 2015).

Otro gen importante expresado en la etapa globular es *CUP-SHAPED COTYLEDON* (*CUC1*) el cual es detectado en pocas células que formaran el MC embriogénico, sugiriendo que *CUC1* funciona dentro de estas células y regula la formación del MC (Know *et al.*, 2006).

En la etapa globular tardía se expresa por primera vez *STM* al igual que *CUC2* y *ANTIGUMENTA* (*ANT*). En esta etapa de transición, los patrones de expresión de estos genes dividen la porción apical del embrión en diferentes regiones: la región central destinada para dar origen al MC (*STM*, *CUC1* y *CUC2*), la región periférica, que producirá los cotiledones (*ANT*) y regiones donde el crecimiento será suprimido formando los límites entre los cotiledones (*STM*, *CUC1*, *CUC2* y *ANT*; Bowman y Eshed, 2000). Las plántulas mutantes de *STM* presentan la fusión de cotiledones y carecen del MC (Barton y Poethig, 1993). Este gen pertenece a la subfamilia tipo homeobox Knotted1 clase 1 (*KNOX*), cuyos genes codifican un homeodominio de regulación transcripcional expresado en células no organogénicas del MC, pero no en las células iniciadoras de órganos (Scofield *et al.*, 2007). Las proteínas *KNOX* están comprendidas por una serie de dominios conservados. El homeodominio de las proteínas *KNOX*, como el que se presenta en arroz (*OSH15*), está localizado en la porción C-terminal de la proteína y está involucrado en la unión con el ADN. De manera contigua al homeodominio hacia el extremo N-terminal, se encuentra el dominio *ELK* cuya función no es clara, sin embargo, se ha propuesto que contiene una señal de localización nuclear y puede estar involucrado en la represión transcripcional (Figura 1.5). En la misma dirección N-terminal el siguiente dominio es *GSE*, el cual ha sido implicado en la regulación de la estabilidad de proteínas, dado que está enriquecido por residuos de prolina, ácido glutámico, serina, y treonina, los cuales se piensa promueven la degradación de proteínas vía proteólisis mediada por ubiquitinación. El dominio *MEINOX* está comprendido de dos subdominios *KNOX1* y *KNOX2*. Éste se

encuentra en la mitad N-terminal de la proteína. El subdominio KNOX1 es importante para la generación de fenotipos alterados, causados por la expresión ectópica del gen KNOX, y puede tener un efecto represivo en la transcripción de los genes objetivo. KNOX2 es primordial para la formación y transactivación de dímeros, así como para la generación de fenotipos anormales en transgénicos (Scofield y Murray, 2006).

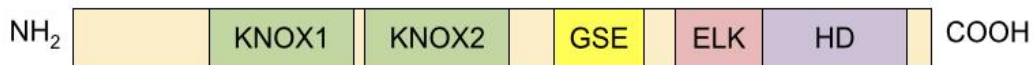


Figura 1.5 Dominios conservados en STM.

Los genes *CUC1* y *CUC2* resultan de igual forma importantes para el establecimiento de un MC embriogénico funcional. Se ha constatado que las doble mutantes *cuc1* y *cuc2* forman cotiledones fusionados y no desarrollan el MC. En las plantas doble mutantes *cuc1* y *cuc2* los transcritos de *STM* no son detectados mientras que *CUC1* y *CUC2* son expresados en embriones mutantes *stm*, por tanto *CUC1* y *CUC2* funcionan río arriba de *STM* y son requeridos para su expresión (Kwon *et al.*, 2006; Aida *et al.*, 1999, 2002; Takada *et al.*, 2002). Los genes *CUC1* y *CUC2* son altamente homólogos al gen *NAM* que también es requerido para la separación de cotiledones y la formación del MC embriogénico. Este gen ha sido estudiado en dos solanáceas, *Petunia x hybrida* y *Solanum lycopersicum*. Las mutantes *nam* se caracterizan por poseer cotiledones fusionados, carecer de MC por lo que mueren en la etapa de plántula (Souer *et al.*, 1996). La mitad N-terminal de los genes de la familia *CUC/NAM* contienen una secuencia altamente conservada llamada dominio NAC (Figura 1.6). *CUC1* y *CUC2* son genes funcionalmente redundantes. Al parecer éstos mantienen una población de células indiferenciadas durante la formación del MC y presentan casi idénticos patrones de expresión en embriones (Sharma y Fletcher, 2012; Cheng *et al.*, 2012; Aida *et al.*, 1997).

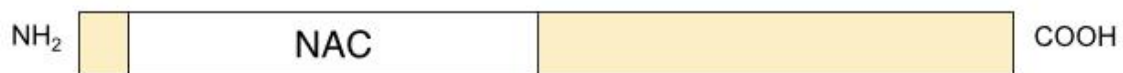


Figura 1.6 Dominio NAC en la familia de genes CUC y NAM.

Durante la etapa de corazón, la expresión de *CUC2* se encuentra restringida a las regiones limítrofes entre los cotiledones y el MC. Esta restricción depende de la actividad de *STM*. Aunque *CUC2* y *STM* tienen patrones de expresión complementarios en el MC maduro, son expresados en dominios superpuestos durante la embriogénesis. Esto implica, que otros factores están implicados en el establecimiento de los patrones de expresión complementarios de estos genes. Al respecto se ha indicado que *CUC2*, que actúa de forma redundante con *CUC1*, tiene un papel importante en la separación de órganos del meristemo (Bowman y Eshed, 2000).

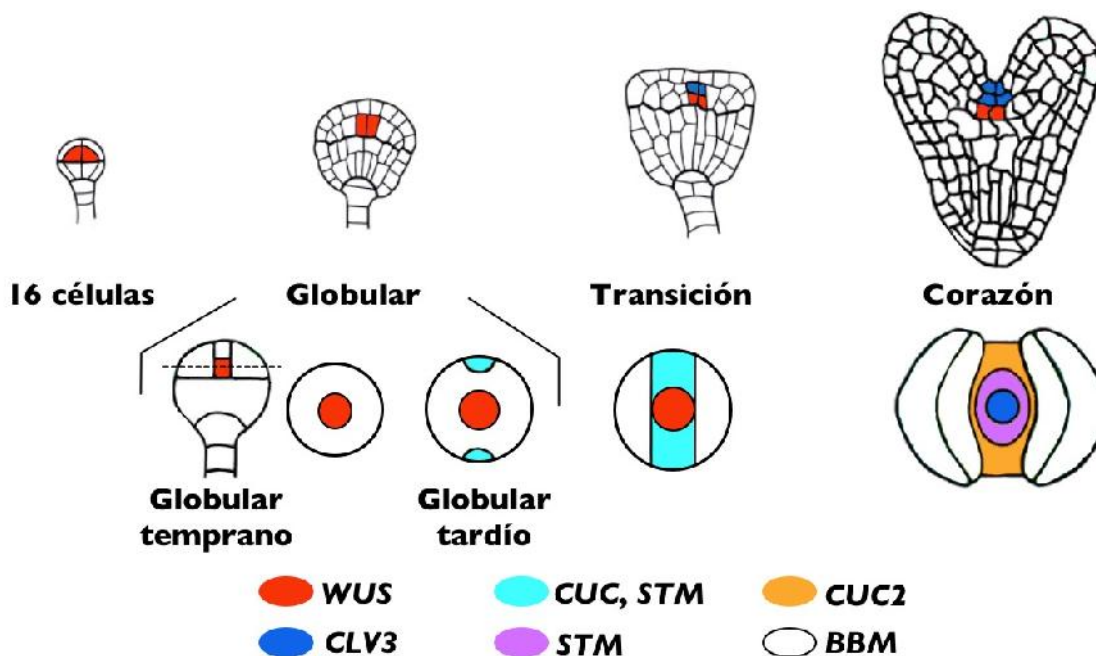


Figura 1.7 Desarrollo del dominio apical en el embrión (Modificado de Laux *et al.*, 2004)

Además de estos genes reguladores, las hormonas vegetales tales como las citocininas y giberelinas juegan un papel importante en la actividad del MC. Las citocininas son requeridas para el mantenimiento de las células del MC en un estado indiferenciado, mientras que las giberelinas promueven la diferenciación. En el dominio de expresión de *STM*, por un lado, esta proteína que induce la biosíntesis de citocininas por medio de la inducción de la ISOPENTENYL TRANSFERASA, una enzima clave en la biosíntesis de citocininas (Jasinki *et al.*, 2005; Yanai *et al.*, 2005), y por otro lado reprime la biosíntesis de giberelinas por medio de la reducción de los niveles de la enzima biosintética GA20 oxidasa e incrementa los niveles de la enzima catabólica GA2-oxidasa1 (Hay *et al.*, 2002).

Sucesivamente el aumento de los niveles de citocininas aumenta la expresión de *STM* (Rupp *et al.*, 1999; Kurakawa *et al.*, 2007). Además *WUS* reprime a la familia *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (ARR) tipo A, que está involucrada en un ciclo de regulación negativa durante la respuesta de citocininas. Esto resulta en una proporción alta de citocininas/auxinas y una baja cantidad de giberelinas, lo que conduce a un crecimiento indeterminado en estos tejidos (Spinelli *et al.*, 2011; Shani *et al.*, 2006).

En etapa temprana de corazón (Figura 1.7), después de que los primordios cotiledonares se han formado, son activados en la zona central del MC los genes, *CLAVATA1* (*CLV1*) que codifica un receptor tipo cinasa rico en repeticiones de leucina (LRR), y *CLV3*, que codifica un péptido de señalización. En esta región opera un asa de señalización en el mantenimiento de la población de células madre en la cima del meristemo. Este mantenimiento es dirigido por el CO (Figura 1.3), donde es expresado el factor transcripcional *WUS* que promueve la identidad de las células madre en las células superpuestas, que también son inducidas por *WUS* a expresar *CLAVATA3* (*CLV3*), el cual vía interacción con *CLV1*, retroalimenta para inhibir la expresión de *WUS* y mantener el reservorio de células madre en un tamaño constante (Schoof *et al.*, 2000). Las plantas mutantes *clv3* desarrollan un ápice engrandecido, debido a que la expresión de *WUS* no es regulada (Brand *et al.*, 2000). Por otra parte mientras el desarrollo del embrión continua, la expresión de *CLV1* y *CLV3* se restringe a las regiones interiores y superficiales del MC respectivamente (Liu *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2010; Miwa *et al.*, 2009). Un estudio reciente ha mostrado que la proteína *WUS* sintetizada en el CO migra a las células adyacentes y activa la transcripción de *CLV3* mediante la unión a su promotor (Yadav *et al.*, 2011). Este estudio también reveló que el gradiente de proteína *WUS* se extiende a la zona periférica donde los progenitores de células madre se diferencian.

1.4. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El cultivo de tejidos vegetales es la técnica de cultivar células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre en un medio artificial (George, 2008). Una de las mayores ventajas del cultivo de tejidos, es la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de pequeños fragmentos de tejidos. Esto se aplica en campos como la propagación masiva de plantas de alto valor y un paso obligado para técnicas más sofisticadas como la transformación genética. Existen tres vías para la regeneración de plantas *in vitro*:

proliferación de yemas, organogénesis y embriogénesis somática. La primera vía consiste en la formación de plantas individuales o brotes múltiples a partir de yemas axilares y apicales, las cuales contienen los meristemos ya formados (estructuras multicelulares), mientras que la organogénesis y embriogénesis somática pueden ser inducidas de cualquier parte de la planta, preferiblemente a partir de tejidos meristemáticos (Zapata-Castillo *et al.*, 2007).

La embriogénesis somática es la vía de desarrollo por la cual células somáticas se convierten en estructuras que asemejan embriones cigóticos (EC) (estructuras bipolares sin conexión vascular con el tejido parental), a través de una serie ordenada de etapas embriológicas características sin la fusión de gametos (Jiménez, 2005).

Los embriones somáticos (ES) se asemejan morfológicamente a los EC, son bipolares y tienen órganos embriogénicos típicos: radícula, hipocótilo y cotiledones (Von Arnold *et al.*, 2002). Los ES, como los EC, tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual, por lo que la planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial (Pérez *et al.*, 1999).

La embriogénesis somática no es un proceso que únicamente suceda *in vitro*, ocurre naturalmente en algunas familias entre los óvulos (por ejemplo el género *Paeonia* L.) y menos frecuente en las hojas (por ejemplo *Asplenium* L. y *Kalanchoe* Adans.) (George *et al.*, 2008).

En el cultivo *in vitro* la embriogénesis somática se puede desarrollar indirectamente a través de un tejido calloso o directamente del tejido del explante. Los ES desarrollados vía directa son formados de células competentes del explante, las cuales contrario a la indirecta, son capaces de experimentar embriogénesis sin desdiferenciación, es decir, sin la formación de callo. Se le llama embriogénesis somática secundaria a la formación de embriones adventicios a lo largo del suspensor del propio ES, o embriones madre. La multiplicación a partir de los embriones formados, es la responsable de la alta eficiencia de este sistema de regeneración *in vitro*. Se le conoce además como embriogénesis proliferativa. Solo unas pocas células somáticas son sensibles a los factores de inducción de la embriogénesis, y capaces de sufrir embriogénesis somática recibiendo el nombre de

células competentes, células embriogénicas determinadas o células proembriogénicas (Gaj, 2004). Las condiciones para la inducción de la embriogénesis somática en diferentes especies y cultivares, son usualmente descubiertas por prueba y error por medio del análisis de los efectos de diferentes condiciones de cultivo como son: balance de reguladores de crecimiento, condiciones osmóticas, cambio de pH, concentración de aminoácidos y sales, golpe de calor y tratamiento con varias sustancias químicas. Los principales inductores de la embriogénesis somática son las auxinas. También existen reportes de embriogénesis en respuesta a la presencia de otros reguladores de crecimiento como son las citocininas, e incluso en la ausencia de reguladores (Namasivayam, 2007).

La embriogénesis somática *in vitro* consta de las siguientes etapas (Pérez et al, 1999):

1.-Inducción: es el proceso de conversión de célula somática a célula proembriogénica. Los factores determinantes para que suceda el proceso son: genotipo, grado de diferenciación de las células del explante, auxinas y aislamiento celular.

2.-Histodiferenciación: las células proembriogénicas se diferencian formando ES, mediante división y diferenciación celular simultáneas. Uno de los fenómenos en esta etapa, es el establecimiento de una polaridad en las células proembriogénicas. En esta etapa los ES pasan por una serie de estadios los cuales son: globular, corazón y torpedo.

3.-Maduración: El embrión en estadio de torpedo tiene que sufrir una maduración durante la cual ocurre básicamente una elongación celular, sin división. Algunos de los estímulos que hacen posible la maduración del embrión son el ácido abscísico y la desecación. Al embrión maduro se le conoce como estadio cotiledonario.

4.-Germinación: proceso de elongación y reactivación metabólica de un embrión somático maduro para convertirse en una plántula. Se requieren de estímulos como la luz, ácido giberélico o citocininas (Pérez *et al.*, 1999).

La morfogénesis *in vitro* depende de diferentes factores como son: genotipo, tipo de explante, edad y etapa de desarrollo del explante, estado fisiológico de la planta donadora del explante y el ambiente externo el cual incluye la composición del medio y las condiciones físicas del cultivo (luz, temperatura). La interacción entre estos factores

promueve la inducción y expresión de un modo específico de diferenciación celular y de desarrollo (Gaj, 2004).

Los ES son usados como un sistema modelo en los estudios embriológicos. Sin embargo, su mayor importancia es su aplicación práctica en la propagación vegetativa a gran escala. En la mayoría de los casos los ES pueden ser crioconservados, lo que hace posible establecer bancos genéticos. Los cultivos embriogénicos son también un objeto atractivo para la transformación genética (Von Arnold, 2002).

1.4.1. GENES EXPRESADOS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Durante la embriogénesis somática, las células somáticas son inducidas para formar las células embriogénicas totipotentes, capaces de regenerarse en plantas completas. Este cambio desencadena una serie de cascadas de señalización, resultando en la expresión de genes específicos que provocan la embriogénesis somática. Por lo que se han analizado la expresión de genes durante este proceso, para obtener más información y entender de una mejor manera el proceso. Los estudios de expresión diferencial se han enfocado en los genes expresados específicamente durante la embriogénesis somática de varias especies. Lo que ha dado como resultado varios genes que son activados específicamente o que exhiben una expresión diferencial durante el proceso (Yang y Zhang, 2010). Dentro de estos genes los de mayor importancia son:

Genes *LEAFY COTYLEDON (LEC)*

Estos genes codifican proteínas regulatorias involucradas en la embriogénesis somática, y son esenciales para la inducción del desarrollo de embriones somáticos. El gen *LEC1* codifica una subunidad HAP3 del factor de transcripción de unión a CCAAT. Se han observado los mismos patrones de expresión durante la embriogénesis somática de *Arabidopsis*, maíz (*Zea mays* L.), y zanahoria (*Daucus carota* L.). *LEC1* ha sido propuesto como un regulador clave para la identidad embrionaria, los embriones mutantes de *lec1* tienen una morfología anormal, con tricomas en los cotiledones, además no tienen tolerancia a la desecación. Su expresión ha sido observada en las semillas en desarrollo, y la expresión ectópica induce la formación de estructuras parecidas a embriones. *LEC2* regula muchos aspectos de la embriogénesis somática. Este codifica un factor de

transcripción con un dominio B3, una región de unión al ADN solo encontrada en plantas. Durante las fases tempranas de la embriogénesis somática en la cual el diseño básico del cuerpo del embrión es establecido, las mutaciones en *LEC2* afectan el mantenimiento del destino de la célula embrionaria y la especificación de la identidad del cotiledón. Más tarde en la embriogénesis, en las mutantes *lec2* las puntas de los cotiledones no acumulan reservas de almacenamiento, indicando defectos en la iniciación y/o mantenimiento de la fase de maduración (Lotan *et al.*, 1998; Ikeda *et al.*, 2006; Karami *et al.*, 2009).

BABY BOOM (BBM)

El análisis de expresión de *BABY BOOM (BBM)* en ESs de *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* L., mostró que es expresado desde las etapas tempranas de la embriogénesis (Ouakfaoui *et al.*, 2012; Boutilier *et al.*, 2002). Durante el desarrollo de los embriones cigóticos en *B. napus*, *BBM* se expresa durante las diferentes etapas en todo el embrión mientras que en *Arabidopsis* solo es detectado en el tejido provascular y en las células del centro quiescente en la etapa de corazón (Kulinska-Lukaszek *et al.*, 2012; Galinha *et al.*, 2007; Casson *et al.*, 2005). Irikova *et al.* (2012), detectaron por primera vez en *Capsicum annuum* el factor de transcripción *BBM*. Al comparar las secuencias parciales revelaron una alta similitud entre las secuencias aisladas y aquellas registradas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Al realizar una traducción *in silico*, el BLAST de la proteína *BBM* en la base de datos del NCBI, reveló la presencia de un dominio funcional tipo AP2. Mediante la RT-PCR se detectaron altos niveles de expresión de *BBM* en las etapas tempranas de desarrollo de los embriones provenientes del cultivo de anteras, y en todos los estadios de los embriones somáticos. Al analizar diferentes variedades de *C. annuum* de baja y alta capacidad embriogénica no se pudo relacionar como un marcador para el desarrollo de embriones como lo es para *B. napus*.

WUSCHEL (WUS)

En la embriogénesis somática se ha visto que *WUS* promueve el desarrollo de embriones cuando es expresado ectópicamente en plántulas. La sobreexpresión de *WUS* causa la formación de callo altamente embriogénico en la presencia de auxinas, mientras que

también en otros casos induce directamente la formación de embriones somáticos en diferentes órganos de la planta en la ausencia de auxina exógena. Por lo tanto *WUS* puede reprogramar el destino de la célula sin necesidad de auxinas, o simplemente tomando ventaja de las auxinas endógenas. Sin embargo, en el MC *WUS* no puede reprogramar para formar embriones, ya que está altamente regulado (Yang y Zhang, 2010).

Receptor tipo cinasa *SERK*

Se ha asociado el proceso de embriogénesis somática con receptores transmembranales tipo cinasa. *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)* fue aislado por vez primera en embriones somáticos de zanahoria en etapas muy tempranas de desarrollo (de la etapa de una célula a la globular) y en cigóticos, pero no en otros tejidos de la planta. La sobreexpresión ectópica del gen ortólogo de *Arabidopsis*, aumentó la habilidad para desarrollar embriogénesis somática en suspensiones celulares (Hecht *et al.*, 2001). El análisis de expresión del gen *SERK* de coco (*Cocos nucifera* L.), mostró que éste puede ser detectado en tejidos embriogénicos antes del desarrollo de embriones pero no en tejidos no embriogénicos, indicando que *SERK* juega un papel mediador en la embriogénesis somática (Pérez-Nuñez *et al.*, 2009). Por lo que se sugirió que *SERK* es una familia de genes y están funcionalmente conservados en las plantas, con un papel importante en la embriogénesis somática (Karami *et al.*, 2009).

1.5 REGENERACIÓN IN VITRO DE *Capsicum* spp.

Aunque muchos miembros de la familia Solanaceae fácilmente desarrollan morfogénesis [*Nicotiana tabacum* L. (Kumar *et al.*, 2005)], muchas investigaciones no reportan resultados satisfactorios para el género *Capsicum*, para en el que se han hecho muchos esfuerzos en la regeneración de plantas a partir de diferentes explantes (Ahmad *et al.*, 2006), además de que muchos de los protocolos son específicos para un cultivar y tejido (Venkataiah *et al.*, 2003).

La primera especie en la que se obtuvo respuesta durante la inducción de diferentes procesos morfogénicos *in vitro* utilizando diferentes cultivares, fue *Capsicum annum* (Husain *et al.*, 1999; Binzel *et al.*, 1996; Szasz *et al.*, 1995; Arroyo y Revilla, 1991; Ochoa-

Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Agrawal y Chandra 1983), aunque la reproducibilidad y eficiencia de los procesos siguen siendo bajas (Binzel *et al.*, 1996). La mayoría de los reportes sobre esta especie son de organogénesis, y se han reportado pocos trabajos de embriogénesis somática (Khan *et al.*, 2006; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Sita, 1993).

En el caso de *Capsicum chinense*, se han obtenido mayores tasas de regeneración y mayor reproducibilidad de los procesos de morfogénesis *in vitro*, aunque sigue presentando deficiencias relacionadas al género, como lo son el alto índice de embriones deformados y el bajo índice de conversión (Aviles-Viñas, 2007; López-Puc *et al.*, 2006). López-Puc *et al.* (2006), encontraron que *C. chinense* es capaz de formar ES de manera directa, obteniéndolos de diferentes explantes, contrario a lo encontrado en otras especies del género, siendo los hipocótilos los que dieron mejores resultados. Sin embargo, muchos de los embriones en las etapas de torpedo y cotiledonar mostraron malformaciones, y la germinación y conversión a planta no fue satisfactoria. Zapata-Castillo *et al.* (2007), establecieron un protocolo para la embriogénesis somática indirecta de *C. chinense* en suspensiones celulares, que fue más eficiente pero tuvo los mismos problemas. Recientemente Avilés-Viñas *et al.* (2013), reportaron un protocolo de ES directa de alta eficiencia y alta reproducibilidad en *C. chinense*, el cual se desarrolla en medio líquido partiendo de hipocótilos con un rendimiento de $10,000 \text{ ESs} \cdot \text{L}^{-1}$ de medio. Sin embargo, como en todas las especies del género *Capsicum* en las cuales se ha reportado la embriogénesis somática, una vez que los embriones se han formado, la mayoría de ellos se deforman y no alcanzan los estadios posteriores de desarrollo (torpedo y cotiledonar; Santana-Buzzy *et al.*, 2009). Steinitz *et al.* (2003), clasificaron a las deformaciones más frecuentes en los embriones somáticos de *C. annuum*, como anomalías en la histodiferenciación del meristemo caulinar, las cuales son: fusión de embriones, ausencia de cotiledones y solo un cotiledón o cotiledones deformados.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que se han observado anomalías en la histodiferenciación de *C. chinense* en el proceso de embriogénesis somática, como la ausencia del meristemo caulinar, lo cual es similar a lo reportado para mutantes de *WUS*, *PIN7* y *PIN1*, *CUC2*, *NAM* y *STM*, se evaluó la expresión de estos genes en dos tiempos durante el desarrollo de los embriones somáticos y cigóticos, desde el inicio hasta el desarrollo final del embrión. Esto podría ayudar al entendimiento de la recalcitrancia de esta especie en el proceso de embriogénesis somática.

HIPÓTESIS

Dadas las deformaciones presentes en el meristemo caulinar de los embriones somáticos es de esperar que los patrones de expresión de los genes *WUS*, *PIN7* y *PIN1*, *CUC2*, *NAM* y *STM* difieran de los observados en los embriones cigóticos de *Capsicum chinense* y pudiera contribuir a dilucidar la base molecular de la recalcitrancia de esta especie.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los patrones de expresión de los genes *WUS*, *PIN7* y *PIN1*, *CUC2*, *NAM* y *STM* en embriones somáticos, en relación con la expresión de los mismos en embriones cigóticos de *Capsicum chinense*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar fragmentos de genes *WUS*, *PIN7* y *PIN1*, *CUC2*, *NAM* y *STM* en *Capsicum chinense*.
- Analizar los patrones de expresión de los genes *WUS*, *PIN7* y *PIN1*, *CUC2*, *NAM* y *STM* en diferentes estadios del desarrollo de embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense* por PCR en tiempo real.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

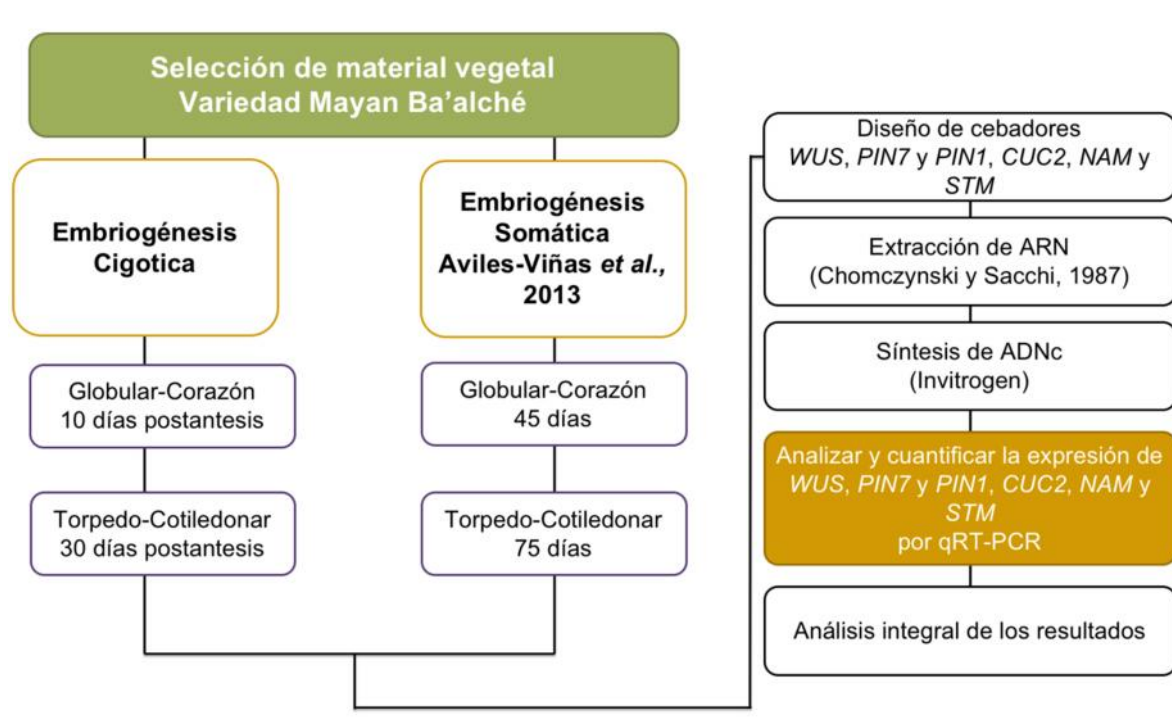


Figura 1.10 Diagrama experimental para el análisis de expresión los genes *WUS*, *PIN7*, *PIN1*, *CUC2*, *NAM*, y *STM* en embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense*

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CONDICIONES GENERALES

Los medios y materiales de cultivo utilizados, se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1.2 Kg·cm⁻² de presión durante 15 minutos. Los medios de cultivo en estado semisólido se colocaron 25 mL en frascos de vidrio de 100 mL, mientras que para el medio líquido se colocaron 50 mL en matraces de 250 mL. El pH de los medios se ajustó antes de la esterilización a 5.8 con NaOH 1N y HCl 1N. Las siembras se realizaron en campana de flujo laminar horizontal.

2.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron semillas de la variedad Mayan Ba'alché (CHL-012-291110), procedente del banco de germoplasma de *C. chinense* Jacq. del Centro de Investigación Científica de Yucatán. El establecimiento y germinación *in vitro* se realizaron según el protocolo de Santana *et al.* (2005). Se esterilizaron las semillas superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% por 5 min y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Después se sumergieron en cloro comercial al 30% durante 15 min y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Para la germinación se colocaron 10 semillas por frasco de alimento infantil con medio semisólido adicionado con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y 1.5 µM de ácido giberélico (AG) con un pH de 5.8. Se incubaron en la oscuridad por 15 días y posteriormente se transfirieron a condiciones de 24 h luz por 15 días a una temperatura de 25 ± 2°C. La temperatura fue de 25 ± 2°C durante todo el proceso. Los embriones cigóticos fueron extraídos de semillas de la misma variedad, provenientes de frutos de 15 (estadios tempranos) y 30 (estadios avanzados) días post-antesis.

2.3 INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La inducción de la embriogénesis somática se realizó según el protocolo descrito por Avilés-Viñas *et al.* (2013). Se tomaron segmentos de hipocótilos de las plántulas de *C. chinense* germinadas *in vitro* y se sembraron en medio con sales MS, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (9.05 μM), sacarosa (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), gelrite (2.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Los explantes se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C, en condiciones de luz continua, a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los hipocótilos de 30 días de inducción, se colocaron en medio líquido con sales MS, 2,4-D (4.5 μM), sacarosa (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se incubaron bajo agitación (100 rpm) en condiciones de luz continua a una temperatura de 25 ± 2 °C y a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los medios se cambiaron 14 días durante un periodo de 42 días. Se tomaron muestras de ES en etapa globular y corazón (45 días de cultivo *in vitro*), ESs en etapa torpedo y cotiledonar (75 días de cultivo *in vitro*). Las muestras de ESs se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a una temperatura de -80 °C.

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

La extracción de ARN total se realizó tomando 1 g de tejido y agregando 5 ml del reactivo TRIzol siguiendo la metodología de Chomczynski y Sacchi (1987). A las muestras se les eliminó el ADN mediante los reactivos ADN-Free siguiendo las instrucciones del fabricante (Ambion). La integridad del ARN se verificó en geles de agarosa al 1.4% con buffer TAE 1X a 80 V y luego teñidos con bromuro de etidio (60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las muestras se cuantificaron en un NanoDrop™ de la marca Thermo Scientific y se almacenaron a -20°C.

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

La amplificación del ADNc de las muestras se verificó mediante la separación de fragmentos en cámaras de electroforesis horizontal con geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio con buffer TBE 1X a 90 V, visualizados en un fotodocumentador y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.5 DISEÑO DE CEBADORES.

Los cebadores de *NAM* (NM_001247325.2) y *CUC2* (XM_004230347.2) fueron diseñados de secuencias homologas de *Solanum lycopersicum*, mientras que los de *STM* (JQ686930.1) lo fueron de *Nicotiana tabacum*, disponibles en las base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se utilizó la secuencia codificante del gen para hacer un BLAST de nucleótidos del marco de lectura abierto en la base de datos de *Solanum lycopersicum* Project y The Pepper Genome Database. Se utilizaron las secuencias con el mayor grado de identidad y el valor E más bajo. Se diseñaron los cebadores con ayuda del programa Primer3plus (Ubtergasser *et al.*, 2007) utilizando los parámetros recomendados para PCR cuantitativa (qRT-PCR), longitud 20-25 pb, contenido de GC del 50% y amplicones de 90-200 pb. Todos los cebadores fueron analizados en OligoAnalyser (IDT Technologies) para confirmar que no formaran heterodímeros (Cuadro 2.1). Los cebadores que se utilizaron para *WUS* fueron los diseñados por Aviles-Viñas (2012), y por ultimo para *PIN7* y *PIN1* se utilizaron los cebadores reportados por Osorio-Montalvo (2015) en *C. chinense* (Cuadro 2.2).

Para PCR en punto final cada tubo de reacción contuvo los siguientes componentes a un volumen final de 10µL: 1X PCR Buffer, 1.5 mM de Cloruro de Magnesio (MgCl₂), 20 µM de dNTPs, 1.5 µM de cada cebador, 0.3 µL Taq polimerasa (Invitrogen) y 1,200 ng ADNc. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes un ciclo de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos 15 s a 94°C, 30s a T_m del cebador, 30 seg a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C.

Los fragmentos obtenidos se separaron en cámaras de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (1 µg·mL⁻¹).

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1 Cebadores utilizados para *STM*, *CUC2*, y *NAM*.

Gen	Cebador directo 5'-3'	Cebador reverso 5'-3'	T _m °C	pb
STM 1	GGGAAGCCTTAAGCAGGAGT	TCCATTGGGAAATGGTTAGC	63.5	297
STM 2	GGGAAGCCTTAAGCAGGAGT	ATTCCGATGGATATGGCCAT	64.0	130
STM 3	ACAATGGGCCGTAGCAGTAG	ATGGCTTCCTTGAAGGGTTT	63.7	137
CUC2 1	CCACAACATGAGACTGAACGC	AGAAGTGATCGTGGGAGAGATG	65.3	104
CUC2 2	AGTCTCTCCGTTATTCGTAGGAC	TGATGTTGATGGTGGTGGTG	63.4	120
CUC2 3	ACTAGCACTGATCACCACCAC	CGCGATGTTAGTGTAGGAATTTG	62.8	96
CUC2 4	AAAAGAGCTGGAGTGGAAAGACC	TTGCTGTTTCTTGATGGAAGTTG	65.3	108
CUC2 5	TTCCATCAAGAAACAGCAACAAG	TTGATGGTGGTGGTGGTGATC	66.9	140
NAM 1	TTCACGAGAACCTCCAGCTTC	TGCTCCACTTTCTGAGTCTCTG	64.3	120
NAM 2	TCCAGCTTCCGTTGTTCTCC	TCAGACTGCTCCACTTTCTGAG	65.3	116
NAM 3	GTTTCTCCACAACCTGCTACTGC	AAGCGAAACTTGGAGTTGGC	64.3	112
NAM 4	TCGATTCCTCTCCGTATAGCAC	AGCAGTTGTGGAGAAACAGG	63.4	106

Cuadro 2.2 Cebadores utilizados para *WUS*, *PIN7* y *PIN1*.

Gen	Cebador directo 5'-3'	Cebador reverso 5'-3'	T _m °C	pb
<i>WUS</i>	AGGTCTCCAACCTGCTGAACA	CACGAGCTTTATGGTTCTGAAA	60	110
<i>PIN7</i>	ACCTGCACCTACTAATGCTG	GTCCAATGCCAAGCTCATTACC	60	194
<i>PIN1</i>	TTTACTCAATGGTTGCTGGTG	TGATTTCCCACTTTCTCCTC	60	126
- <i>Tub</i>	GAGGGTGAGTGAGCAGTTC	CTTCATCGTCATCTGCTGTC	55	167

2.6 REAMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS Y SECUENCIACIÓN.

Los fragmentos de tamaño esperado obtenidos para los genes se reamplificaron utilizando las condiciones previamente mencionadas ajustando las concentraciones de cada componente a un volumen final de 50 µL con un total de 20 µL de producto de PCR.

Los fragmentos se purificaron utilizando el kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se visualizaron en un gel de

agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). La cuantificación de los fragmentos se realizó en NanoDrop a 260 nm posteriormente los fragmentos se enviaron a secuenciar a Macrogen (Korea).

2.7 ANÁLISIS DE SECUENCIAS MEDIANTE UNA INFERENCIA FILOGENÉTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS GÉNES DE ESTUDIO EN *Capsicum chinense*.

Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI y la base de datos de Sol Genomics Network, mediante el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - nucleótidos). Con las secuencias obtenidas mediante el BLASTn (con menor valor E y mayor porcentaje de identidad) se realizó una inferencia filogenética para corroborar la relación genética de las secuencias de los diferentes genes de *C. chinense* obtenidas en el presente estudio.

Para polarizar los estados de carácter filogenéticamente informativos en las secuencias, se utilizaron los siguientes taxones como grupos externos (Cuadro 2.3) de acuerdo a los resultados del BLASTn con cada uno de los genes estudiados:

WUS: del orden Vitales Juss. ex Bercht. & J. Presl: *Vitis vinifera* L.; del orden Sapindales Juss. ex Bercht. & J. Presl: *Dimocarpus longan* Lour.; y del orden Asterales Link: *Helianthus annuus* L.

PIN7: del orden Malvales: *T. cacao*; y del orden Fabales Bromhead: *Medicago truncatula* Gaertn.

PIN1: del orden Ranunculales Juss. ex Bercht. & J. Presl: *Papaver rhoeas* L.; del orden Sapindales: *Mangifera indica* L.; del orden Fabales: *Glycine max* (L.) Merr.; y del orden Lamiales Bromhead: *Antirrhium majus* L.

CUC2: del orden Malpighiales: *Populus euphratica* Olivier; del orden Rosales: *Prunus mume* (Siebold) Siebold & Zucc.; y del orden Caryophyllales Juss. ex Bercht. & J. Presl: *Beta vulgaris* L.

NAM solo se ha reportado dentro de Solanales, así que no se incluyeron grupos externos a este orden.

CAPÍTULO II

STM: del orden Asparagales Link: *Ruscus aculeatus* L.; del orden Brassicales Bromhead: *Camelina sativa* (L.) Crantz; del orden Rosales: *Prunus persica* (L.) Batsch.; y del orden Marpighiales: *Terniopsis minor* M. Kato & Koi, *Hydrobryum japonicum* Imamura, *Cladopus doianus* Kôriba, *Polypleurum stylosum* (Wright) J.B. Hall, *Weddellina squamulosa* Tul.

El grupo interno (de interés) en cada uno de los análisis de los distintos genes, consistió de varios taxa diferentes del orden Solanales Juss. ex Bercht. & J. Presl: *Ipomoea nil* (L.) Roth (*STM*), *Petunia* × *hybrida* hort. ex E. Vilm. (*NAM*, *STM*), *Solanum tuberosum* L. (*WUS*, *PIN7*, *CUC2*, *NAM*), *S. pennellii* Correll (*WUS*, *CUC2*), *S. lycopersicum* L. (*WUS*, *PIN7*, *PIN1*, *CUC2*, *NAM*), *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp. (*WUS*, *PIN7*, *CUC2*), *N. sylvestris* Speg. & Comes (*WUS*, *PIN7*, *CUC2*), *N. tabacum* L. (*PIN7*, *PIN1*, *STM*), *Capsicum annuum* (*WUS*, *PIN7*, *PIN1*, *CUC2*, *NAM*, *STM*) y *C. chinense* (*WUS*, *PIN7*, *PIN1*, *CUC2*, *NAM*, *STM*).

El análisis filogenético se llevo a cabo de la siguiente manera: se contruyó una matriz para cada gen, conteniendo a los grupos externos e internos correspondientes. La matriz resultante fue alineada usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004). La reconstrucción de los árboles filogenéticos se llevo a cabo usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El soporte filogenético fue evaluado con 1,000 bootstrap. La reconstrucción del arbol consenso se realizó con el paradigma de Maxima Verosimilitud. Se evaluó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó a los datos de cada matriz (Guindon y Gascuel, 2003). Esto se realizó utilizando el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Cuadro 2.3 Taxones utilizados como grupos externos e internos en el analisis filogenético, obtenidos del NCBI y del Sol Genomics Network*.

Orden	Especie	Gen	Accesiones
Grupos externos			
Asparagales	<i>Ruscus aculeatus</i>	<i>STM</i>	AB300055.1
Ranunculales	<i>Papaver rhoeas</i>	<i>PIN1</i>	KJ664236.1
Vitales	<i>Vitis vinifera</i>	<i>WUS</i>	XM_002266287.2
Malpighiales	<i>Populus euphratica</i>	<i>CUC2</i>	XM_011013582.1
	<i>Terniopsis minor</i>	<i>STM</i>	AB512752.1
	<i>Hydrobryum japonicum</i>	<i>STM</i>	AB512740.1
	<i>Cladopus doianus</i>	<i>STM</i>	AB512743.1
	<i>Polypleurum stylosum</i>	<i>STM</i>	AB512746.1

Orden	Especie	Gen	Accesiones
	<i>Weddellina squamulosa</i>	STM	AB512748.1
Rosales	<i>Prunus mume</i>	CUC2	XM_008220397.1
	<i>Prunus persica</i>	STM	GQ281775.1
Fabales	<i>Medicago truncatula</i>	PIN7	XM_003624904.2
	<i>Glycine max</i>	PIN1	NM_001251420.1
Sapindales	<i>Dimocarpus longan</i>	WUS	KM017506.1
	<i>Mangifera indica</i>	PIN1	KM082988.1
Malvales	<i>Theobroma cacao</i>	PIN7	LT594792.1
Brassicales	<i>Camelina sativa</i>	STM	XM_010475154.1
Caryiophyllales	<i>Beta vulgaris</i>	CUC2	XM_010683787.1
Asterales	<i>Helianthus annuus</i>	WUS	LN811433.1
Lamiales	<i>Antirrhium majus</i>	PIN1	KP151485.1

Grupos internos

Solanales	<i>Petunia x hybrida</i>	NAM	X92205.2
		STM	AY112704.1
	<i>Ipomoea nil</i>	STM	EU672819.1
	<i>Nicotiana sylvestris</i>	WUS	XM_009793912.1
		PIN7	XM_009804978.1
		CUC2	XM_009798606.1
	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	WUS	XM_009589135.2
		PIN7	XM_009604127.2
		CUC2	XM_009614797.1
	<i>Nicotiana tabacum</i>	PIN7	NM_001326023.1
		PIN1	KC460399.1
		STM	JQ686930.1
	<i>Solanum tuberosum</i>	WUS	XM_006340669.2
		PIN7	XM_006339198.2
		CUC2	XM_006358415.2
		NAM	NM_001288405.1
	<i>Solanum pennellii</i>	WUS	XM_015210038.1
		PIN7	HG975449.1
		PIN1	HG975442.1
		CUC2	XM_015208079.1
	<i>Solanum lycopersicum</i>	WUS	NM_001247086.3
		PIN7	NM_001247275.1
		PIN1	NM_001247234.1
		CUC2	XM_004230347.2
		NAM	NM_001247325.2
	<i>Capsicum annuum</i>	WUS	CA02g21680*
		PIN7	CA10g18860*
		PIN1	CA03g30830*
		CUC2	Capang01g004302*

Orden	Especie	Gen	Accesiones
		<i>NAM</i>	CA07g17460*
		<i>STM</i>	CA02g18700*

2.8 ANÁLISIS POR PCR TIEMPO REAL

Para qRT-PCR el gen constitutivo utilizado fue beta-tubulina (Cuadro 2.2), previamente reportado para *C. annuum* (Wan et al., 2011). La expresión relativa fue procesada con el método de 2^{-Ct} (Livak y Schmitgen, 2001), en un termociclador StepOne (Applied Biosystem). Cada tubo de reacción contuvo los siguientes componentes a un volumen final de 20 μ L: 10 μ L SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.12 μ M de cada cebador y 4 μ L ADNc.

Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes un ciclo de 94°C por 3 min, seguido de 40 ciclos 94°C por 15 s, temperatura de alineamiento del cebador por 30s, por último se realizó la curva de disociación (Melt curve) de cada una de las muestras. Se analizaron cuatro replicas por muestra usando cuatro muestras biológicas. Los datos obtenidos fueron procesadas estadísticamente mediante ANOVA y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), usando el programa SPSS 16.0.0.

CAPÍTULO III

Algunos resultados de este capítulo se integraron al siguiente artículo:

Autores: Carlos Fernando Regla-Márquez, Susana Alejandra Avilés-Viñas, Raúl Enrique Valle-Gough, Pedro Manuel Osorio-Montalvo, Adriana Canto-Flick, Jacobo Pérez-Pastrana, Raúl Tapia-Tussell, Gregorio Godoy-Hernández y Nancy Santana-Buzzy.

Título: Expression of Genes Involved in Apical Meristem Development and their Relationship with the Incapacity of Somatic Embryos of *Capsicum chinense* Jacq. to Convert into in vitro Plants.

Revista: Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, en revisión.

RESULTADOS

3.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGENESIS SOMÁTICA.

Como se esperaba la aplicación del protocolo establecido por Avilés-Viñas *et al.* (2013) permitió la formación de los ES directamente del hipocótilo, en medio líquido. La frecuencia de formación de los embriones fue altamente eficiente, observándose aproximadamente 100 ESs por explante a los 45 días de inducido el proceso, pudiendo distinguirse los diferentes estadios de desarrollo de los embriones: globular, acorazonado (Figura 3.1a), torpedo y cotiledonar temprano. Sin embargo, se observó que la mayoría de los ES formados, mostraron el MC deformado, al arribar a los estadios torpedo cotiledonar. Las deformaciones más frecuentes observadas en los mismos fueron: la ausencia de cotiledones (forma de alfiler), fusión de cotiledones, cup-shaped cotyledon phenotype y la emisión de pseudo-cotiledones (uno o dos). Estos embriones se caracterizaron por la emisión de solamente la radícula (Figura 3.1b), no así verdaderos cotiledones.

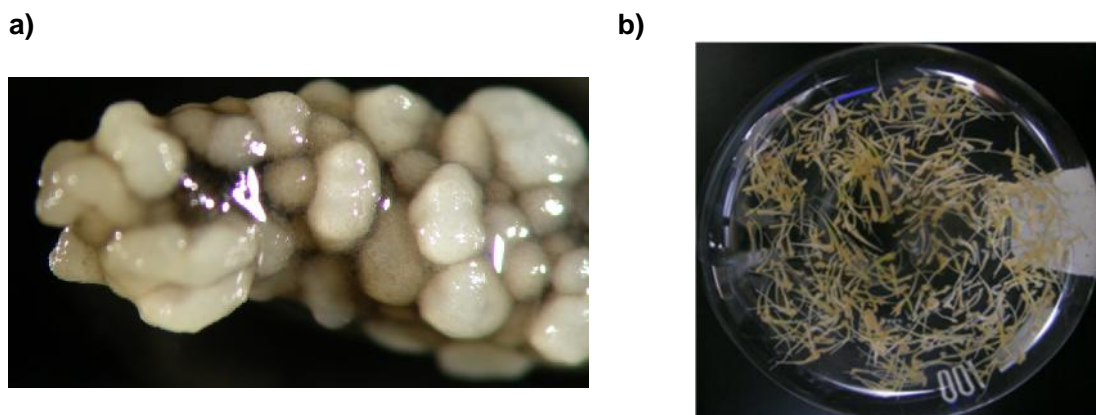


Figura 3.1 a) Hipocótilo de *C. chinense* a los 45 días de inducción del proceso de embriogénesis somática. b) Embriones somáticos de *C. chinense* emitiendo únicamente la radícula.

3.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE DIFERENTES EXPLANTES DE *C. chinense* Y SÍNTESIS DE ADNc.

Se extrajo ARN de ESs y ECs en diferentes fases de desarrollo y del MC. Se verificó la integridad del ARN mediante la observación de las subunidades ribosomales 28S y 18S con la técnica de electroforesis (Figura 3.2a).

Se cuantificaron las muestras y su relación de absorbancia 260/280 (Cuadro 3.1), las muestras se encontraron en un rango de entre 737.0-1,269 ng/μL y todas se encontraron con la pureza recomendada.

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

Muestra	Cuantificación (ng/μL)	Absorbancia 260/280
ES GC	1,137.4	2.15
ES TC	1,141.0	2.06
EC GC	1,269.0	2.07
EC TC	737.0	1.98
MC	1,235.4	2.01

Para verificar la calidad del ADNc sintetizado se tomó como testigo positivo el gen 18S ribosomal con un tamaño de fragmento de 200 pb para las muestras (Figura 3.2b).

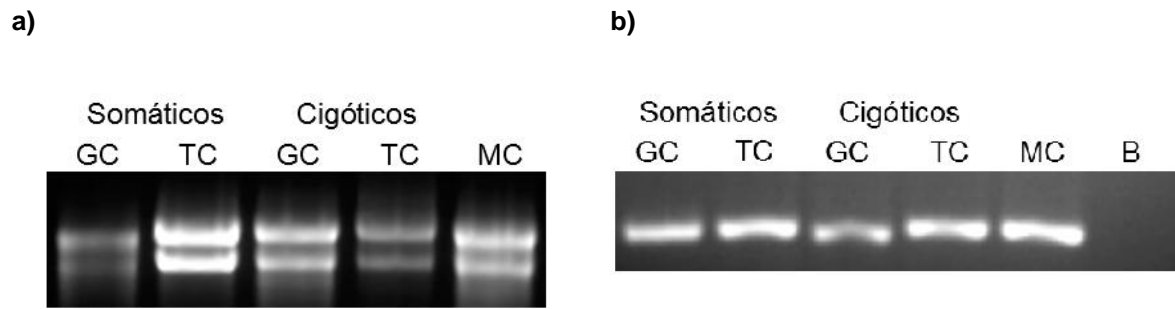


Figura 3.2 a) Extracción de ARN total de embriones cigóticos y somáticos de *C. chinense* b) Comprobación de calidad del ADNc de *C. chinense* por medio del gen constitutivo 18S. GC: embriones en etapa globular y corazón; TC: embriones en etapa torpedo y cotiledonar; MC: meristemo caulinar; B: blanco.

3.3. ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS GENES ESTUDIADOS DE *C. chinense*.

3.3.1 WUS

La detección del gen *WUS* se llevó a cabo en EC y ES en etapas globular y corazón (G-C), utilizando como testigo meristemo caulinar (MC) de plántulas de *C. chinense* (Figura 3.3). Se logró amplificar este gen en los tres tejidos examinados dada la presencia de cómo se esperaba de una única banda de 110 pb.

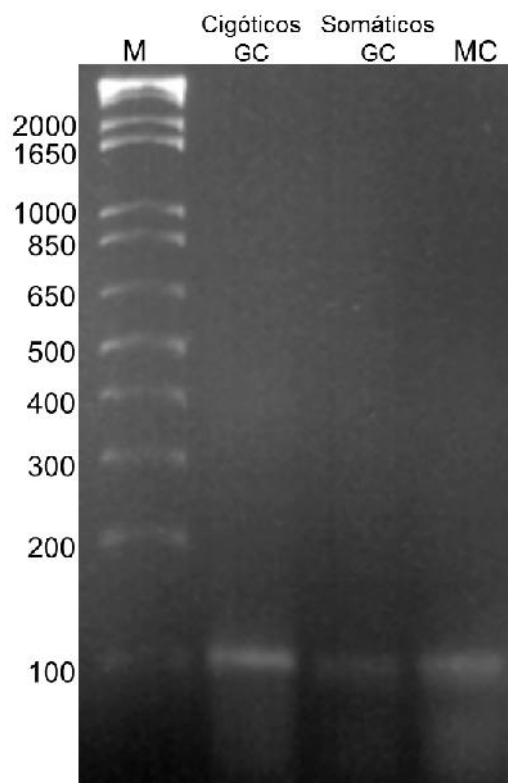


Figura 3.3 Amplificación de un putativo de *WUS* (110pb) de *C. chinense*, en embriones cigóticos, somáticos y meristemo caulinar (MC). GC: estadios globular-corazón, M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

La secuenciación de la banda nos arrojó como resultado una secuencia de 74 bases:

```
CTAGTCTGAGTCTGTAAGCCATAGATCTAAGGCAAAAATGTGTTTTATTGGTTTCAGAA  
CCATAAAGCTCGTGA
```


Los resultados BLASTn revelaron la existencia de una alta similitud de la secuencia obtenida con las secuencias de *WUS* de otras especies (Cuadro 3.2) así como con las secuencias reportadas para el género *Capsicum* (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.2 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *WUS* de *C. chinense* de la base de datos NCBI.

Identificador	Especie	Ident. %	Valor E
XM_006340669.2	<i>Solanum tuberosum</i> protein WUS, mRNA	96%	6e-14
XM_015210038.1	<i>Solanum pennellii</i> protein WUS, mRNA	96%	6e-14
NM_001247086.3	<i>Solanum lycopersicum</i> WUS protein, mRNA	96%	6e-14
XM_002266287.2	<i>Vitis vinifera</i> protein WUS, mRNA	86%	6e-14
XM_009793912.1	<i>Nicotiana sylvestris</i> protein WUS, mRNA	94%	2e-12

Cuadro 3.3 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *WUS* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network.

Identificador	Secuencia/Especie	Ident. %	Valor E
Capang02g002330	Protein WUSCHEL <i>S. lycopersicum</i> <i>C. annuum</i> glabriusculum Genome CDS (v2.0)	100%	5e-19
CA02g21680	WUSCHEL <i>C. annuum</i> cv CM334 Genome CDS (1.55)	100%	5e-19
Capana02g002594	WUSCHEL <i>C. annuum</i> zunla Genome CDS (v2.0)	100%	5e-19
C6378968	19 <i>C. chinense</i> Genome scaffolds (release 0.5)	100%	4e-17

Los resultados del análisis filogenético mostró la existencia de monofilia del orden Solanales (Figura 3.4), lo cual concuerda con lo reportado por Olmstead *et al.* (2008) y Haak *et al.* (2014). Sin embargo *Solanum lycopersicum* se ubicó al interior del clado del género *Capsicum* con un soporte bajo (44). Cabe señalar que las relaciones entre los órdenes del grupo externo e interno resultó similar a la descrita por la APG IV (2016).

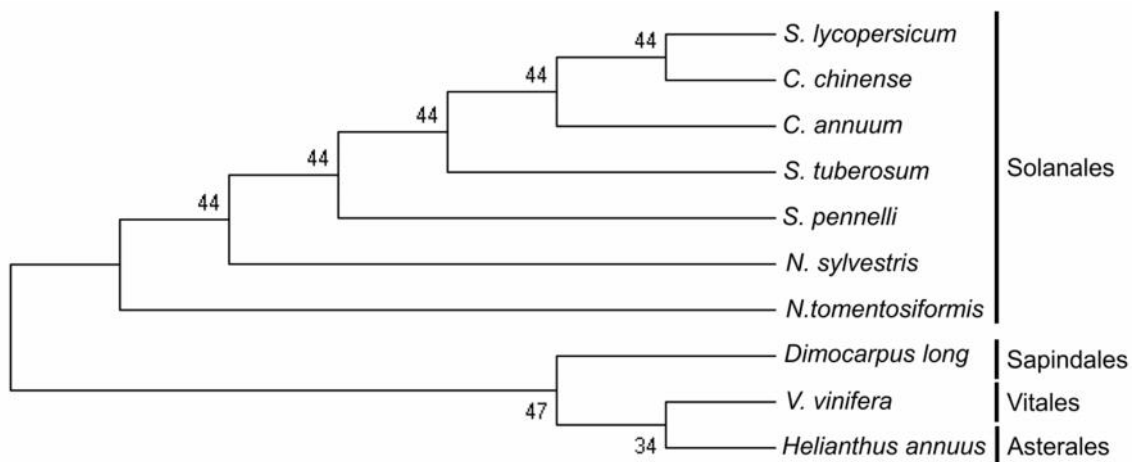


Figura 3.4 Inferencia filogenética del gen *WUS*, mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros.

3.3.2 PIN7

Se probó un gradiente de temperatura. Se observó una banda del tamaño esperado (195 pb) en todas las temperaturas (Figura 3.5), corroborando que amplifica a 60°C.

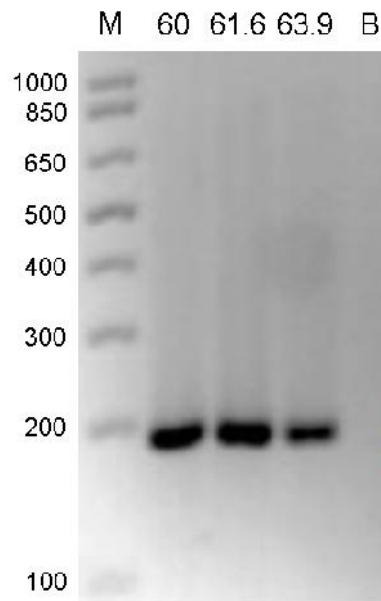


Figura 3.5 Amplificación de un putativo de *PIN7* (190pb) en meristemo caulinar de *C. chinense* con un gradiente de temperatura., M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

Los resultados de la secuenciación arrojaron una secuencia de 135 bases:

```
TTTTCTCCGGCAACCGGACCGGCGGGACAAAGAGAAGGGTAATGGAAGTGAAGGT
GGAAAAGATCTTCACATGTTTGTGGAGTTCAAGTGCTTCACCAGTATCTGAAGGAG
GGATTCATGTGTTTCAGAGGAG
```

El BLASTn con esta secuencia nos dio como resultado genes con una alta similitud con las secuencias de otras especies cercanas a *C. chinense* (Cuadro 3.4) y del género *Capsicum* (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.4 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *PIN7* de *C. chinense* de la base de datos NCBI.

Identificador	Especie	Ident. %	Valor E
HG975449.1	<i>Solanum pennellii</i> cromosoma 10	90%	3e-42
NM_001247275.1	<i>S. lycopersicum</i> <i>PIN7</i>	90%	3e-42
XM_006339198.2	<i>S. tuberosum</i> transportador de auxinas	88%	5e-39
XM_009604127.2	<i>Nicotiana tomentosiformis</i> transp. auxinas	88%	2e-38
XM_009804978.1	<i>N. sylvestris</i> transportador de auxinas	87%	9e-36

Cuadro 3.5 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *PIN7* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network.

Identificador	Secuencia/Especie	Ident. %	Valor E
Capang10g001908	Transportador de auxinas <i>C. annuum</i> glabriusculum Genome CDS (v2.0)	100%	5e-19
CA10g18860	Transportador de auxinas <i>C. annuum</i> cv CM334 Genome CDS (1.55)	100%	5e-19
Capana10g002152	Transportador de auxinas <i>C. annuum</i> zunla Genome CDS (v2.0)	100%	5e-19
scaffold100098	6.9 <i>C. chinense</i> Genome scaffolds (release 0.5)	100%	4e-17

En el análisis filogenético se observó que las relaciones al interior del del grupo externo e interno (Figura 3.6), fueron acordes a las descritas por la APG IV (2016). A su vez, al interior del clado Solanales. Las relaciones entre los géneros fueron acordes a las reportadas por Olmstead *et al.* (2008) y Haak *et al.* (2014). Es importante señalar que el clado de *Capsicum* tuvo un soporte alto (94).

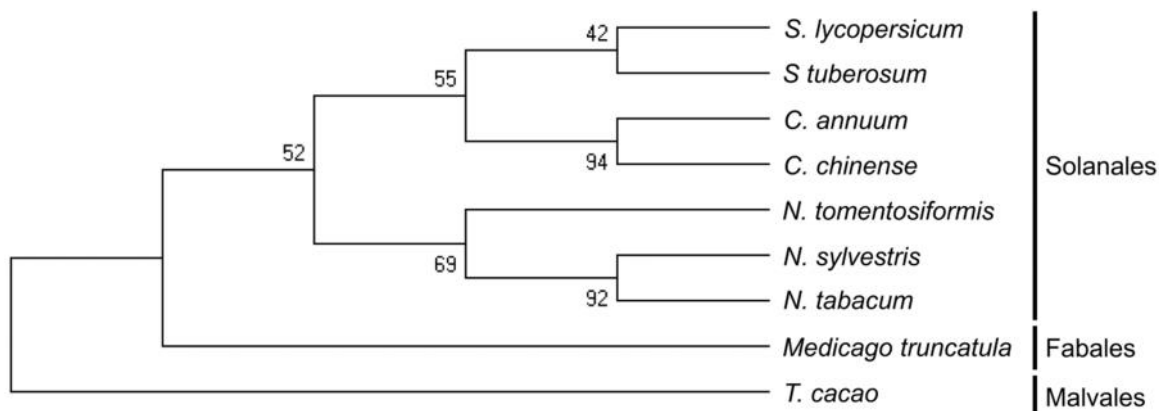


Figura 3.6 Inferencia filogenética del gen *PIN7* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros.

3.3.3 PIN1

Se probó un gradiente de temperatura. Se observó una banda del tamaño esperado (126 pb) en todas las temperaturas (Figura 3.7), corroborando la amplificación de la banda a 60°C.

La secuenciación nos arrojó una secuencia de 84 bases:

```
TGCAATGATGTTTATGGTATGTCTAATAATTCAAGAGGGCCAACTCCGAGACCTTCAA
ATTATGAGGAGGAAAGTGGGAAATCA
```

El BLASTn con esta secuencia arrojó como resultado genes con una alta similitud con las secuencias de otras especies cercanas a *C. chinense* (Cuadro 3.6) y del género *Capsicum* (Cuadro 3.7).

El análisis filogenético mostró que las relaciones al interior del del grupo externo e interno (Figura 3.8), fueron acordes a lo reportado por la APG IV (2016). El clado *Capsicum-Solanum* tuvo un buen soporte (84). Es importante señalar que resto de los clados no tuvieron un soporte confiable de bootstrap. El género *Nicotiana* no se agrupó con el resto de las Solanales.

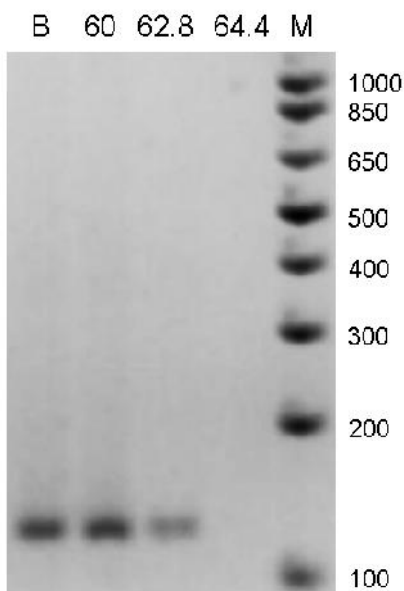


Figura 3.7 Amplificación de un putativo de *PIN1* (pb) en meristemo caulinar de *C. chinense* con un gradiente de temperatura., M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

Cuadro 3.6 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *PIN1* de *C. chinense* de la base de datos NCBI.

Identificador	Especie	Ident. %	Valor E
NM_001247234.1	<i>S. lycopersicum</i> auxin efflux facilitator	94%	3e-25
XM_009616565.2	<i>N. tomentosiformis</i> auxin efflux carrier	86%	2e-16
XM_016658576.1	<i>N. tabacum</i> auxin efflux carrier	86%	2e-16
XM_004512686.2	<i>Cicer arietinum</i> auxin efflux carrier	82%	6e-09
KP151485.1	<i>Antirrhinum majus</i> PIN1 mRNA	79%	8e08-

Cuadro 3.7 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *PIN1* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network.

Identificador	Secuencia/Especie	Ident. %	Valor E
Capang03g000694	PIN1_ORYSJ <i>C. annuum</i> glabriusculum Genome CDS (v2.0)	100%	8e-40
CA03g30830	PIN1 auxin transport protein <i>C. annuum</i> cv CM334 Genome CDS (1.55)	100%	8e-40
Capana03g000765	PIN1_ORYSJ <i>C. annuum</i> zunla Genome CDS (v2.0)	100%	8e-40
scaffold171445	7.5 <i>C. chinense</i> Genome scaffolds (release 0.5)	100%	6e-38

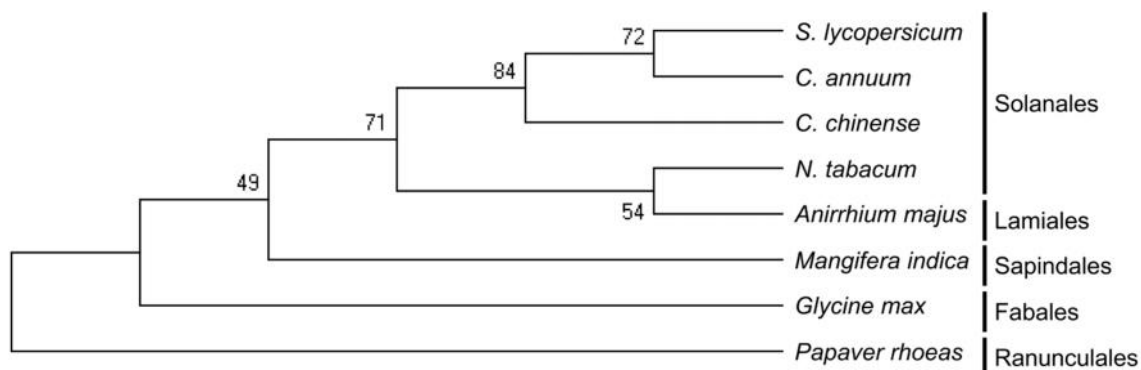


Figura 3.8 Inferencia filogenética del gen *PIN1* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor.

3.3.4 CUC2

Todos los cebadores diseñados para *CUC2* amplificaron el tamaño de banda esperado (Figura 3.9), sin embargo se descartaron los cebadores que presentaron amplificación inespecífica. El par de cebadores CUC2 1 (104 pb) fue el que mejores resultados arrojaron.

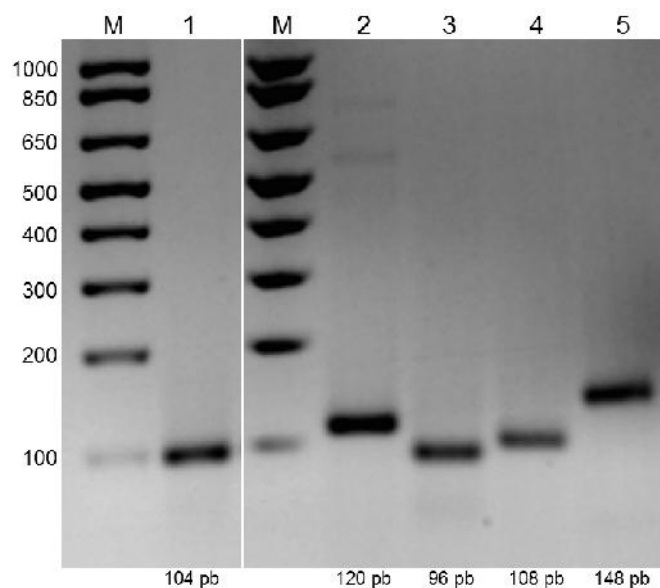


Figura 3.9 Amplificación de un putativo de *CUC2* en meristemo caulinar de *C. chinense* con la combinación de cebadores CUC2 1-5. M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

El resultado de la secuenciación generó una secuencia de 102 bases:

```
TCCACAACATGAGACTGAACGCCTACAAAAGGCAGAAATTCAC TTTGTCGTGTCTACA
AAGAGCTGGAGTGG AAGACCATCCATCTCTCCCACGATCACTTC
```

El BLASTn de esta secuencia, presentó secuencias que contiene el dominio NAC presente en *CUC2* (Cuadro 3.8). En la base de datos del Sol Genomics Network no se le ha dado una identidad a la secuencias arrojadas después del BLASTn (Cuadro 3.9).

Cuadro 3.8 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *CUC2* de *C. chinense* en la base de datos del NCBI.

Identificador	Especie	Ident. %	Valor E
XM_006358415.2	<i>S. tuberosum</i> NAC domain-containing protein 55	94%	3e-34
XM_004230347.2	<i>S. lycopersicum</i> NAC domain-containing protein 55	93%	1e-31
XM_009798606.1	<i>N. sylvestris</i> NAC domain-containing protein 94	90%	2e-28
XM_009614797.1	<i>N. tomentosiformis</i> NAC domain-containing protein 19	89%	1e-26
XM_015208079.1	<i>S. pennellii</i> NAC domain-containing protein 55	86%	1e-25

Cuadro 3.9 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *CUC2* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network.

Identificador	Secuencia/Especie	Ident. %	Valor E
Capang01g004302	Protein FEZ Arabidopsis thaliana <i>C. annuum</i> glabriusculum Genome CDS (v2.0)	98%	7e-44
-----	----- <i>C. annuum</i> cv CM334 Genome CDS (1.55)	--%	---
Capana08g001727	Protein FEZ Arabidopsis thaliana <i>C. annuum</i> zunla Genome CDS (v2.0)	98%	7e-44
scaffold12732	7.9 <i>C. chinense</i> Genome scaffolds (release 0.5)	97%	1e-24
Solyc01g102740.2.1	NAC domain protein IPR003441 (NAM) Tomato Genome CDS (ITAG release 2.40)	93%	1e-30

El análisis filogenético mostró que las relaciones al interior del del grupo externo e interno (Figura 3.10), fueron iguales a las descritas por la APG IV (2016). A su vez, al interior del clado Solanales, las relaciones entre los géneros fueron acordes a las reportadas por Olmstead et al. (2008) y Haak et al. (2014). Es importante señalar que el clado de *Capsicum* tuvo un buen soporte (89).

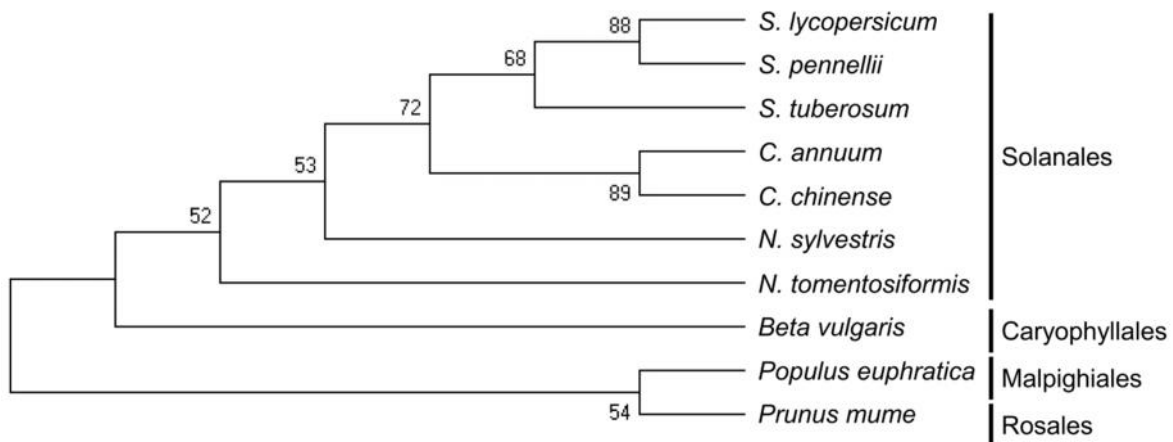


Figura 3.10 Inferencia filogenética del gen putativo *CUC2* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros.

3.3.5 NAM

Los cebadores diseñados para *NAM* que amplificaron fueron NAM3 y NAM4 (Figura 3.11). Al correr una segunda vez estos cebadores y exponer un poco más el gel se pudo observar que con el cebador NAM3 se amplificaba otra banda de aproximadamente 300 pb.

Al secuenciar la banda obtenida con los cebadores NAM4, nos arrojó una secuencia de 107 bases:

```
GGTGGTTTCCAGCTTCCGTGTTCTCCGGGAGCCTCCGCCATGCACGGAGGTTTCG
AATGGATGTATTGGTCAGTACCCGAGACTCAGAAAGTGGAGCAGTCTGAAG
```

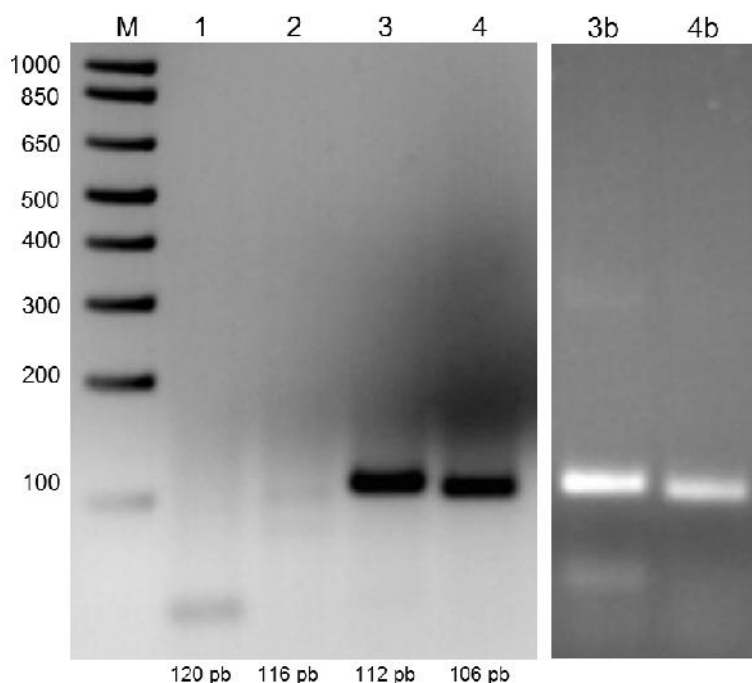


Figura 3.11 Amplificación de *NAM* en meristemo caulinar de *C. chinense* con la combinación de cebadores NAM 1-4. 3b y 4b: gel de los cebadores NAM3 y NAM4 con mayor exposición. M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

Al realizar un BLASTn, se pudo encontrar genes con una alta similitud con las secuencias de otras especies únicamente de la familia de las Solanaceas (Cuadro 3.10). En las base de datos Sol Genomic Network, arrojó como resultado secuencias de la familia de genes CUC/NAM (Cuadro 3.11).

Cuadro 3.10 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *NAM* de *C. chinense* en la base de datos del NCBI.

Identificador	Especie	Ident. %	Valor E
NM_001247325.2	<i>S. lycopersicum NAM</i>	81%	3e-14
HM210879.1	<i>S. lycopersicum GOBLET</i>	81%	3e-14
NM_001288405.1	<i>S. tuberosum NAM</i>	78%	8e-09
X92205.2	<i>P.hybrida mRNA encoding NAM protein</i>	73%	0.007

Cuadro 3.11 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *NAM* de *C. chinense* en la base de datos de Sol Genomics Network.

Identificador	Secuencia/Especie	Ident. %	Valor E
Capang07g002179	NAC98_ARATH Protein CUC2 <i>C. annuum</i> glabriusculum Genome CDS (v2.0)	89%	8e-16
CA07g17460	Protein CUC2-like <i>C. annuum</i> cv CM334 Genome CDS (1.55)	89%	8e-16
Capana07g002159	Protein CUC2 <i>C. annuum</i> zunla Genome CDS (v2.0)	89%	8e-16
scaffold168513	7.1 <i>C. chinense</i> Genome scaffolds (release 0.5)	90%	3e-16

El análisis filogenético mostró que las relaciones entre los géneros del orden Solanales fueron acordes a las reportadas por Olmstead et al. (2008) y Haak et al. (2014) (Figura 3.12). Es importante señalar que el clado de *Capsicum* tuvo un soporte alto (100).

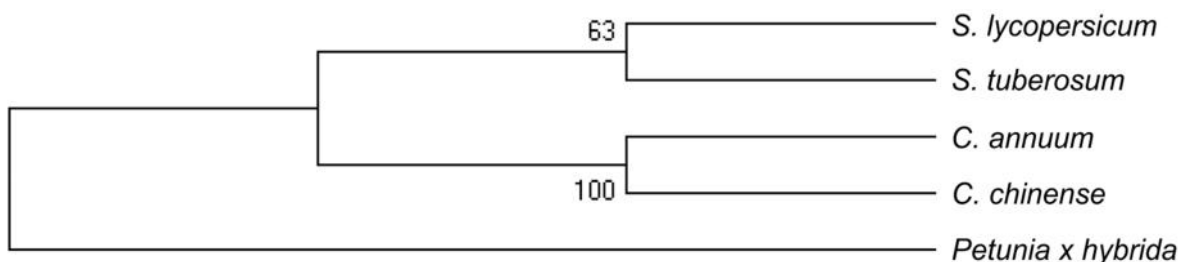


Figura 3.12 Inferencia filogenética del gen *NAM* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor.

3.3.6 STM

Se probaron gradientes de temperatura para cada cebador (Figura 3.13). Para los cebadores STM1, se observó una banda del tamaño esperado en las temperaturas de 62°C y 64°C (Figura 3.13a), siendo la temperatura ideal de 64°C, ya que a 62°C pierde especificidad amplificando un fragmento de aproximadamente 850 pb.

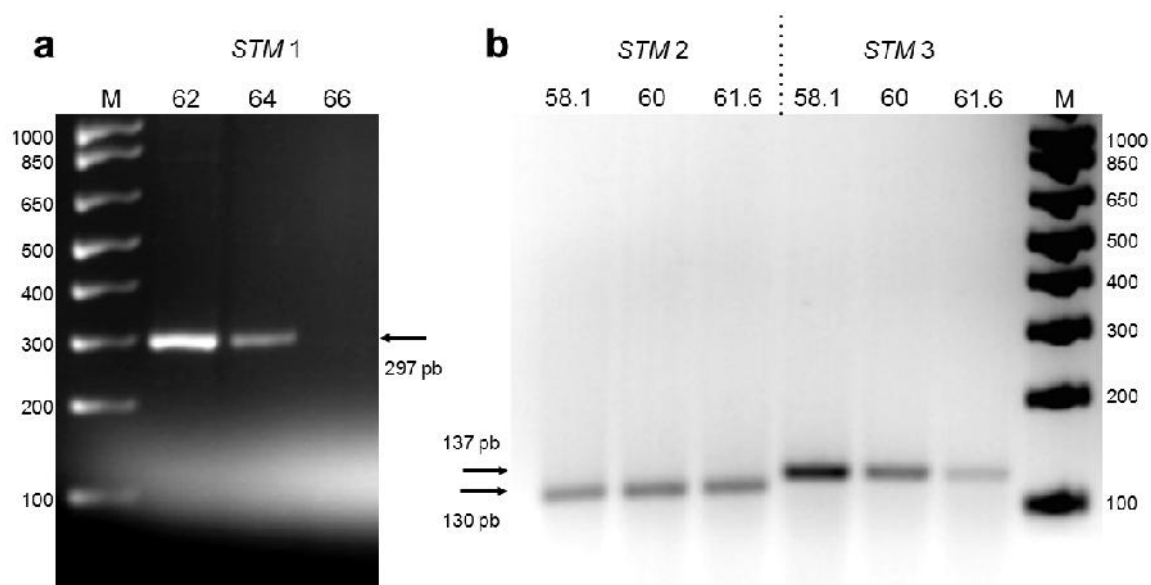


Figura 3.13 Amplificación de un putativo de *STM* en meristemo caulinar de *C. chinense* utilizando diferentes gradientes de temperatura. a) Combinación STM1 (297 pb) b) Combinaciones STM2 (130 pb) y STM3 (137 pb) M: Marcador de peso molecular (1 Kb).

Para las combinaciones de cebadores STM2 y 3 se obtuvieron las bandas esperadas (130pb y 137pb respectivamente) (Figura 3.13b). Las bandas obtenidas se purificaron de gel, y se mandaron secuenciar, obteniendo para STM1 una secuencia de 181 bases:

```
AAATGGTGGGAAGCCTTAAGCAGGAGTTCATGAAGAAGAGGAAGAAAGGCAAGCTGC
CTAAGGAAGCAAGGCAACAACCTGCTCGACTGGTGGACCCGACATTACAAATGGCCAT
ACCCATCGGAATCCCAGAACTGGCACTTGCTGAGTCTACAGGATTGGACCAGAAGC
AAATAACAA
```

Por otro parte para STM3 una secuencia de 95 bases:

AGAAAAGCAAGAAGGCAAGCTGCCTAAGGAAGCAAGGCAACAACACTGCTCGACTGGT
GGACCCGACATTACAAATGGCCATATCCATCGGAATACA

La secuencia obtenida de los cebadores STM2 no fue específica para el gen *STM*, por lo que no se trabajó con ella.

Los cebadores STM1 y STM3 se diseñaron en la misma región (Figura 3.14), por lo que para los análisis de inferencias filogenéticas se utilizó la secuencia más larga, la secuencia de los cebadores STM1. Por otro lado, para qRT-PCR se utilizaron los cebadores STM3 que amplifican un fragmento del tamaño ideal para esta técnica.

	701					750
N. tabacum	GCAAATACAG	TGGTTACTTG	GGTAGCCTTA	AGCAGGAGTT	CATGAAGAAG	
STM1	AAA	TGGT-----G	GGAAGCCTTA	AGCAGGAGTT	CATGAAGAAG	
STM3						AGAAA
	751					800
N. tabacum	AGGAAGAAAG	GCAAGCTGCC	TAAGGAAGCA	AGGCAACAAC	TACTGGACTG	
STM1	AGGAAGAAAG	GCAAGCTGCC	TAAGGAAGCA	AGGCAACAAC	TGCTCGACTG	
STM3	AGCAAGAA-G	GCAAGCTGCC	TAAGGAAGCA	AGGCAACAAC	TGCTCGACTG	
	801					850
N. tabacum	GTGGACCAGA	CATTACAAAT	GGCCATATCC	ATCGGAATCC	CAGAACTGG	
STM1	GTGGACCCGA	CATTACAAAT	GGCCATATCC	ATCGGAATCC	CAGAACTGG	
STM3	GTGGACCCGA	CATTACAAAT	GGCCATATCC	ATCGGAATAC	A	
	851					900
N. tabacum	CACTGGCTGA	ATCTACAGGA	TTGGACCAA	AACAAATAAA	CAACTGGTTT	
STM1	CACTTGCTGA	GTCTACAGGA	TTGGACCAGA	AGCAAATAAA	CAA	
STM3						

Figura 3.14 Secuencias obtenidas de los cebadores STM1 y STM3 alineados con la secuencia del gen *STM* de *N. tabacum* (JQ686930.1).

A la secuencia de los cebadores STM1 se le realizó un BLASTX en la base datos del NCBI, y se observó que esta secuencia es parte del homeodominio (Figura 3.15) y tienen una alta similitud con secuencias del gen *STM* reportadas para otras especies cercanas (Cuadro 3.12). Por otra parte, en la base de datos de Sol Genomics Network se encontraron secuencias de la clase KNOTTED a la que pertenece *STM* (Cuadro 3.13).



Figura 3.15 Dominio estructural homeodominio conservado en la secuencia putativa de *STM* de *C. chinense*, base de datos NCBI.

Cuadro 3.12 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *STM* de *C. chinense*, de los cebadores STM1, BLASTX (Altschul *et al.*, 1997), en la base de datos del NCBI.

Identificador	Especie	Ident. %	Valor E
JQ686930.1	<i>N. tabacum</i> STM mRNA	94%	2e-69
AY112704.1	<i>Petunia x hybrida</i> STM-like mRNA	94%	7e-64
EU672819.1	<i>Ipomoea nil</i> STM-like protein mRNA	89%	9e-56
AB300055.1	<i>Ruscus aculeatus</i> RaSTM mRNA	88%	5e-53
AB512748.1	<i>Weddellina squamulosa</i> WsSTM mRNA	87%	2e-51

Cuadro 3.13 Secuencias que producen alineamientos significativos para la secuencia putativa de *STM* de *C. chinense*, de los cebadores STM1, BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) en la base de datos de Sol Genomics Network.

Identificador	Secuencia/Especie	Ident. %	Valor E
Capang02g002024	HB protein knotted-1-like <i>C. annuum</i> glabriusculum Genome CDS (v2.0)	100%	1e-92
CA02g18700	HB protein knotted-1 <i>C. annuum</i> cv CM334 Genome CDS (1.55)	100%	1e-92
Capana02g002594	HB protein knotted-1-like <i>C. annuum</i> zunla Genome CDS (v2.0)	100%	1e-92
scaffold149109	8.2 <i>C. chinense</i> Genome scaffolds (release 0.5)	100%	5e-56

El análisis filogenético mostró que las relaciones al interior del del grupo externo e interno (Figura 3.16), fueron iguales a las descritas por la APG IV (2016). A su vez, al interior del clado Solanales, las relaciones entre los géneros fueron acordes a las reportadas por Olmstead et al. (2008) y Haak et al. (2014). El clado de *Capsicum* tuvo un soporte alto (92).

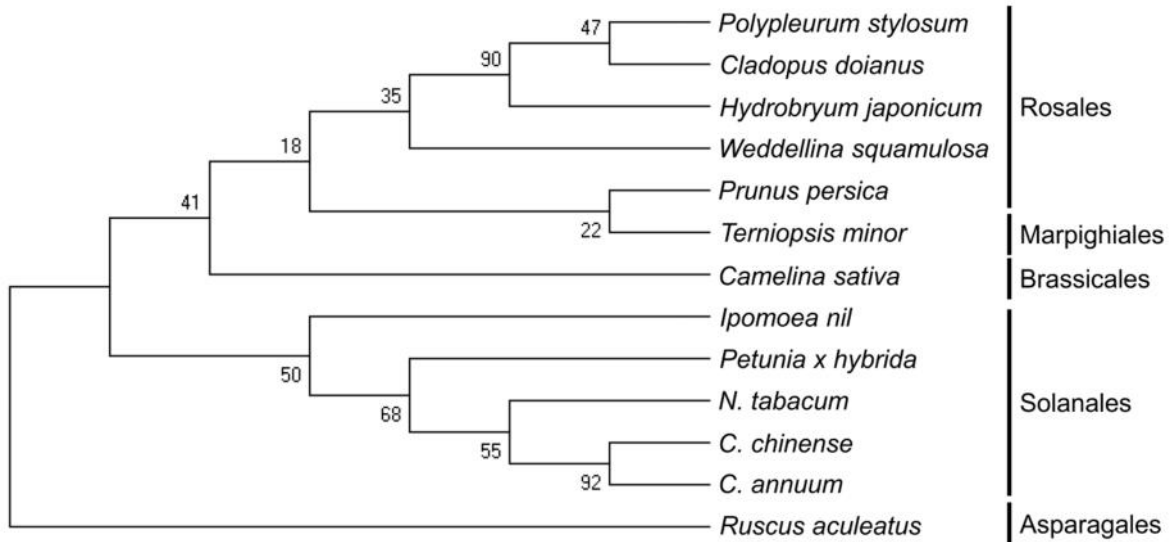


Figura 3.16 Inferencia filogenética del gen *STM* mediante el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros.

3.4 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS PUTATIVOS EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE *C. chinense*.

3.4.1 PRUEBA DE CEBADORES PARA PCR TIEMPO REAL.

Se corrieron los cebadores con muestras de meristemo caulinar para confirmar la especificidad de los cebadores, para esto se utilizó la curva de disociación (Melt curve) con la cual se confirmó la amplificación de un solo amplicon en todos los cebadores (Figura 3.17).

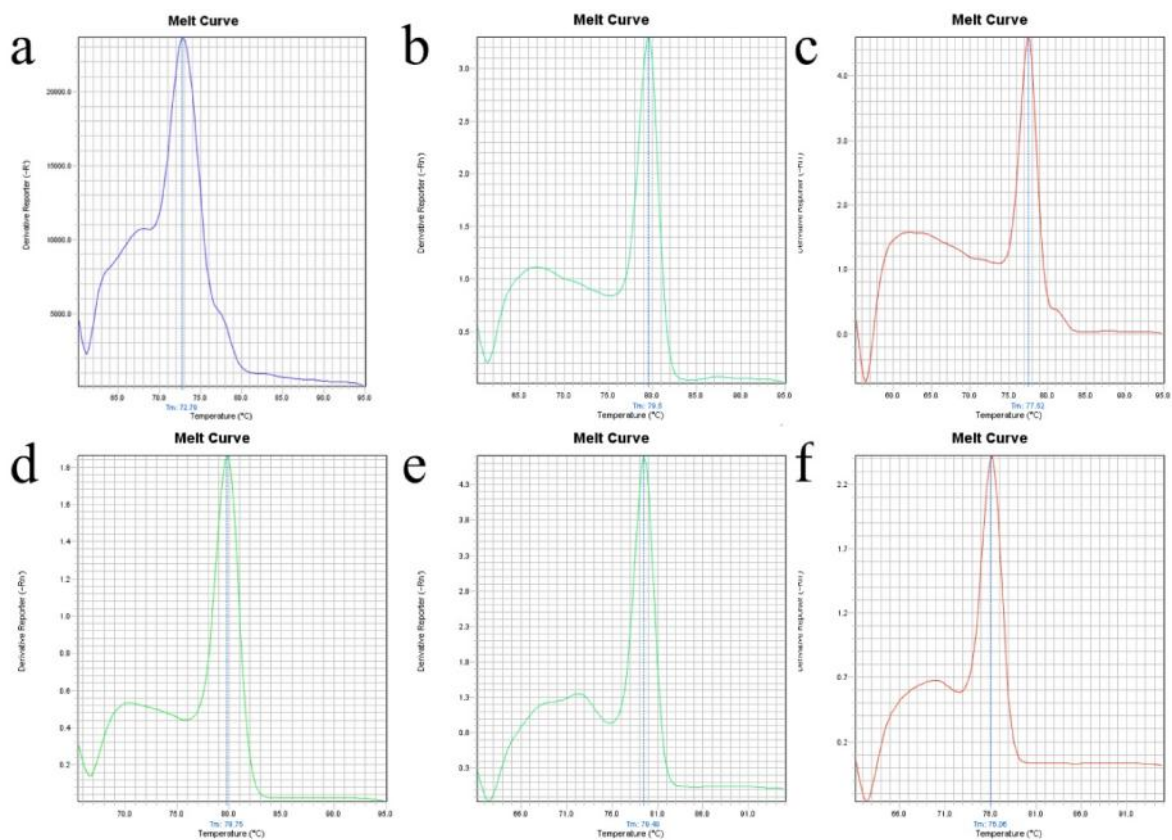


Figura 3.17 Curva de disociación de los fragmentos putativos de *WUS* (a), *STM*(b), *CUC2*(c), *NAM*(d), *PIN7*(e) y *PIN1*(f) de *C. chinense*.

3.4.2 ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE *WUS* EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE *C. chinense*.

La mayor expresión de *WUS* fue registrada en estadios tempranos del desarrollo de los ECs (G-C), mientras que la más baja expresión se observó en ESs en estadios avanzados (T-C) (Figura 3.18). Sin embargo, el patrón de expresión de este gen tuvo un comportamiento similar en ambos tipos de embriones: mayor abundancia de transcritos en los primeros estadios de desarrollo del embrión (G-C) y menor acumulación de transcritos hacia el final del desarrollo del embrión (T-C). Se hizo notorio que la expresión relativa de *WUS* hacia el final del desarrollo de los ESs (T-C) fue significativamente baja.

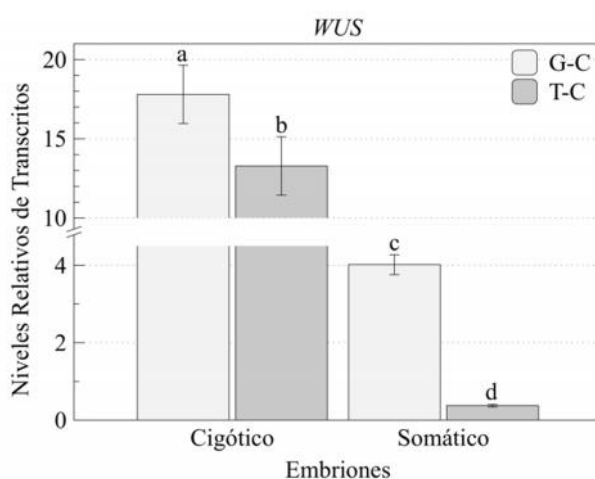


Figura 3.18 Cuantificación de los niveles de transcritos de *WUS* en embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense*. Las señales de PCR fueron normalizadas con β -tubulina. Valores son promedio \pm E.S. (n=4, p<0.05). Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticas. G-C, etapas globular-corazón; T-C, etapas torpedo-cotiledonar.

3.4.3 NIVELES DE TRANSCRITOS DE *PIN7* Y *PIN1* EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE *C. chinense*.

Al examinar la expresión de *PIN7* en ECs y ESs (Figura 3.19a), se observó que, tanto la más alta como la más baja acumulación de transcritos, se registró en ESs, siendo más abundante en los embriones más avanzados en su desarrollo (T-C). Aunque la acumulación de transcritos de *PIN7* en EC fue significativamente menor que en ESs, se pudo apreciar que en los estadios tempranos de desarrollo del EC (G-C) el nivel de

transcritos acumulados fue significativamente más alto que en los ESs, en similares estadios de desarrollo (Figura 3.19a). Sin embargo, el patrón de expresión de *PIN7* en ECs y ESs fueron similares: mayor expresión en los estadios avanzados (T-C) que en los estadios tempranos de desarrollo del embrión (G-C). Sorprendentemente, el patrón de expresión de *PIN1* en ESs y en ECs resultaron completamente opuestos (Figura 3.19b). Contrario a *PIN7*, la mayor abundancia de transcritos acumulados de *PIN1* ocurrió en los primeros estadios de desarrollo (G-C) del EC, contrastando con la más baja acumulación de transcritos de este gen, registrada en los mismos estadios (G-C), pero del ES. El transporte polar de auxinas es fundamental para muchos procesos regulados por las auxinas y requiere la actividad de reguladores de flujo localizados polarmente, representados por la familia PIN-FORMED. El transporte polar de auxinas es responsable del mantenimiento de los niveles de auxinas en el embrión a concentraciones que permite la formación normal de patrones. Antes de la etapa globular, las auxinas parecen ser transportadas hacia arriba a través del suspensor a las células del proembrión (Friml *et al.*, 2003). Se piensa que el transporte basal-apical está mediado por *PIN7*, que se localiza en las membranas apicales de las células del suspensor y según los estudios, provoca la expresión débil del gen reportero DR5 en el proembrión. En la etapa globular temprana, el transporte apical-basal es establecido y persiste durante toda la vida (Friml *et al.*, 2003; Steinmann *et al.*, 1999). *PIN1* se localiza preferentemente en la membrana basal de las células internas del proembrión. Se ha reportado que el tratamiento de embriones inmaduros con inhibidores del transporte polar de auxinas conduce a defectos en patrones embrionarios en varias especies de plantas (Friml *et al.*, 2003; Hadfi *et al.*, 1998; Liu *et al.* 1993; Schiavone y Cooke 1987). Las mutantes defectuosas en el transporte de auxinas y/o localización de PIN, muestran actividad alterada de DR5, dando como resultado la falta de raíz embrionaria o en la fusión de cotiledones (Möller y Weijers, 2009). Esto permite inferir que el control de la distribución de auxinas por las proteínas PIN es el proceso central para el patron embrionario apical-basal.

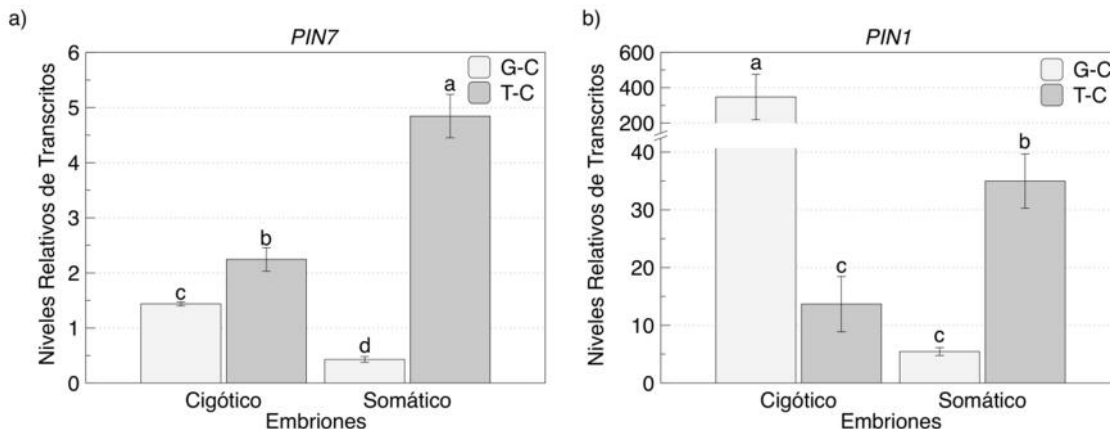


Figura 3.19 Cuantificación de los niveles de transcritos de *PIN7* (a) y *PIN1* (b) en embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense*. Las señales de PCR fueron normalizadas con β -tubulina. Valores son promedio \pm E.S. (n=4, p<0.05). Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticas. G-C, etapas globular-corazón; T-C, etapas torpeda-cotiledonar.

3.5.4 ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE *CUC2*, *NAM* Y *STM* EN EMBRIONES CIGÓTICOS Y SOMÁTICOS DE *C. chinense*.

Como se aprecia, existe una mayor acumulación de transcritos de *CUC2* en EC que en ES (Figura 3.20a), aunque el patrón de expresión de este gen en ambos tipos de embriones (EC y ES), fue similar. Se observó además que en EC los niveles de transcritos acumulados de *CUC2* en la etapa G-H fueron dramáticamente bajos, comparado con los estadios avanzados de desarrollo de estos embriones (T-C) (Figura 3.20a).

Al analizar la expresión relativa de *NAM* (Fig. 3.20b), la actividad más baja de este gen se observó en ECs, particularmente en los estadios globular y acorazonado (G-C) contrastando con sobreacumulación de transcritos de este gen registrada en ESs, tanto en estadios tempranos de su desarrollo (G-C) como en los más avanzados (T-C), sin que difiriera significativamente el nivel de expresión entre ambos estadios de desarrollo del ES. Sin embargo, el patrón de expresión de *NAM* en ECs y ESs fue similar: menor acumulación de transcritos en estadios tempranos (G-C) que en los estadios más avanzados del desarrollo del embrión (T-C). Nuestros análisis evidencian que, aunque

NAM mostró patrones de expresión similares en ECs y en ESs, la abundancia significativa en la acumulación de transcritos de *NAM* en ESs, comparada con ECs, pudiera estar influyendo en la alteración del patrón de desarrollo del MC. Se ha reportado que la mayoría de las mutantes *nam* de *Petunia* carecen del MC, presentan los cotiledones parcialmente fusionados y mueren en la etapa de plántula (Souer et al. 1996). Contrastando con *NAM*, y contrario a lo esperado, el patrón de expresión relativa de *STM* en ESs resultó opuesto al patrón de expresión relativa obtenido en EC (Figura 3.20c).

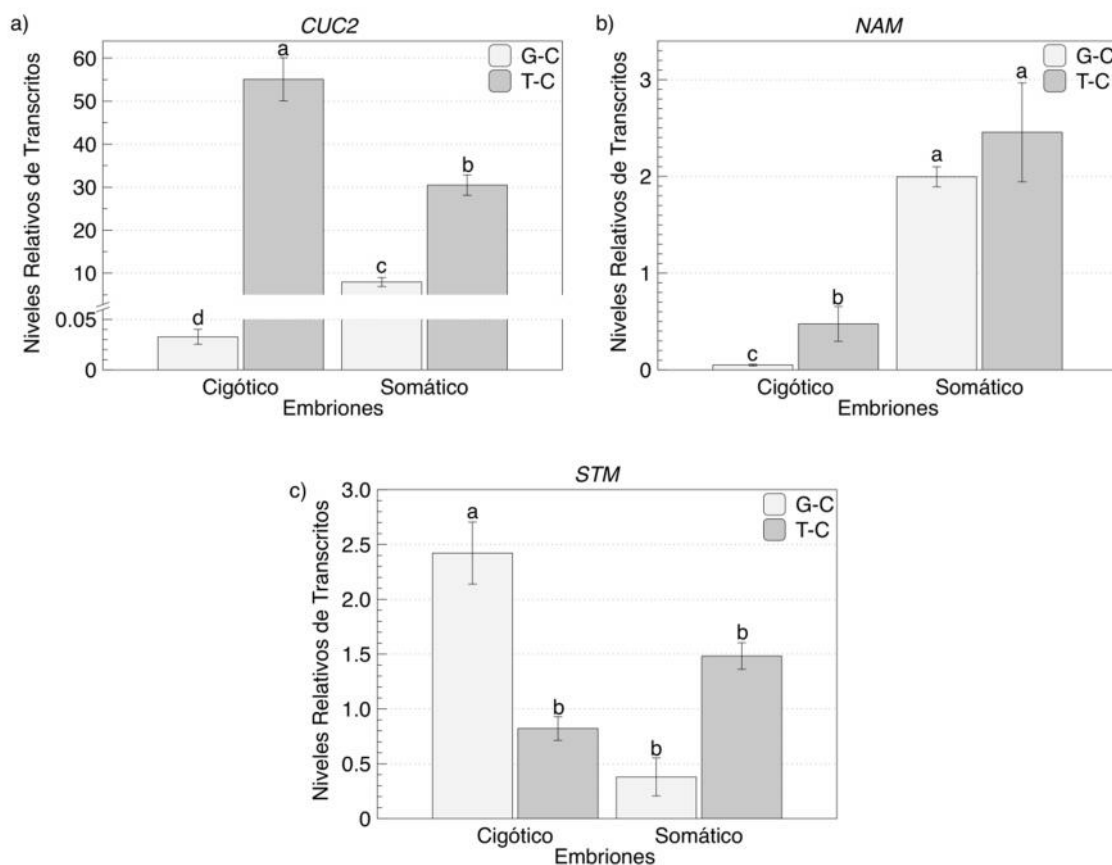


Figura 3.20 Cuantificación de los niveles de transcritos de *CUC2* (a), *NAM* (b) y *STM* (c) en embriones cigóticos y somáticos de *Capsicum chinense*. Las señales de PCR fueron normalizadas con α -tubulina. Valores son promedio \pm E.S. (n=4, p<0.05). Letras diferentes indican diferencias significativas estadísticas. G-C, etapas globular-corazón; T-C, etapas torpedo-cotiledonar.

Este gen mostró la expresión relativa más alta en ECs, en estadios tempranos de su desarrollo (G-C), mientras que la acumulación de transcritos en los estadios avanzados (T-C) del EC fue similar a la acumulación observada en ambos estadios del ES. La más baja acumulación de transcritos de *STM* se registró en ESs; sin embargo, no difirió significativamente de la acumulación de transcritos registrada en los estadios más avanzados (T-C) del EC. NAM controla la formación de límites, las mutantes *nam* tiene cotiledones fusionados, carecen del MC y mueren en la etapa de plantula (Souer *et al.*, 1996). Así mismo, el factor transcripcional *KNOX1*, *STM*, se expresa alrededor del MC regulando el número de células meristemáticas mediante señales relacionadas a *WUS* (Hay y Tsiantis 2010; Hamant y Pautot 2010; Hake *et al.*, 2004; Gallois *et al.*, 2002).

Se han identificado varias mutaciones que afectan el desarrollo del MC como de los cotiledones, lo que sugiere que sus vías genéticas se translapan. Las mutaciones en *STM* resultan en la falta de un MC y una ligera fusión de la base de los cotiledones, lo que indica que *STM* es esencial para la formación embrionaria del MC y parcialmente requerido para la separación de los cotiledones (Long y Barton, 1998; Endrizzi *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 1996; Barton y Poethig, 1993).

CAPÍTULO IV

DISCUSION

En este estudio, los patrones de expresión relativa obtenidos de los diferentes genes analizados, evidencian que los NRT acumulados de *WUS*, *PIN1* y *STM*, en ECs fueron significativamente superiores en los estadios tempranos que en estadios avanzados del desarrollo del embrión, mientras que los NRT de *STM* y de *PIN1* aumentaron significativamente en ESs en estadios avanzados de su desarrollo, contrario al patrón observado en ECs. El patrón de acumulación de transcritos de los genes *WUS*, *PIN1* y *STM*, durante el desarrollo del EC fue similar: mayor nivel de transcritos en los estadios tempranos y menor nivel hacia el final del desarrollo del embrión, probablemente debido a que estos genes están estrechamente relacionados con la determinación del MC, en numerosas especies (Gambino *et al.*, 2011; Palovaara *et al.*, 2010; Palovaara y Hakman, 2008; Breuning *et al.*, 2008; Furutani *et al.*, 2004; Haecker *et al.*, 2004; Laux *et al.*, 2004; Lenhard *et al.*, 2002; Gallois *et al.*, 2002; Laux *et al.*, 1996;). Los niveles de transcritos de *WUS* y fueron significativamente más bajos en ESs que en ECs. En un estudio previo, mostró una expresión similar a *WUS* del gen *WOX2* con una expresión baja en ESs que en ECs, así como una expresión extremadamente baja del gen *WOX1* en ESs de *C. chinense*, contrastando con la expresión de este gen en ECs (Valle-Gough *et al.*, 2015; Valle-Gough, 2015). Estos dos genes (*WUS* y *WOX2*) han sido relacionados con el establecimiento de gradientes de auxina al colocarse con *PIN1* (Zhang y Laux, 2011; Busch *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2009;), mientras que *STM* es responsable del aumento en la síntesis de citocininas mediante la inducción del gen *IPT7* (Gegas y Doonan, 2006; Yanai *et al.*, 2005). Estos genes forman parte de una red de regulación, encargada de mantener la identidad del MC mediante la homeostasis auxina/citocinina. Trabajando con otras especies, la diferencia en los NRT de *WUS* y *WOX2* ha sido relacionada con la capacidad embriogénica de los tejidos (Gambino *et al.*, 2011; Palovaara *et al.*, 2010; Palovaara y Hakman 2008). Otros reportes, han mencionado que los únicos miembros de la familia *WOX* que causan defectos perceptibles al ser silenciados o mutados, en *Arabidopsis*, son *WUS* y *WOX2* (Haecker *et al.* 2004).

Los genes *CUC/NAM* se expresan en todos los límites entre los primordios de órganos y MC de la embriogénesis temprana hasta las etapas de desarrollo floral. Mutaciones en el *NAM* de *Petunia* llevan a la fusión de cotiledones y algunos órganos florales, así como defectos severos del MC (Takada *et al.*, 2001; Aida *et al.*, 1997; Souer *et al.*, 1996). En nuestro modelo (*C. chinense*), los ESs al alcanzar los estadios torpedo y cotiledonar, muestran anomalías diversas pero con mayor frecuencia se observa embriones con los cotiledones fusionados, en forma de copa y forma de alfiler, cuyo MC no se presenta como una estructura definida ni organizada. En ES, *NAM* mostró un patrón de expresión relativa similar al patrón de expresión observado en EC; sin embargo, se acumulo mayor número de transcritos en los ES. Esto nos hace pensar que probablemente existe una deficiencia regulatoria de los *NAM* que pudiera estar repercutiendo negativamente en la activación de *STM*.

Por otro lado, la baja acumulación de transcritos de *STM* presente en ESs, contrario a lo que está ocurriendo en ECs, pudiera evidenciar la existencia de un fenómeno de represión de este gen. Según Elhiti *et al.* (2013), al reprimirse la expresión de *STM*, se afecta la formación del MC y como consecuencia, esto provoca la incapacidad del embrión para regenerar plantas normales. Por otro lado, el notable incremento de los NRT de *STM* acumulados en ESs, en los estadios más avanzados (T-C), pudiera estar relacionado con las deformaciones observadas en el MC. La expresión de *STM* durante la embriogénesis ya ha sido previamente estudiada en detalle (Long y Barton 1998; Long *et al.*, 1996). Según Gegas y Doonan (2006), las plantas en las que se ha detectado sobreexpresión de este gen (*STM*), presentan deformaciones en el MC, así como altos niveles de citocininas, alterando el balance de reguladores del crecimiento en el dominio apical. Las anomalías, observadas en las mutantes *stm* de *Arabidopsis*, pueden ser efectos indirectos resultantes de la inhibición de la proliferación celular, que en circunstancias normales son proporcionadas por un MC funcional (Elhiti *et al.*, 2013). Sin embargo, también se ha relacionado la sobreexpresión de *STM* con una mejor estructura del MC y, como consecuencia, con una mayor capacidad de los ESs para su conversión en plantas (Elhiti *et al.*, 2010). Por otro lado, los niveles de transcritos acumulados de *NAM*, a lo largo del desarrollo del ESs, superaron significativamente los NRT acumulados del mismo gen, en ECs. *PIN7*, aunque mostró el patrón de expresión esperado, se pudo observar en estadios T-C del ES, se registró una acumulación de transcritos

significativamente superior al del EC, para los mismos estadios de desarrollo (T-C). El comportamiento de *WUS* pudiera hacernos pensar que este gen no está involucrado directamente en las malformaciones del MC, en esta especie. Sin embargo, lo más sorprendente de nuestros resultados, fueron los patrones de expresión relativa obtenidos de *STM* y *PIN1* en ESs. Ambos patrones resultaron completamente opuestos al patrón de expresión obtenido en ECs. Estas son evidencias de que las alteraciones en el patrón de expresión de ambos genes puede estar provocando alteraciones importantes en el patrón de desarrollo del MC y consecuentemente, en la arquitectura del ES de esta especie (*C. chinense*). Las auxinas están estrechamente ligadas al papel de los genes en el patrón de desarrollo del MC, ya que son un regulador central de muchos procesos que operan durante el crecimiento y desarrollo de la planta. Un aspecto importante de la acción de las auxinas es su transporte direccional a través de la planta (Friml, 2003). El transporte polar de auxinas es importante en la regulación de numerosos procesos dependientes de auxina y requiere la actividad de reguladores de eflujo localizados polarmente, representados por miembros de la familia PIN-FORMED. El hecho de que se observan en *Arabidopsis* los mismos defectos en la formación de patrones en miembros de la familia de genes PIN, tales como *pin1* y la doble mutante *pin4 pin7* (Friml *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2002a; Friml *et al.*, 2002b; Liu *et al.*, 1993;), sustenta el requisito del transporte polar de auxinas dependiente de PIN para el patrón normal de embriones (Weijers *et al.*, 2005). La propagación exitosa a través de la embriogénesis somática a menudo se basa en la calidad del MC y su capacidad para convertirse en la germinación mediante la producción de brotes vigorosos. Estos requisitos previos a menudo faltan, debido a las anomalías estructurales y fisiológicas que se presentan en el MC de los embriones somáticos o embriones derivados de microesporas (Belmonte *et al.*, 2010, 2006; Kong y Yeung, 1992;). A través de un equilibrio estrechamente controlado entre la proliferación celular en la región central y la diferenciación en los dominios periféricos, el MC es responsable de la generación reiterativa de los órganos laterales superiores durante el desarrollo post-embriionario (Bowman y Eshed, 2000). La formación y el mantenimiento del MC son por lo tanto primordiales para el crecimiento normal y los estudios han revelado las redes genéticas complejas que gobiernan ambos procesos. Reportes previos sustentan que alteraciones en los niveles de transcritos de algunos de estos genes conducen a la formación de plantas con desarrollo del MC reprimido (*stm*), crecimiento discontinuo (*wus*), e incapacidad de iniciar órganos en el MC (*pin1*) (Murray *et*

al., 2012; Palovaara *et al.*, 2010a; Breuninger *et al.*, 2008; Palovaara y Hakman, 2008; Gegas y Doonan, 2006; Kieffer *et al.*, 2006; Lenhard *et al.*, 2002; Laux *et al.*, 1996). En *C. chinense*, las deformaciones más frecuentes en el MC de los ESs, son la fusión de cotiledones, forma de copa y la forma de alfiler, las cuales han sido asociadas con alteraciones del gradiente de auxinas durante el desarrollo del embrión (Palovaara *et al.*, 2010a; Su *et al.*, 2009). Análisis de las relaciones entre *PIN1*, *NAM*, *STM* y otros genes involucrados en el patrón del ápice embrionario serán importantes para una mejor comprensión de los procesos que regulan el MC y la formación de los cotiledones. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio nos permiten tener una mayor claridad sobre la implementación de nuevas alternativas para lograr la conversión de ESs de *C. chinense* en plantas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El establecimiento del MC requiere un patrón apical-basal correcto y una especificación del destino celular dependiente de la posición en el ápice del embrión. El establecimiento de un MC no funcional es uno de las causas principales que limitan la aplicación extensa de la Biotecnología. Por lo tanto, es evidente que mejorar la formación adecuada del MC *in vitro* y comprender las diferencias moleculares y fisiológicas entre el MC funcional y el defectuoso son cruciales para ampliar nuestro conocimiento sobre el meristemo y mejorar las condiciones de cultivo para desarrollar sistemas de propagación *in vitro* eficientes. Es evidente que para mejorar la formación del MC defectuoso de esta especie (*C. chinense*) *in vitro* resulta crucial conocer y comprender las diferencias moleculares y fisiológicas entre el MC funcional (cigótico) y el MC defectuoso (somático). Nuestros resultados, no solo son de gran utilidad para la especie, sino para el género *Capsicum*, el cual es reconocido como severamente recalcitrante a la regeneración de plantas *in vitro*. Nuestra principal contribución radica en darnos mayor claridad sobre la naturaleza de este fenómeno. Sin embargo, aún se requiere analizar la expresión de otros genes también fundamentales en la formación y organización del MC y en la separación de órganos; trabajar en la localización y manipulación de estos y/o de otros genes; conocer cómo se está dando el transporte de auxina, su acumulación y cuantificación, entre otros. Estos estudios apoyados en la información que existe de un amplio repertorio de mutantes y complementados con la información que se ha generado a través de proyectos del genoma, nos permitirán elucidar qué está ocurriendo en el MC del ES de *C. chinense* y si su incapacidad pudiera ser revertida.

Resultó interesante en esta especie observar el comportamiento de las poliaminas endógenas (Regla-Márquez *et al.*, 2016, Anexo), así como la respuesta de los ES deformados a la adición de algunas poliaminas al medio de cultivo durante su desarrollo. Precisamente, uno de los avances más importantes en el desarrollo de los ES de esta especie ha sido la inducción de embriones con un eje ápice-radícula armónico, de coloración verde pálida que completaron su germinación al emitir dos diminutas hojas cotiledonares, probablemente pseudo-cotiledonares, al añadir 0.1 mM de la poliamina

espermina (Spm), como fue reportado por Valle-Gough *et al.* (2015). Estos mismos autores, al analizar qué estaba ocurriendo durante la expresión de los genes *WOX*, pudieron observar que después del tratamiento con Spm el número de transcritos acumulados se incrementó significativamente y que, *WOX1* en particular, que previo al tratamiento mostró un patrón de expresión contrario al del EC, al adicionar Spm al medio de cultivo el patrón de expresión se invirtió para mostrar una acumulación de transcritos similar a la del EC (Valle-Gough *et al.*, 2015). Estos resultados despertó el interés por conocer si esta poliamina pudiera estar afectando la expresión de otros genes involucrados en la formación de un meristemo apical organizado y funcional en los ES de esta especie. En este estudio se planeó evaluar el efecto de las poliaminas sobre la expresión de los genes analizados en el trabajo de tesis, particularmente los PIN y Shoot meristem, los cuales muestran un patrón de expresión contrario al del EC. Por razones de tiempo, no se pudo evaluar. Sin embargo, dado la reversión de la morfología deformada de los ES de chile habanero al tratarlos con *Spm*, sería estratégico evaluar el efecto de las poliaminas sobre la expresión de los genes analizados en este estudio, los cuales están directamente relacionados con la formación de MC.

Estos resultados que estamos presentando, primeros de este tipo en la especie, nos acercan un poco más a la posibilidad de poder regenerar plantas normales a partir de ES de *C. chinense*.

Este anexo es el artículo publicado en:

Plant Cell, Tissue and Organ Culture (2016), 124(2), 253-264

CADAVERINE: A COMMON POLYAMINE IN ZYGOTIC EMBRYOS AND SOMATIC EMBRYOS OF THE SPECIES *Capsicum chinense* Jacq.

Autores: Carlos Fernando Regla-Márquez¹ Adriana Canto-Flick¹ Susana Alejandra Aviles-Viñas¹ Raúl Enrique Valle-Gough¹ Jacobo Pérez-Pastrana¹ Francisco Javier García-Villalobos¹ Nancy Santana-Buzzy¹

Nancy Santana-Buzzy buzzy@cicy.mx

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 # 130, Chuburná de Hidalgo, CP 97200 Mérida, Yucatán, México

ABSTRACT

The behavior of endogenous polyamines was studied in somatic embryos and zygotic embryos of Habanero pepper (*Capsicum chinense*). In the first part of the work, the polyamine content was evaluated in both types of embryos (somatic and zygotic). As a result, in addition to the common polyamines (putrescine, spermidine and spermine), it was also possible to detect cadaverine, a polyamine rarely found in plants. In general, all the polyamines were found to be more abundant in somatic embryos than in zygotic embryos, with significantly higher contents of putrescine and cadaverine. Subsequently, the content of putrescine, spermidine, spermine and cadaverine, in their different forms (free, bound and conjugated) was determined in somatic embryos which were cultured in non-ventilated and ventilated containers. Detection of polyamines was carried out at 28 and 42 days of culture by the HPLC method. The ethylene content was monitored during the process in both culture conditions (ventilated and non-ventilated). As a result of the analysis, cadaverine was always found present, indicating that it is a common polyamine in the species. Ethylene was detected in containers without ventilation throughout the

culture, except during replenishment of the culture medium (R1, R2 and R3). The behavior pattern of each polyamine, analyzed under different culture conditions (ventilated and non-ventilated) and at different moments of culture (28 and 42 days of culture), show that the polyamines are not only involved in morphogenic processes in plants; polyamines are also significantly affected by the surrounding environment. However, the most novel result, presented for the first time in this paper, is that cadaverine is found to be a common polyamine in *C. chinense* since it is present in both zygotic embryos and somatic embryos.

Keywords: Somatic embryogenesis - Polyamines - Recalcitrance - Habanero pepper

INTRODUCTION

Capsicum is a genus known to be recalcitrant to *in vitro* plant regeneration (Husain *et al.*, 1999; Binzel *et al.*, 1996; Szasz *et al.*, 1995; Arroyo and Revilla 1991; Agrawal and Chandra, 1983), by both organogenesis and somatic embryogenesis (Lecona-Guzmán *et al.*, 2012; Sanatombi and Sharma 2008; Zapata-Castillo *et al.*, 2007; López-Puc *et al.*, 2006; Santana-Buzzy *et al.*, 2006, 2005; Khan *et al.*, 2006; Buyukalaca and Mavituna, 1996; Harini and Lakshmi-Sita). Aviles-Viñas *et al.* (2013), working with *C. chinense*, reported a highly efficient and reproducible embryogenic system. However, the incapacity of SEs to convert into plants persists (Zapata-Castillo *et al.*, 2007; López-Puc *et al.*, 2006) and the causes remain unknown.

Polyamines (PAs) are low molecular weight ubiquitous nitrogenous compounds which are widely distributed in all living cells and which are essential for the processes of cell growth and differentiation (Kaur-Shawney *et al.*, 2003). The PAs are cationic molecules. The pathways of biosynthesis of PAs have been established in many organisms (Wallace *et al.*, 2003; Bagni and Tassoni 2001). Putrescine (Put), spermidine (Spd), and spermine (Spm) are linked by a common biosynthetic pathway which is originated in the decarboxylation of either ornithine or arginine to give Put, which is then aminopropylated to Spd and Spm (Antognoni *et al.*, 1998). Cadaverine (Cad) is a rare plants PA originates from decarboxylation of lysine by the action of lysine decarboxylase (Shevyakova *et al.*, 2004). PAs are related in their biosynthesis, with ethylene through S-adenosylmethionine

(SAM). The common use of SAM infers that the metabolization of said compound could be key in the regulation of both metabolic pathways.

In higher plants, the most common PAs are Spd, Spm and their diamine obligate precursor Put. They are formed by aliphatic hydrocarbons substituted with two or more amino groups. Because of their polycationic nature at physiological pH, PAs are present in the free form or as conjugates bound to phenolic acids and other low molecular weight compounds, or to proteins and nucleic acids (Childs *et al.*, 2003). Like hormones, PAs displaying high biological activity are involved in a wide array of fundamental processes in plants, such as replication and gene expression, growth and development, senescence, membrane stabilization, enzyme activity modulation and adaptation to abiotic and biotic stresses (Zapata *et al.*, 2008; Bais and Ravishankar 2002; Galston *et al.*, 1997). Although these reports mention that PAs seem to be important growth regulators, their precise physiological function and mechanism of action still remain unclear. These compounds have been shown to be involved in several aspects of plant growth and development, such as cell division and embryogenesis (Suttle 1981; Richards 1954). Though it is known that PAs, in particular Spm and Spd, interact directly with anionic, cellular components such as membranes (Agrawal and Chandra 1983) and nucleic acid (Antognoni *et al.*, 1998), they may play a more complex role in plants which might be unique to them. PAs (Put, Spd, Spm, and Cad) are now regarded as low-molecular multifunctional regulators of physiological processes. They are involved in the control of cell division and elongation, meristematic activity, morphogenesis, flowering, and plant senescence. These processes are also under hormonal control. In cultures of isolated cells, PAs can induce embryogenesis; i.e., they produce a typical “hormonal effect” (Bastola and Minocha 1995; Minocha and Robie 1986). Somatic embryos (SEs) of *C. chinense* when these were treated with Spm, cast their cotyledon leaves of tenuous green color, although they did not become plants (Valle-Gough *et al.*, 2015).

Ethylene (C₂H₄), a simple olefin, is produced during *in vitro* plant tissue culture (Finkelstein *et al.*, 1988). Production of C₂H₄ is associated with poor regeneration or recalcitrant behavior of culture materials (Mohiuddin *et al.*, 1997; Pua and Chi 1993; Chi *et al.*, 1991; Chi and Pua 1989). Ethylene exists in gaseous state under normal physiological conditions, is produced during plant tissues culture (Pua and Chi 1993; Chi *et al.*, 1991).

The role of ethylene in plant tissue culture is not clear; probably it can change the morphogenic capacity of explants *in vitro* (Biddington, 1992). The positive and negative effects of ethylene on growth and development of *in vitro* plants have been described on several crops (Santana-Buzzy *et al.*, 2006, 2005; Chraibi *et al.*, 1991; Wheeler *et al.*, 2004; Blankenship *et al.*, 1993; Chi *et al.*, 1990). Addition of chemicals as cobalt chloride or silver nitrate, that can inhibit ethylene production (Mohiuddin *et al.*, 1995; Pua and Chi, 1993; Palmer, 1992) or its function by blocking certain steps in the pathway (Pua, 1993), have been shown to be effective in overcoming the recalcitrance or in enhancing regeneration. Recently, Batista *et al.*, (2013) reported that the application of ethylene inhibitors increased the frequency of regeneration, while applying PAs decreased the level of ethylene and increased the frequency of regeneration in *C. annuum*. However, in a large number of species has no reported negative interference of this gas regulator during *in vitro* culture. Ethylene is a gaseous hormone and is involved in a wide range of biological processes (Bleecker and Kende, 2000; Abeles *et al.*, 1992). In particular, an increase in the ethylene level inhibits plant growth and induces senescence irrespective of growth and developmental stages which leads to premature death (Mayak *et al.*, 2004; Helmy *et al.*, 1994; Abeles *et al.*, 1992; Feng and Barker, 1992).

PAs and ethylene appear to be involved in a number of physiological processes of plants. The biochemical mechanisms which have been suggested to explain the biosynthetic relationships between the two pathways are the competitive demand for a limited pool of common precursor (SAM), and the feedback inhibition of enzyme action system in one pathway by the product(s) of the competing pathway. However, although it is known that SAM is the key common intermediate in the pathway, the extent of linkage between PA and ethylene pathways remains a moot point, and the significance of these mechanisms during the course of normal plant growth and development has not been demonstrated. Moreover, the requirement of PAs and ethylene in primary plant metabolism is not in question, rather it is the degree of their relationships at both the physiological and biosynthetic levels that remain unresolved (Pandey *et al.*, 2000).

The aim of this studio was to determine the composition and content of the PAs in SEs of Habanero pepper (*C. chinense*), associated with its origin (zygotic and somatic), with the moment of development, and with the *in vitro* culture conditions, and the possible

relationship with the recalcitrance of this species (*C. chinense* Jacq.) at the *in vitro* regeneration.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

Seeds of Habanero pepper, variety Mayan Ba'alché, were obtained from the germplasm bank of the Center of Scientific Research of Yucatan. *In vitro* establishment and germination was carried out according to the protocol of Santana-Buzzy *et al.* (2005).

INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS (SE)

SE was induced directly from hypocotyl segments taken from 15 day-old aseptic plants after *in vitro* germination of seeds. The hypocotyl explants were placed in MS (Murashige and Skoog, 1962) semisolid medium, supplemented with 2,4-D (9.05 μM), 30 g l⁻¹ sucrose and 2.2 g l⁻¹ gel rite for thirty days. SEs formed were transferred to a liquid medium, maintaining the same concentration of the initial medium but with the concentration of 2,4-D halved, following the protocol reported by Aviles-Viñas *et al.* (2013). The culture medium (pH 5.8) was autoclaved at 121 °C for 15 min. The explants were incubated in photoperiod 16 h light (40–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at 25 \pm 2 °C. The SEs in advanced stages were harvested, frozen with liquid nitrogen and stored at a temperature of -80 °C, until use.

EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF PAS

Extraction and hydrolysis

The explants were homogenized in 5 % (v/v) cold perchloric acid (PCA; 200 mg/ml) according to the method outlined by Tiburcio *et al.* (1986). The homogenate was kept on ice for 45 min before centrifugation at 14,000 rpm (20 min, 4°C). Both the supernatant,

containing the free and conjugated PAs, and the pellet, containing bound PAs, were mixed with an equal volume of 1 N NaOH by vortexing. After the addition of NaOH, an aliquot of 250 μl of the supernatant and the pellet suspension were mixed 1:1 (v/v) with 12 N HCl (110 $^{\circ}\text{C}$, 18 h). The solutions were filtered and mixed with 250 μl of PCA. The hydrolyzed PCA supernatant and the hydrolyzed pellet contained the PAs liberated from conjugates. The non-hydrolyzed original supernatant contained free PAs. The hydrolyzed original supernatant and the hydrolyzed pellet contained PAs which were liberated from conjugated or bound PAs, respectively.

Dansylation

All the fractions were dansylated using the method of Minocha *et al.* (1994, 1990). 250 μl of each fraction or standard was mixed with 100 μl dansylchloride (10 mg ml^{-1} in acetone) and 100 μl saturated Na_2CO_3 . The mixtures were incubated in darkness for 1 h (60 $^{\circ}\text{C}$). Excess dansyl reagent was removed by adding 50 μl of proline (100 mg ml^{-1} in H_2O) in darkness (30 min, 60 $^{\circ}\text{C}$). The dansyl-PAs were extracted in 400 μl of benzene and separated by HPLC.

Quantification by high performance liquid chromatography (HPLC)

PAs were quantified with HPLC according to the method reported by Walter and Geuns (1987), with slight modifications. Three repetitions were evaluated in 500 μl of methanol HPLC (100 %) filtered through a nylon membrane (0.45 μm) into a capped glass sample vial and stored in darkness at 5 $^{\circ}\text{C}$ until analysis. A 20 μl aliquot was used for each HPLC injection. An HPLC instrument Agilent 1100 series, equipped with a Zorbax (ODS)-C18 reversed phase column of 4.6 mm i.d. 9 250 mm, detector set at 220 and 337 nm was used and a fluorescence detector at 340 nm (excitation) and 510 nm (emission). The mobile phase was isocratic, with acetonitrile H_2O 72/28 v/v. HPLC operating conditions to determine total PAs included: 50 $^{\circ}\text{C}$ temperature, flow rate of 2 ml/min and run time of 30

min. All solvents were filtered and degassed using a 47 mm, all glass filter holder. Peak areas and retention times were measured by comparison with PA standards.

PA standards

Diaminopropane (Dap), Put, Cad, Spd, Spm were identified and quantified using standards for this compounds (Fluka, purity was 98 %). Standard curves were prepared in 100% methanol using serial dilutions of 0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1, 2mM ($r^2 = 0.998$). Quantification of unknown PAs was archived by the external standard method.

ETHYLENE MEASUREMENTS IN NONVENTILATED (NVC) AND VENTILATED CONTAINERS (VC)

To verify if there was any accumulation of ethylene inside the culture vessels and if the presence of this gas-regulator had any effect on the content of the PAs during the development of the SEs of Habanero pepper, the concentration of ethylene accumulated in the culture vessels during an experiment was monitored using Magenta boxes (Magenta™ vessel GA-7 Sigma) that allowed gas exchange with ambient atmosphere (VC) through a hole (diameter 1.0 cm) made in the lid, and covered with filter paper disk (diameter 3.0 cm) Whatman No. 41, and pore size 20–25 μm (particle retention). These were glued to the lid with silicone. At nonventilated culture vessels (NVC) were placed red silicone filter (autoclaveable) on the lid through which the sample taking of the internal atmosphere was carried out using a syringe which once removed did not permit gas exchange.



Figure 1 Non-ventilated culture vessels (NVC) and ventilated culture vessels (VC) with hypocotyl segments during the induction of somatic embryogenesis.

Both VC and NVC containers (Figure 1), the magenta box tops were autoclaved separately in a sealed container to be placed later, during culture establishment, thus it was prevented the filter paper disk pore clogging by evaporation of culture medium with the heat generated by the autoclave.

ETHYLENE MEASUREMENTS

To determine ethylene concentrations, 2-ml samples of headspace atmosphere were withdrawn from each Magenta box by means of a syringe. The ethylene was measured by gas chromatography, using a chromatograph (8690 Series II; Hewlett Packard) under the following conditions: column was a GS-Q FSOT (Alltech, 30 m L 9 0.53 mm ID), nitrogen was the carrier gas at a flow rate of 10 ml min⁻¹. Oven temperature was 70 °C; injector and detector temperatures was 200 °C. Pure ethylene was used as external standard, and retention time for ethylene peak was 2.2 min with an FID detector.

RESULTS

SOMATIC EMBRYOGENESIS

During the induction and development of SE, the formation of embryogenic structures was observed emerging directly from the interior of the hypocotyl segment, at 14 days of culture in liquid medium was possible distinguish SEs in early developmental stages (Figure 2a). At 42 days of culture in liquid medium 100 % of the SEs were in cotyledonary developmental stage (Figure 2b).



Figure 2 a Cluster of SEs in hypocotyl explant at 14 days of culture in liquid medium; **b** SEs in cotyledonar stage at 42 days of culture in liquid medium.

Figure 3 show that the ethylene was present throughout the whole culture in the NVC, except during the replanting of SEs (R1, R2 and R3), when the gasses accumulated in the culture vessel are liberated. The accumulated maximums of ethylene did not differ significantly each other. However, in R1 a significant reduction in ethylene content was registered, probably due to the change in culture conditions (solid medium to liquid medium).

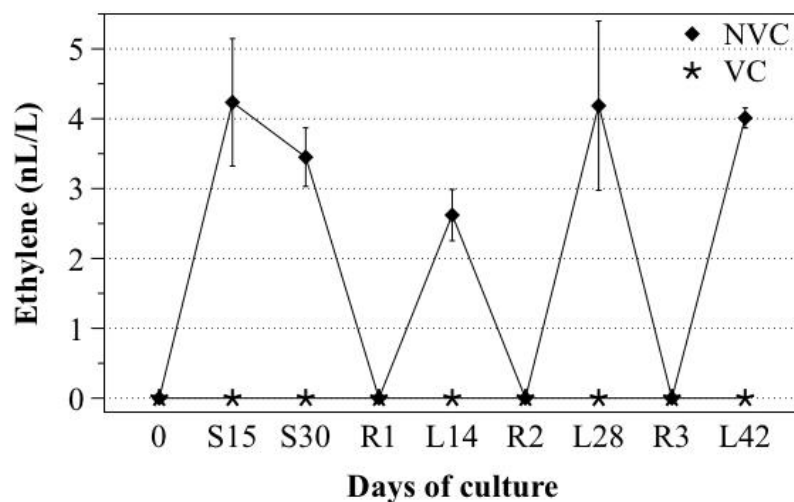


Figure 3 Ethylene concentration (nL L^{-1}) registered during the somatic embryogenesis of Habanero pepper, at different moments of the culture: 0, 15 and 30 days in semisolid medium (0, S15 and S30); 14, 28 and 42 days in liquid medium (L14, L28 and L42); subculture moments (R1, R2 and R3). Non-ventilated containers (NVC) and ventilated containers (VC).

PA CONTENT IN SEs AND ZEs

The analysis of the obtained results (Figure 4) showed that the content of the different PAs (Put, Cad, Spd and Spm) in the SEs of Habanero pepper was significantly higher than those registered for the zygotic embryos (ZEs) of this species. In both types of embryos (SEs and ZEs) the most abundant PAs were Put and Cad, respectively, although they did differ significantly. Neither Spd nor Spm were detected in ZEs. The drastic differences detected in PA content, between both types of embryos (ZEs and SEs) may be attributed to the difference in origins (sexual and somatic, respectively). However, the detection of Cad in both SEs and ZEs, is not only novel, but also allows us to confirm, for the first time, that this PA, which is quite rare in the plant kingdom, is present in the species *C. chinense* Jacq.

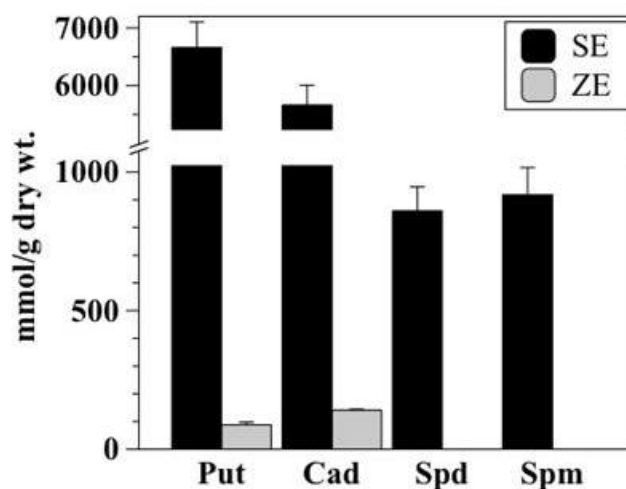


Figure 4 Total contents of putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd) and spermine (Spm) in somatic embryos (SEs) and in zygotic embryos (ZEs) of Habanero pepper.

The analysis of the PAs content, in their different forms (free, bound and conjugated) in both types of embryos (SEs and ZEs) (Figure 5), the bound form was found to be the most abundant in all the PAs analyzed, and was significantly higher in the SEs. In these embryos (SE), in the free form, Put presented the greatest abundance followed by Cad, while Spd was drastically reduced and Spm was not detected. In the conjugated form, Put and Spm were the only PAs accumulated, with a significantly higher content of Spm in the conjugated form. Cad and Spd in the conjugated form were not detected in SEs. In contrast, in ZEs, only Put and Cad were detected, both in their free and conjugated forms, at significantly low concentrations.

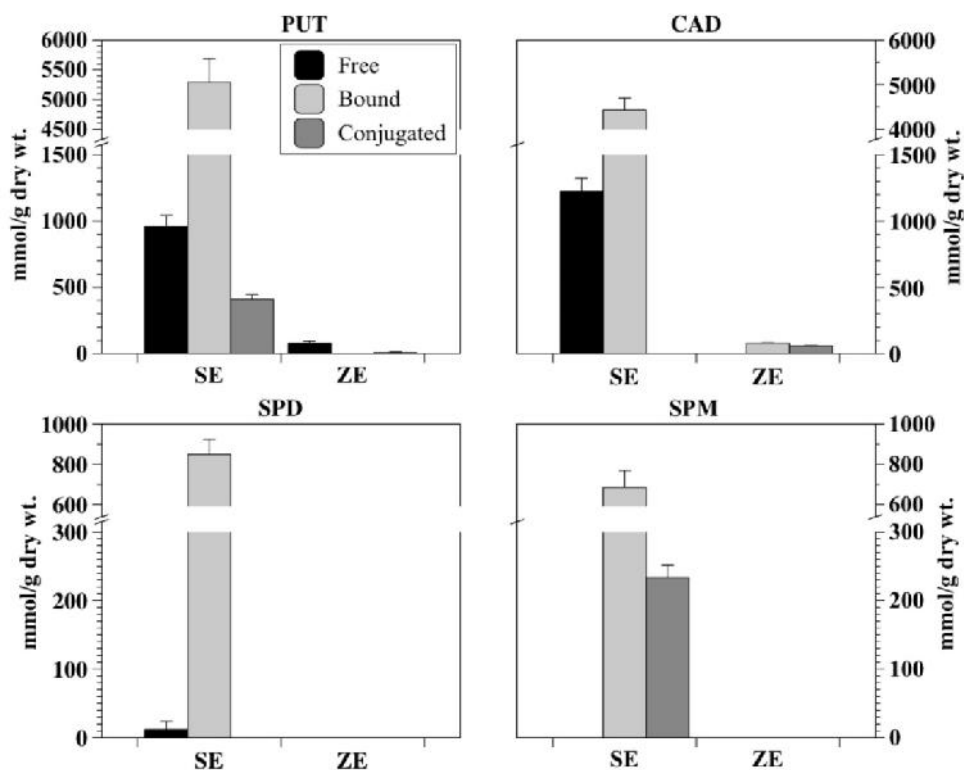


Figure 5 Content of: PUT putrescine, CAD cadaverine, SPD spermidine and SPM spermine, free, bound and conjugated, respectively, in somatic embryos (SE) and in zygotic embryos (ZE) of Habanero pepper.

EFFECT OF CULTURE PERIOD AND CULTURE CONDITIONS ON PA CONTENT IN SEs

The results show that both the period of culture (28 and 42 days) and growth conditions gave rise to a differential response in the endogenous content of PAs in SEs of Habanero pepper (Figure 6). As can be seen, with the exception of Cad, whose content was significantly higher at 28 days of culture, particularly in NVC, PA levels were higher at 42 days of culture, while the Cad content was found to diminish at 42 days of culture, mainly in NVC. In contrast, the content of Put showed an increase, which was significantly higher in SEs cultured in VC. The lowest content of PAs was found in Spd and Spm in all the treatments evaluated. At 42 days of culture, all the PAs were present in a lower concentration in NVC, except Cad. In contrast with the other PAs, the lack of ventilation in

the culture container caused a significant increase in the Cad content in the earliest stage of the culture (28 days). This behavior is probably a result of the accumulation of ethylene in the culture vessel.

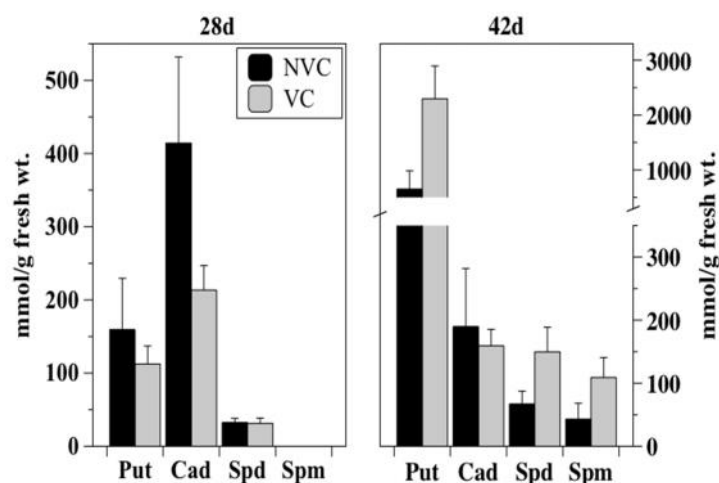


Figure 6 Content of putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd) and spermine (Spm), in non-ventilated containers (NVC) and ventilated containers (VC) in SEs of Habanero pepper, at 28 and 42 days of culture.

The Figure 7 shows the effect of the culture period (28 and 42 days) and culture conditions (NVC and VC) on the content of Put and Cad, in their different forms (free, bound and conjugated) in SEs of *C. chinense*. The behavior of Put in the SEs is presented, at 28 and 42 days of culture, in both NVC and VC (Figure 7a). As can be observed, this PA was present in all its forms in the most advanced stage of culture (42 days), the most abundant being the bound form. In the analysis of the content of free, bound and conjugated Put, in VC and NVC, it was possible to observe that this was significantly higher in SEs cultured in VC in comparison with NVC. This PA (Put) was only detected in its free form at 28 days, in SEs cultured in both NVC and VC, while in its bound form, it was only detected in NVC. Put in its conjugated form was not detected at 28 days of culture in either of the two conditions evaluated (NVC and VC). In contrast, the Cad content was always superior when the SEs were cultivated in NVC, regardless of the culture period (28 and 42 days)

(Figure 7b). In the early stage of the culture (28 days), Cad was detected in bound and conjugated forms, while at the end of the process (42 days) it was only detected in the conjugated form; it was not detected in its free form in either of the two culture conditions.

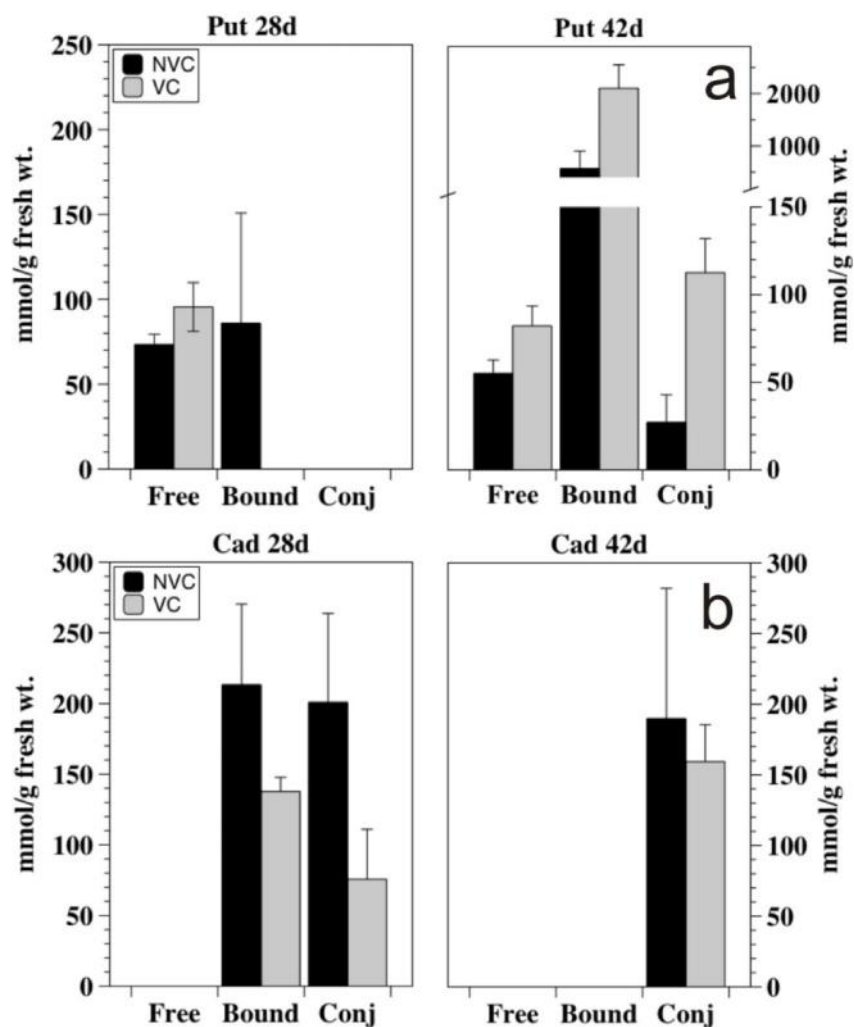


Figure 7 Content of: **a** putrescine (Put) and **b** cadaverine (Cad), in their free, bound and conjugated (Conj) forms, in somatic embryos of Habanero pepper cultured in non-ventilated containers (NVCs) and ventilated containers (VCs), at 28 and 42 days of culture in liquid medium.

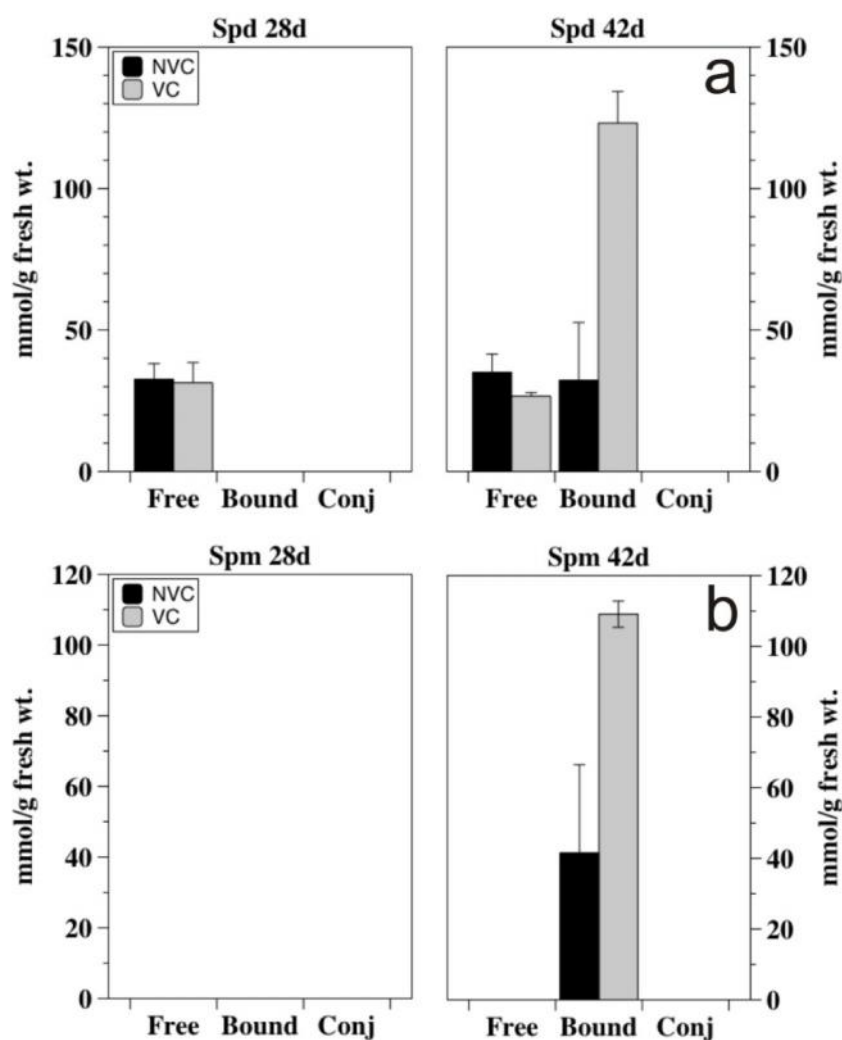


Figure 8 Content of: **a** spermidine (Spd) and **b** spermine (Spm) in their free, bound and conjugated (Conj) forms, in somatic embryos of Habanero pepper cultured in non-ventilated containers (NVC) and ventilated containers (VC), at 28 and 42 days of culture in liquid medium.

The Figure 8 shows the effect of the culture period (28 and 42 days) and culture conditions (NVC and VC) on the content of Spd and Spm in their different forms (free, bound and conjugated), in SEs of *C. chinense*. As can be seen, Spd at 28 days of culture (Figure 8a) was only present in free form, with levels similar to those registered at 42 days of culture in SEs cultured in both NVC and VC, while at 42 days of culture, this PA (Spd) was also present in bound form, in both culture conditions (NVC and VC). As can be seen, Spd in bound form, was significantly higher in the SEs cultured in VC. Spd was not detected in conjugated form in either of the two culture conditions NVC and VC, or in the culture

moments evaluated (28 and 42 days). However, Spm was only detected in bound form (Figure 8b) at the end of the culture (42 days) and, as well as with Spd, the content Spm was significantly higher in embryos arising from VC. These results show that the PAs are not only involved in morphogenic processes in plants; PAs are also significantly affected by the surrounding environment.

DISCUSSION

Capsicum is a genus of plant known as severely recalcitrant to regeneration of whole plants *in vitro*. High frequencies of abnormalities have been reported in *C. annum* (Us-Camas *et al.*, 2014; Kothari *et al.*, 2010; Aboshama 2011; Heidmann *et al.*, 2011; Steinitz *et al.*, 2003). The most critical defect of the SEs of this genus is the incapacity to convert into plants due to the absence of functional apical meristem (Aviles-Viñas *et al.*, 2013). The factor that provokes this behavior is unknown. In this context, the PAs have occupied our attention within a wide group of factors, which might be involved in the recalcitrance of the embryos to the conversion in plants. Results of our study, not only the presence of Common PAs in plants (Put, Spd and Spm) but also Cad, in both somatic and zygotic embryos of Habanero pepper. Cad has been detected in only a small number of plant species, which include a few species of the Fabacea family (Gamarnik and Frydman, 1991) and the Solanaceae family (i.e. *Nicotiana glauca*) and its presence has been associated with the alkaloids production and environmental stress (Kuznetsov *et al.*, 2006). Most studies in this field have been made with PAs putrescine family. It is well known that in the final stages of the synthesis of Spd and Spm using S-adenosyl-L-methionine (SAM), which is also a precursor to ethylene. However, cadaverina has not been studied with the same interest as the other PAs, although their synthesis is also related indirectly, to the synthesis of methionine and its derivative SAM (Shevyakova and Kir'yan, 1995; Shevyakova 1981). It has been reported that in some plants containing Cad, it has been observed unconventional behavior of this PA on ethylene (Palavan *et al.*, 1984; Strogonov *et al.*, 1972).

Cad is a diamine derived from lysine, a byproduct of the aspartate pathway of methionine synthesis (Kuznetsov *et al.*, 2002). Its synthesis from lysine is catalyzed by lysine

decarboxylase (LDC) via pyridoxal phosphate-dependent decarboxylation. Under ornithine deficiency, ODC can use lysine as an alternative substrate for Cad synthesis (Bhatnagar *et al.*, 2001). In some legume species, Cad may be produced by decarboxylation of either lysine or homo- arginine intermediate production of homoagmatine (Bagni and Tassoni, 2001). An enhanced activity of this enzyme is evidently related to the fact that *L. sativus* is a producer of piperidine alkaloids (sparteine, lupinine, anabasine, and others) from Cad. In most plant species with a low Cad concentration, the activity of LDC is low. Under stress condition, Cad accumulation in plants evidently compensates a decrease in the content of Put- family PAs (Kuznetsov *et al.*, 2002; Shevyakova *et al.*, 2001). As distinct from Put, Spm and Spd, which are synthesized on thylakoid membranes (Borrell *et al.*, 1995), Cad is produced in the chloroplast stroma (Herminghaus *et al.*, 1991). The molecular mechanisms of Cad biosynthesis were studied for tobacco plants transformed with the gene encoding LDC from the enterobacterium *Hofnia alvei*, which is capable of constitutive overproduction of the enzyme. When tobacco plants were transformed with the construct containing the gene for LSD from the enterobacterium *H. alvei* under the control of the constitutive 35S CaMV promoter, root culture was obtained with a high LDC activity and an increased level of alkaloids. Bagni and Tassoni (2001) found a direct correlation between the content of Cad and capacity for alkaloid synthesis in Solanaceae plants. Our results corroborate these reports considering that Habanero pepper has been recognized as the most pungent plant species known, for its high capsaicinoids content (alkaloids) that present their fruits.

Our results show that all PAs were more abundant in SEs than in ZEs, of Habanero pepper. However, Cad together with Put, were the most abundant PAs, significantly overcoming the control. In contrast, Spd and Spm were registered in dramatically low quantities, particularly in ZEs in which neither of these PAs were detected. This allows to infer that overproduction of Cad would result in SAM deficiency and therefore, in suppressing of Spm and Spd synthesis. Faure *et al.* (1991), who working with carrot, grape and a number of forest species, found significantly higher contents of PAs in SEs in comparison with ZE. This allows us to ensure that PAs are most abundant in the SEs in ZE. In ESs, the PAs showed more abundant in their bound form, for all PAs analyzed (Put, Cad, Spd and Spm), particularly Put and Cad, in which it was significantly higher. While, in ZEs the content of the different PAs forms was extremely low, or it was not possible to

detect. In several plant species and in different stages of development, the ratio between free and conjugated PAs could differ notably under normal growing conditions. According to some researchers (Bagni and Tassoni 2001), free PAs, Put in particular, from 50 to 90 % comprise of the total PAs content in the cell. The smaller PAs part is bound with high-molecular-weight molecules (proteins) (Martin-Tanguy 2001). In recent years, conjugated forms of PAs have attracted considerable attention as possible members of the plant defense system against stresses (Dondini *et al.*, 2003). The obtained results also proved that the behavior pattern of the PAs was affected by culture conditions. It was observed an inhibitory effect of the ethylene accumulated in the culture vessel (NVC) on the PAs, with the exception of Cad, on which the effect was the opposite. Similar results were reported by Shevyakova *et al.* (2000) who observed that ethylene treatment not only inhibited Spm synthesis, but also enhanced Cad production. Different authors (Tassoni *et al.*, 1998; Galston *et al.*, 1997) have been identified the PAs as potential components of the signal systems and the systems protecting against stress. Furthermore, the requirement of PAs and ethylene in primary plant metabolism is not in question, rather it is the degree of their relationships at both the physiological and biosynthetic levels that remain unresolved. According with Galston *et al.* (1997), the regulatory action of PAs is known to closely interact with ethylene. It has been reported that under stress conditions, PAs exert a protective effect on plant metabolism, and the interaction of PAs and ethylene in the coordination of physiological processes provokes opposite effects in plants (Galston *et al.*, 1997; Altman 1989). Kuznetsov *et al.* (2002) showed the inhibitory action of ethylene on Spd formation when treated leaves of *M. crystallinum* with exogenous ethylene. These authors observed that the contents of Spd and Put decreased, but also simultaneously induced an accumulation of Cad in isolated leaves. According to the authors, this evidence implies an ethylene-dependent induction of the synthesis of this diamine. It is likely that such an effect of PAs can be explained by stabilization of cell membranes and photosynthetic apparatus, as well as by an inhibition of various hydrolytic enzymes (Kuznetsov *et al.*, 2002). According to Kaur-Shawney *et al.* (2003), a stress-induced activation of the complete pathway of PA biosynthesis with the accumulation of Spd and Spm is observed relatively infrequently. Perhaps due the fact that, in sensitive species, stress suppresses the key enzyme of Spd and Spm biosynthesis, SAM decarboxylase (SAMDC), thus, the biosynthesis of these two PAs is retarded and Put, their precursor, accumulates actively (Kuznetsov and Shevyakova 2007). The antagonistic effects of these

two types of plant regulators (PAs and ethylene) on physiological processes may be due to the specificity of their biosynthesis. Aspartate is an early precursor of PAs and ethylene, while a common precursor, SAM, is involved in the final stage of their biosynthesis. The presence of common precursors can be a cause for reciprocal relationships between ethylene and PAs. However, it has been reported that in most plant species with a low Cad concentration in tissues, the activity of LDC is low. According to Shevyakova *et al.* (2001), under stress conditions, Cad accumulation in plants evidently compensates a decrease in the content of Put-family PAs. Batista *et al.*, (2013) researching about the influence and dynamics of the ethylene and PA on the induction of *in vitro* morphogenesis in the ornamental pepper (*C. annuum*), they concluded that both phytohormones levels may be coordinately regulated by their own concentrations and may directly affect morphogenesis in *C. annuum*. Siddikee *et al.* (2012) reported a significant increase in red pepper plant growth under salt stress when treated with ACC deaminase-producing halotolerant bacteria as compared to uninoculated controls. These results suggest that salt stress enhanced ethylene production by increasing enzyme activities of the ethylene biosynthetic pathway. Moreover, has been reported that the addition of PAs has favored embryogenic responses in different species (Ahmadi *et al.*, 2014; Kevers *et al.*, 2000; Paul *et al.*, 2009; Steiner *et al.*, 2007). In a study by Valle-Gough *et al.* (2015) on the PAs and WOX genes in the recalcitrance to plant conversion of SEs of Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) the authors evaluated the effect of different concentrations (0.01–1.0 mM) of Put, Spd and Spm. One of the most important results obtained, it was that SEs treated with 0.1 mM Spm showed harmonic apex-radicle development, pale-green coloration and the formation of two tiny cotyledonary leaves. The differential expression analysis by Real-time PCR of the WUS, WOX1 and WOX3 genes, in SEs treated with 0.1 mM Spm and untreated SEs showed an increase of the transcript levels for the three analyzed genes. However, was very interesting to observe that WOX1 gene, its transcript accumulation pattern of the SE was similar to the ZE, when the it was treated with 0.1 mM Spm. This allows to infer that Spm was a determining factor in the partial reversion of the apical meristem syndrome in Habanero pepper, although germinated embryos not developed into plants.

In other hand, our results show that the patterns (qualitative and quantitative) of the different PAs, as well as the forms in which they are present (free, bound and conjugated) were considerably affected by the origin of the embryo (zygotic or somatic), by the culture

conditions, and by the moment of the embryo development. These results confirm the hormonal function of the PAs and the fact that their biosynthesis is strongly affected by the environment surrounding. Our most important result was to have found Cad as a common PA to the species *C. chinense*. The consistently high content of this PA (Cad), could be associated with the incapacity of SEs of this species to regenerate complete plants, as well as the dramatic sensitivity of their tissue to the ethylene accumulated during the *in vitro* culture (Santana-Buzzy *et al.*, 2005).

Analyzing the progress achieved thus far related to the recalcitrance of the genus *Capsicum*, it makes us feel optimistic because we have overcome two of the four fundamental problems reported for genus *Capsicum*: (1) low efficiency, and (2) low reproducibility, of somatic embryogenesis systems, for both species of genus *Capsicum*: *C. annuum* (unpublished data) and *C. chinense* (Aviles-Viñas *et al.*, 2013). However, the situation remains critical with respect to the other two problems that limit the chilies regeneration: persistence of deformed embryos, and as consequence, negligible rate of conversion of SEs into plants. Previous reports have showed the extremely high sensitivity of *C. chinense* to ethylene (Santana-Buzzy *et al.*, 2006, 2005) and the dramatically low proteins content of the SEs in advanced development stages (Lecona-Guzmán *et al.*, 2012). In addition to these earlier diagnostics, find CAD in this species (*C. chinense*), a polyamine uncommon plants and associated with a different plant behavior pattern, it could be a prelude to the complexity that will be to reverse this persistent incapacity of Habanero pepper ESs to regenerate normal plants. In spite of progress in recent years, it still does not know much about the exact role of PAs and the enzymes involved in their biosynthesis during *in vitro* morphogenesis. Its dynamic response to changes that occur during the embryo development and in response to environment conditions, are clear evidences of the role of these molecules in development processes and their environment interactions. However, it requires deepening the knowledge of their field action in plants. The use of molecular approaches, gene cloning, production of transgenic plants and the isolation and characterization of mutants defective in the biosynthesis of PA, it will provide a better understanding of the PAs role, not only in the inability of the *C. chinense* SEs to the *in vitro* plants conversion, but also of other species of genus *Capsicum*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. y N. Chandra (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Curr. Sci.*, 52, 645-46.
- Abeles, F.B., P.W. Morgan y M.E. Saltveit (1992). Ethylene in plant biology. Academic Press, San Diego.
- Aboshama, H.M.S. (2011). Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *World Agric. Sci.*, 7(6), 755–762.
- Agrawal, S., N. Chandra y S.L. Kothary (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Mathania). *Plant Cell Tiss. Org.*, 16, 47–55.
- Ahmad, N., I. Siddique y M. Anis (2006). Improved plant regeneration in *Capsicum annuum* L. from nodal segments. *Biologia Plantarum*, 50, 701-704.
- Ahmadi, B., M.E. Shariatpanahi, M.A. Ojaghkandi y A.A. Heydari (2014). Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 118, 497–505.
- Aida, M, T. Ishida, M. Tasaka (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development*, 126:1563–1570.
- Aida, M., T. Ishida, H. Fukaki, H. Fujisawa y M. Tasaka (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *The Plant Cell*, 9, 841-857.
- Altman, A. (1989). Polyamines and plant hormones. En: Bacharach U, Heimer YM (eds) *The physiology of polyamines*, vol 2. CRC Press, Boca Ratón, pp 121–145.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Lipman (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

- Antognoni, F., S. Fornale, C. Grimmer, E. Komor y N. Bagni (1998). Long-distance translocation of polyamines in phloem and xylem of *Ricinus communis* L. plants. *Planta*, 204, 520–527.
- Antonious, G.F., T. Berke y R.L. Jarret (2009). Pungency in *Capsicum chinense*: Variation among countries of origin. *J. Environ. Sci. Health*, 44, 179–184.
- APG IV (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181, 1–20.
- Arroyo, R. y M.A. Revilla (1991). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep.*, 10, 414-416.
- Aviles-Viñas, S.A. (2007). Papel del etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 65 p.
- Aviles-Viñas, S.A, C.A. Lecona-Guzmán, A. Canto-Flick, S. López-Erosa y N. Santana-Buzzy (2013). Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid médium. *Plant Biotechnology Report*, 7, 277-286.
- Barton, M.K. y R.S. Poethig (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development*, 119, 823-831.
- Bagni, N. y A. Tassoni (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plant. *Amino Acids*, 20, 301–317.
- Bais, H.P. y G.A. Ravishankar (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 69(1), 1–34.
- Bastola, D.R. y S.C. Minocha (1995). Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*, 109, 63–71.

-
- Batista, D.S., L.L.C. Dias, A.F. Macedo, M.M. do Rego, E.R. do Rego, E.L.S. Floh, F.L. Finger y W.C. Otoni (2013). Suppression of ethylene levels promotes morphogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 49, 759–764.
- Belmonte, M., S.J. Ambrose, A.R.S. Ross, S.R. Abrams y C. Stasolla (2006). Improved development of microspore derived embryo cultures of *Brassica napus* cv Topaz following changes in glutathione metabolism. *Physiol Plant*, 127, 690–700.
- Belmonte, M., M. Elhiti, H. Ashihara y C. Stasolla (2010). Brassinolide- improved development of *Brassica napus* microspore-derived embryos is associated with increased activities of purine and pyrimidine salvage pathways. *Planta*, 233, 95–107.
- Berger, Y., S. Harpaz-Saad, A. Brand, H. Melnik, N. Sirding, J.P. Alvarez, M. Zinder, A. Samach, Y. Eshed y N. Ori (2009). The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development* 136, 823-832.
- Bhatnagar, P., B.M. Glasheen, S.K. Bains, S.L. Long, R. Minocha, C. Walter y S.C. Minocha (2001). Transgenic manipulation of the metabolism of polyamines in poplar cells. *Plant Physiol.*, 125, 2139–2153.
- Biddington, N.L. (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.*, 11, 173–178.
- Biles, J.J., C. Lebrón, A. Andrade, A. Jung, L. Rivas, C. Santacruz y G. Ullauri (2015). El chile habanero de Yucatán, en: Estudio estratégico de los mercados de Chile Habanero de la Península de Yucatán: mercado estadounidense, González, T.A. (ed.) Grupo Impresor Unicornio SA de CV, Mérida, Yucatán, México. Pp. 17-21.
- Binzel, M.L., N. Sankhla, S. Joshi y D. Sankhla (1996). *In vitro* regeneration in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) from “half- seed explants”. *Plant Growth Regul.*, 20, 287-293.
- Bosca, S., S. Knauer y T. Laux (2011). Embryonic development in *Arabidopsis thaliana*: from the zygote division to the shoot meristem. *Frontiers in Plant Science - Plant Physiology*, 2, 1-6.

BIBLIOGRAFÍA

- Blankenship, S.M., D.A. Bailey y J.E. Miller (1993). Effects of continuous, low levels of ethylene on growth and flowering of Easter lily. *Sci Hortic.*, 53, 311–317.
- Bleecker, A.B. y H. Kende (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 16, 1–18.
- Borrell, A., A. Culianez-Macia, T. Atabella, R.T. Besford, D. Flores y A.F. Tiburcio (1995). Arginine decarboxylase is localized in chloroplasts. *Plant Physiol.*, 109, 771–776.
- Boutilier, K., R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C. Liu, A. Lammeren, B. Miki, J. Custers y M. Lookeren (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14, 1737-1749.
- Bowman, J.L. y Y. Eshed (2000). Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science*, 5, 110-115.
- Buyukalaca, S. y F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, 227-235.
- Busch, W., A. Miotk, F.D. Ariel, Z. Zhao, J. Forner, G. Daum, T. Suzaki, C. Schuster, S.J. Schultheiss, A. Leibfried, B.S. Haubei, N. Ha, R.L. Chan y J.U. Lohmann (2010). Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev Cell* 18:849–861.
- Brand, U., J.C. Fletcher, M. Hobe, E.M. Meyerowitz y R. Simon (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289, 617-619.
- Breuninger, H., E. Rikirsch, M. Hermann, M. Ueda y T. Laux (2008). Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev Cell.*, 14, 867–876.
- Canto-Flick, A., E. Balam-Uc, J.J. Bello-Bello, C. Lecona-Guzmán, D. Solís-Marroquín, S. Avilés-Viñas, E. Gómez-Uc, G. López-Puc, N. Santana-Buzzy y L.G. Iglesias-Andreu (2008). Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest known cultivars. *HortScience*, 43, 1344-1349.

- Casson, S., M. Spencer, K. Walker, K. Lindsey (2005). Laser capture microdissection for the analysis of gene expression during embryogenesis of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 43: 111-123.
- Cheng, X., J. Peng, J. Ma, Y. Tang, R. Chen, K.S. Mysore y J. Wen (2012). *NO APICAL MERISTEM (MtNAM)* regulates floral organ identity and lateral organ separation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 195, 71-84.
- Chi, G.L. y E.C. Pua (1989). Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (Chinese cabbage). *in vitro*. *Plant Sci* 64, 243–250.
- Chi, G.L., D.G. Barfield, G.E. Sim y E.C. Pua (1990). Effect of AgNO₃ and aminoethoxyvinyl-glycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. *Plant Cell Rep.*, 9, 195–198.
- Chi, G.L., E.C. Pua y C.J. Goh (1991). Role of ethylene on *de novo* shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* (Lour) olsson *in vitro*. *Plant Physiol.*, 96, 178–183.
- Childs, A.C., D.J. Mehta y E.W. Gerner (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell Mol Life Sci.*, 60, 1394–1406.
- Chomczynski, P. y N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156-159.
- Chraïbi, B.K.M., A. Latche, J.P. Roustan y J. Fallot (1991). Stimulation of shoot regeneration from cotyledon of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Rep.*, 8, 415–417.
- Clark, S.E., Jacobsen S.E., Levin J.Z. y Meyerowitz E.M. (1996) The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*, 122, 1567–1575.

- Dondini, L., S. del Duca, L. Dall'Agata, R. Bassi, M. Gastaldelli, M. Della Mea, A. di Sandro, I. Claparols y D. Serafini-Fracassini (2003). Suborganellar localization and effect of light on *Helianthus tuberosus* chloroplast transglutaminases and their substrates. *Planta*, 217, 84-95.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.*, 32,1792–97.
- Edreva, A.M., V.B. Velikova y T.D. Tsonov (2007). Phenylamides in plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 289-302.
- Elhiti, M., M. Tahir, R.H. Gulden, K. Khamiss y C. Stasolla (2010). Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *J Exp Bot*, 61:4069-4085.
- Elhiti, M., O.S.D. Wally, M.F. Belmonte, A. Chan, Y. Cao, D. Xiang, R. Datla y C. Stasolla (2013). Gene expression analysis in microdissected shoot meristems of *Brassica napus* microspore-derived embryos with altered *SHOTMERISTEMLESS* levels. *Planta*, 237, 1065-1082.
- Endrizzi, K., Moussian B., Haecker A., Levin J.Z. y Laux T. (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J.*, 10, 967–979.
- Eshbaugh, W.H. (2012) Chapter 2: The taxonomy of the genus *Capsicum*. Peppers: Botany, Production and Uses. Russo, V.M. (Ed). CABI. UK. 14-18 p.
- Fári, M. y A. Andrásfalvy (1994). Regeneration and cloning of pepper (*Capsicum* sp.) *in vitro*: A review. *Hort. Sci. (Hungary)*, 26, 9-18.
- Faure, O., M. Mengoli, A. Nougarede y N. Bagni (1991). Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *J Plant Physiol.*, 138, 545–549.

- Feng, J. y A.V. Barker (1992). Ethylene evolution and ammonium accumulation by tomato plants under water and salinity stresses. Part II. *J Plant Nutr* 15, 2471–2490.
- Finkelstein, R., M. Estelle, J. Martínez-Zapater y C. Somerville (1988). *Arabidopsis* as a tool for the identification of genes involved in plant development. En: Verma, D.P.S. y R.B. Deberg (eds) *Plant gene research*. Springer, New York, pp 7–25.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jurgens (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426, 147–153.
- Friml, J., E. Benková, I. Blilou, J. Wisniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jürgens, K. Palme (2002a). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 108, 661-673.
- Friml J, Wisniewska J, Benková E, Mendgen K, Palme K (2002b). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806-809.
- Furutani, M., T. Vernoux, J. Traas, T. Kato, M. Tasaka, M. Aida (2004). *PIN-FORMED1* and *PINOID* regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development*, 131, 5021–5030.
- Gaj, M.D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43, 27-47.
- Galinha, C., H. Hofhuis, M. Luijten, V. Willemsen, I. Blilou, R. Heidstra y B. Scheres (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 449, 1053-1057.
- Gallois, J.L., C. Woodward, G.V. Reddy, R. Sablowski (2002). Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* 129, 3207-3217.
- Galston, A.W., R. Kaur-Shawney, T. Altabella y A.F. Tiburcio (1997). Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Acta Bot.*, 110, 197–207.

- Gamarnik, A. y R. Frydman (1991). Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiol.*, 97, 778–785.
- Gambino, G., M. Minuto, P. Boccacci, I. Perrone, R. Vallania, I. Gribaudo (2011). Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1089-1101.
- Gegas, V.C. y J.H. Doonan (2006). Expression of cell cycle genes in shoot apical meristems. *Plant Mol. Biol.* 60:947–961.
- George, E. (2008). Plant tissue culture procedure – background. En: *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition*, George E., Hall M y De Klerk G (eds). Springer. pp. 1-28.
- González Estrada, T.A., J.J. Biles, C. Lebrón, A. Andrade, A. Jung, L. Rivas-Burgos, C. Santacruz, G. Ullauri (2015). Estudio estratégico de los mercados de Chile Habanero de la Península de Yucatán: mercado estadounidense. CONACYT. Mérida, Yucatán 147 pp.
- Guindon, S. y O. Gascuel (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systems biology*, 52, 696–704.
- Ha, C.M., J.H. Jun y J.C. Fletcher (2010). Shoot Apical Meristem Form and function. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 103-140.
- Haak, D.C., J.L. Kostyun y L.C. Moyle (2014). Merging ecology and genomics to dissect diversity in wild tomatoes and their relatives, en: *Ecological Genomics: Ecology and the Evolution of Genes and Genomes*, Landry, C.R. y N. Aubin-Horth (eds). *Advances in Experimental Medicine and Biology* 781. Springer Science+Business Media, Dordrecht, Netherlands. pp. 273–298.
- Hadfi, K., V. Speth, G. Neuhaus (1998) Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development*, 125, 879–87.
- Hamant, O. y V. Pautot (2010) Plant development: A TALE story. *C. R. Biol*, 333, 371-381.

-
- Haecker, A., R. Grob-Hardt, B. Geiges, A. Sarkar, H. Breuninger, M. Herrmann, T. Laux (2004) Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 657-68.
- Hake, S., H.M.S. Smith, H. Holtan, E. Magnani, G. Mele y J. Ramirez (2004) The role of *KNOX* genes in plant development. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 20,125–151.
- Harada, J.J. y R.W. Kwong (2002). Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic). En: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Willey & Sons. Pag 1-7.
- Harini, I. y G. Lakshmi-Sita (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89, 107–112.
- Hay, A., H. Kaur, A. Phillips, P. Hedden, S. Hake, M. Tsiantis (2002). The gibberellin pathway mediates *KNOTTED1*-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol*, 12, 1557–1565.
- Hay, A. y M. Tsiantis (2010). *KNOX* genes: versatile regulators of plant development and diversity. *Development*, 137, 3153-3165.
- Hecht, V., J.P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog, E.D.L. Schmidt, K. Boutilier, U. Groosinklaus y S. De Vries (2001). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127, 803-816.
- Heidmann, I., B. de Lange, J. Lambalk, G.C. Angenent y K. Boutilier (2011). Efficient sweet pepper transformation mediated by the *BABY BOOM* transcription factor. *Plant Cell Rep* 30, 1107–1115.
- Helmy, Y.H., S.O. El-Abd, A.F. Abou-Hadid, U. El-Beltagy y A.S. El-Betagy (1994). Ethylene production from tomato and cucumber plants under saline conditions. *Egypt J. Hortic.*, 21, 153–160.
- Herminghaus, S., P.H. Schreier, J.E.G. McCarthy, J. Landsmann, J. Botterma y J. Berlin (1991). Expression of bacterial lysine decarboxylase gene and transport of the protein into chloroplasts of transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.*, 17, 475–486.

BIBLIOGRAFÍA

- Huang, X.L., X.J. Li, Y. Li y L.Z. Huang (2001). The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*, *Physiol. Plant.*, 113, 424-429.
- Husain, S, A. Jain y S.L. Kothari (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L.. *Plant Cell Rep.*, 19, 64-68.
- Ikeda, M., M. Umehara y H. Kamada (2006). Embryogenesis-related genes; It's expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23, 153-161.
- Irikova, T., S. Grozeva y I. Denev (2012). Identification of *BABY BOOM* and *LEAFY COTYLEDON* genes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genome by their partial gene sequences. *Plant Growth Regul.*, 67, 191-198.
- Jasinski, S., P. Piazza, J. Craft, A. Hay, L. Woolley, I. Rieu, A. Phillips, P. Hedden y M. Tsiantis (2005). KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Curr. Biol*, 15, 1560-1565.
- Jenik, P.D., C.S. Gillmor, y W. Lukowitz (2007). Embryonic Patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 23, 207-36.
- Jeong, S., M. Volny y W. Lukowitz (2012). Axis formation in *Arabidopsis* - transcription factors tell their side of the story. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 4-9.
- Jiménez, V.M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47, 91-110.
- Kakkar, R.K., P.K. Nagar, P.S. Ahuja y V.K. Rai (2000). Polyamines and Plant morphogenesis. *Biol. Plant.*, 43(1), 1-11.
- Karami, O., B. Aghavaisi y A.M. Pour (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *J. Chem. Biol.*, 2, 177-190.

- Kaur-Shawney, R., A.F. Tiburcio, T. Atabella y A.W. Galston (2003). Polyamines in plants: an overview. *J. Cell Mol. Biol.*, 2, 1–12.
- Kehie, M., S. Kumaria y P. Tandon (2012). In vitro plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili. *3 Biotech.*, 2, 31-35.
- Kehie, M., S. Kumaria y P. Tandon (2013) In vitro plantlet regeneration from cotyledon segments of *Capsicum chinense* Jacq. Naga King Chili, and determination of capsaicin content in fruits of in vitro propagated plants by High Performance Liquid Chromatography. *Scientia Horticulturae*.164, 1-8.
- Kevers, C., N. Le Gal, M. Monteiro, J. Dommès y T. Gaspar (2000). Somatic embryogenesis in *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamine and their metabolic pathways. *Plant Growth Regul.*, 31, 209–214.
- Khan H., I. Siddique y M. Anis (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annum*. *Biologia Plantarum*, 50(4), 789-792.
- Kim, S., M. Park, S.I. Yeom, Y.M. Kim, J.M. Lee, H.A. Lee, E. Seo, D. Choi (2014) Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat. Genet.* 46, 270-279.
- Kieffer, M., Y. Stern, H. Cook, C. Maulbetsch, T. Laux y B. Davies (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *The Plant Cell*, 18, 560-573.
- Kong, L., y E.C. Yeung (1992). Development of white spruce somatic embryos: II. Continual shoot meristem development during germination. *In Vitro Cell Dev Biol* 28P:125–131.
- Kothari, S.L., A. Joshi, S. Kachhwaha y N. Ochoa-Alejo (2010). Chilli peppers - A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28, 35-48.

- Kulinska-Lukaszek, K., M. Tobojka, A. Adamiok y E.U. Kurczyska (2012). Expression of the *BBM* gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 56, 389-394.
- Kumar, V., H.B. Gururaj, B.C. Narasimha, P. Giridhar y G. Ravishankar (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulturae*, 106, 237-246.
- Kumar, V., A. Sharma, B.C. Narasimha-Prasad, H.B. Gururaj, P. Giridhar y G. Ravishankar (2007). Direct shoot bud induction and plant regeneration in *Capsicum frutescens* Mill.: influence of polyamines and polarity. *Acta Physiol. Plant.*, 29, 11-18.
- Kurakawa, T., N. Ueda, M. Maekawa, K. Kobayashi, M. Kojima, Y. Nagato, H. Sakakibara y J. Kyojuka (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445, 652-655.
- Kuznetsov, V. y N.I. Shevyakova (2007). Polyamines and stress tolerance of plants. *Plant Stress*, 1, 50–71.
- Kuznetsov, V.V., V.Y. Rakitin, N.G. Sodomov, D.V. Dam, L.A. Stetsenko, N.I. Shevyakova (2002). Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 49, 120–130.
- Kuznetsov, V., N.L. Radyukina y N.I. Shevyakova (2006). Polyamines and stress: biological role, metabolism, and regulation. *Russ. J. Plant Physiol.*, 53(5), 658–683.
- Kwon, C.S., K. Hibara, J. Pfluger, S. Bezhani, H. Metha, M. Aida, M. Tasaka, D. Wagner (2006) A role for chromatin remodeling in regulation of CUC gene expression in the *Arabidopsis* cotyledon boundary. *Development*, 133, 3223-3230.
- Lau, S., D. Slane, O. Hered, J. Kong y G. Jürguens (2012). Early Embryogenesis in Flowering Plants: Setting Up the Basic Body Pattern *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63, 483-506.
- Latournerie, M. L., J.L. Chávez, M. Pérez, G. Castañón, S.A. Rodríguez, L.M. Arias, y P. Ramírez (2002). Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum*

- annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Fitotecnia Mexicana, 25, 25-33.
- Laux, T., K.F.X. Mayer, J. Berger y G. Jürgens (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122, 87-96.
- Laux, T., T. Wurschum y H. Breuning (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell* 16:S190-S202.
- Lecona-Guzmán, C.A., D. Solís-Marroquín, S. Avilés-Viñas, C. De los Santos-Briones y N. Santana-Buzzy (2012). Changes in the protein profile of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) somatic embryos during development. *Afr. J. Biotechnol.*, 11(47), 10761-10768.
- Lenhard, M., G. Jurgens y T. Laux (2002). The *WUSCHEL* and *SHOOTMERISTEMLESS* genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation. *Development*, 129, 3195-3206.
- Li Z. y D.J. Burritt (2003). Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regulation*, 40, 65-74.
- Liu, Z., W. Liu, D. Xin, L. Ji, J. Wang y F. Li (2013). GUS activity for miR165a/166b, REV, and WUS/CLV3 *in vitro* direct *Arabidopsis thaliana* shoot regeneration. *Protoplasma*, 250, 1213–1218.
- Livak, K.J. y T.D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Long, J.A. y Barton M.K. (1998). The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development*, 125, 3027-3035.
- Long, J.A., E.I. Moan, J.I. Medford y M.K. Barton (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 379:66-69.

- López-Puc, G., A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, P. Zapata-Castillo, M.C. Montalvo-Peniche, F. Barahona-Pérez y N. Santana-Buzzy (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645-1650.
- Lotan, T., M. Ohto, K.M. Yee, M.A. West, R. Lo, R.W Kwong, K. Yamagishi, R.L. Fischer, R.B. Goldberg y J.J. Harada (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93, 1195-1205.
- Mayer, K.F., H. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, Jürgens y T. Laux (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95, 805–15.
- Martin-Tanguy, J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *J. Plant Growth Regul.*, 34, 135–148.
- Mayak, S., T. Tirosh y B.R. Glick (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 42, 565–572.
- Minocha, S.C. y C. Robie (1986). The Role of 2,4-D and polyamines in somatic embryogenesis in carrot cell cultures. En: International conference polyamines in life science. Abstract, Tokio.
- Minocha, S.C., R. Minocha y C.A. Robie (1990). High-performance liquid chromatographic method for the determination of dansyl-polyamines. *J. Chromatogr.*, 511, 177–183.
- Minocha, S.C. y R. Minocha (1995). Role of polyamines in somatic embryogenesis. En Bajaj, T.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds*, Vol. 30. Berlin, Germany: Springer Verlag, pp. 55-72.
- Minocha, R., W.C. Shortle, S. Long y S.C. Minocha (1994). A rapid and reliable procedure for extraction of cellular polyamines and inorganic ions from plant tissues. *J. Plant Growth Regul.*, 13, 187–193.

- Mohiuddin, A.K.M., M.K.U Chowdhury, Z.C. Abdullah y S. Napis (1995). The influence of cobalt chloride on *in vitro* shoot proliferation in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Asian Pac. J. Mol. Biol Biotechnol., 3(4), 332-338.
- Mohiuddin, A.K.M., M.K.U. Chowdhury, Z.C. Abdullah y S. Napis (1997). Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber *in vitro* shoot regeneration. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 51, 75-78.
- Möller, B y D. Weijers (2009). Auxin Control of Embryo Patterning. Cold Spring Harb Perspect Biol, 1:a001545.
- Murashige, T, F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol Plant, 15, 473–497.
- Murray, J.A.H., A. Jones, C. Godin y J. Traas (2012). Systems analysis of shoot apical meristem growth and development: integrating hormonal and mechanical signaling. Plant Cell, 24, 3907–3919.
- Miwa, H., A. Kinoshita, H. Fukuda y S. Sawa (2009). Plant meristems: *CLAVATA3/ESR*-related signaling in the shoot apical meristem and the root apical meristem. J. Plant Res, 122, 31-39.
- Namasivayam, P. (2007). Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult., 90, 1-8.
- Oboh, G., R.L. Puntel, J.B.T. Rocha (2007). Hot pepper (*Capsicum annuum*, Tepin and *Capsicum chinense*, Habanero) prevents Fe²⁺ - induced lipid peroxidation in brain – *in vitro*. Food Chemistry, 178-185.
- Ochoa-Alejo, N. y L. Ireta-Moreno (1990). Cultivar differences in shoot forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. Sci. Hort., 42, 21-28.
- Olmstead, R.G., L. Bohs, H.A. Migid, E. Santiago-Valentin, V.F. Garcia, S.M. Collier (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. Taxon, 57(4), 1159-1181.

- Osorio-Montalvo, P.M. (2015). Análisis de la expresión de los genes *PIN1*, *PIN4* y *PIN7* durante la embriogénesis de chile hananero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 81.
- Ouakfaoui, S., J. Schnell, A. Abdeen, A. Colville, H. Labbé, S. Han, B. Baum, S. Laberge y B. Miki (2012). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Mol. Biol.*, 74, 313-326.
- Palavan, N., R. Goren y A.W. Galston (1984). Effects of some growth regulators on polyamine biosynthetic enzymes in etiolated pea seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 25, 541-546.
- Palmer, C.E. (1992). Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep.*, 11, 541-545.
- Palovaara, J. y I. Hakman (2008). Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 66:533-549.
- Palovaara, J, Hallberg H, Stasolla C, Hakman I (2010). Comparative expression patterns analysis of WUSCHEL-related homeobox 2 (WOX2) and WOX8/9 in developing seeds and somatic embryos of the gymnosperm *Picea abies*. *New Phytol.* 188:122-135.
- Pandey, S., S.A. Ranade, P.K. Nagar y N. Kumar (2000). Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. *J. Biosci.*, 25(3), 291-299.
- Paul, A., K. Mitter y S. Sen-Raychaudhuri (2009). Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L.. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 97, 303-311.
- Pérez, E., R. Ramírez, H.G. Núñez y N. Ochoa (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
- Pérez-Núñez, M.T., R. Souza, L. Sáenz, J.L. Chan, T. González, J.J. Zúñiga y C. Oropeza (2009). Detection of a *SERK*-like gene in coconut *in vitro* cultures and analysis of its

- expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Rep.*, 28, 11-19.
- Pickersgill, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica*, 96, 129–133.
- Pozo, O, S. Montes y E. Redondo (1991). Chile (*Capsicum* spp.) pp. 217-238. En: *Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México*. Ortega R, Palomino G, Castillo F, González VA, Livera M (eds.) Sociedad Mexicana de Filogenética, A.C. Chapingo, México.
- Pua, E.C. (1993). Cellular and molecular aspects of ethylene on plant morphogenesis of recalcitrant *Brassica* species *in vitro*. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 34, 191–209.
- Pua, E.C. y G.L. Chi (1993). *De novo* shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene. *Physiol. Plant*, 88, 467–474.
- Raj, R., V.D. Glint y K.N. Babu (2015) *In vitro* plant regeneration in *Capsicum chinense* Jacq. (Naga Chili). *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 3, 30-33.
- Regla-Márquez C.F., A. Canto-Flick, S.A. Aviles-Viñas, R.E. Valle-Gough, J. Pérez-Pastrana, F.J. García-Villalobos y N. Santana-Buzzy (2016). Cadaverine: a common polyamine in zygotic embryos and somatic embryos of the species *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Cell Tiss Org*, 124, 253-264.
- Richards, F.J. (1954). Potassium deficiency in relation to putrescine production. *Rapp Commun. Huitieme. Congr. Int. Bot. Paris*, 11, 1–44.
- Rupp, H.M., M. Frank, T. Werner, M. Strnad y T. Schmülling (1999). Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.*, 18, 557-563.
- Sanatombi K. y G.J. Sharma (2006) *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. *Biol Plant*. 52,141-145.

- Sanatombi, K. y G.J. Sharma (2008). *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq.. Biol. Plant., 52(3), 517–520.
- Santana-Buzzy, N, A. Canto-Flick, L.G Iglesias-Andreu, M.C. Montalvo-Peniche, G. López-Puc y F. Barahona-Pérez (2006) Improvement of *in vitro* culturing of Habanero pepper by inhibition of ethylene effects. HortScience. 41, 405-409.
- Santana-Buzzy, N, A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M.C. Montalvo-Peniche, P.Y. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldívar-Collí, O. Gutiérrez-Alonso y M.L. Miranda-Ham (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum annuum* Jacq.) via organogenesis. HortScience, 40(6), 1829-1831.
- Santana-Buzzy, N., G. López-Puc, A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, E. Balam-Uc, S. Avilés-Viñas, D. Solís-Marroquín, C. Lecona-Guzmán, J.J. Bello-Bello, E. Gómez-Uc y J.O. Mijangos Cortés (2009). Ontogenesis of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience, 44, 113–118.
- Saitou, N. y M. Nei (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biol. Ev. 4, 406-425.
- Schiavone, F.M. y T.J. Cooke (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot, developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. Cell Differ., 21, 53–62.
- Schoof, H., M. Lenhard, A. Haecker, K.F.X. Mayer, G. Jürgens y T. Laux (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell, 100, 635-644.
- Scofield, S., W. Dewitte y J.A.H. Murray (2007). The *KNOX* gene *SHOOT MERISTEMLESS* is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 50, 767-781.
- Scofield, S. y J.A.H. Murray (2006). *KNOX* gene function in plant stem cell niches. Plant molecular biology, 60, 929–946.

- Shani, E., O. Yanai y N. Ori (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 484-489.
- Sharma, P. y M.V. Rajam (1995). Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyl segments of eggplant. *J. Plant Physiol.*, 146, 658-664.
- Sharma, V.V. y J.C. Fletcher (2012). Maintenance of shoot and floral meristem cell proliferation and fate. *Plant Physiol.*, 129, 31-39.
- Shevyakova, N.I. (1981). Metabolism and physiological role of di- and polyamines in plants. *Fiziol. Rastenii.*, 28, 1052–1061.
- Shevyakova, N.I. e I.G. Kir'yan (1995). Features of methionine biosynthesis in salt-resistant cells of *Nicotiana sylvestris* L.. *Fiziol. Rastenii.*, 42(1), 94–99.
- Shevyakova, N.I., V.Y. Rakitin, D.B. Dam y V.V. Kuznetsov (2000). Cadaverine as a signal of heat shock in plants. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, 375(5), 715–717.
- Shevyakova, N.I., V.Y. Rakitin, D.B. Doung, N.G. Sodomov y V. Kuznetsov (2001). Heat shock-induced cadaverine accumulation and translocation throughout the plant. *Plant Sci.*, 161(6), 1125–1133.
- Shevyakova, N.I., M.V. Shorina, V.Y. Rakitin, L.A. Stetsenko, V.I.V. Kuznetsov (2004). Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.*, 395, 127–129.
- Shoeb, F., J.S. Yadav, S. Bajaj y M.V. Rajam (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of *Indica rice*. *Plant Sci.*, 160, 1229-1235.
- SIAP (2016). Cierre de producción agrícola por estado, Producción anual. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx. 11/11/2016.

- Siddikee, M.A., O.S. Chauhan y S.A. Tongmin (2012). Regulation of ethylene biosynthesis under salt stress in red pepper (*Capsicum annuum* L.) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase producing halotolerant bacteria. *Plant Growth Regul.* 10, 1–8.
- Solís-Ramos, L.Y, T. González-Estrada, S. Nahuath-Dzib, L.C. Zapata-Rodriguez y E. Castaño (2009). Overexpression of *WUSCHEL* in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 96, 279–87.
- Souer, E., A. van Houwelingen, D. Kloos, J. Mol y R. Koes (1996). The *NO APICAL MERISTEM* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*, 85, 159-170.
- Spinelli, S.V., A.P. Martin, I.L. Viola, D.H. Gonzalez y J.F. Palatnik (2011). A Mechanistic Link between *STM* and *CUC1* during *Arabidopsis* Development. *Plant Physiology*, 156, 1894-1904.
- Steiner, N., C. Santa-Catarina, V. Silveira, E.I.S. Floh, M.P. Guerra (2007). Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 89, 55–62.
- Steinitz, B., M. Küsek, Y. Tabib, I. Paran y A. Zelcer (2003). Pepper (*C. annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 39, 296–303.
- Steinmann, T, N. Geldner, M. Grebe, S. Mangold, C.L. Jackson, S. Paris, L. Galweiler, K. Palme y G. Jürgens (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318
- Su, Y.H. y X.S. Zhang (2009). Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. *Plant Signal & Behavior*, 4, 574-576.
- Strogonov, B.P., N.I. Shevyakova y V.V. Kabanov (1972). Diamines in plant metabolism under conditions of salinization. *Fiziol. Rastenii.*, 19, 938–943.

- Suttle, J.C. (1981). Effect of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry*, 30, 1477-1481.
- Szasz, A., G. Nervo y M. Fari (1995). Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant Physiol.*, 82, 369-374.
- Takada, S., K. Hibara, T. Ishida y M. Tasaka (2001). The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development*, 128, 1127-1135.
- Takada, S. y M. Tasaka (2002). Embryonic shoot apical meristem formation in higher plants. *J. Plant Res*, 115, 411–417.
- Takahashi, T. y J.I. Kakehi (2010). Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Annals of Botany*, 105, 1-6.
- Takeda, S. y M. Aida (2011). Establishment of the embryonic shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res*, 124, 211–219.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, y S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Tassoni, A., F. Antognoni, M. Battistini, O. Sanvido, N. Bagni (1998). Characterization of spermidine binding to solubilized plasma membrane proteins from zucchini hypocotyls. *Plant Physiol.*, 117(3), 971–977.
- Tiburcio, A.F., T. Altabella, A. Borrell y C. Masgrau (1997). Polyamine metabolism and its regulation. *Physiologia Plantarum*, 100, 664 - 674.
- Tiburcio, A.F., R. Kaur-Sawhney y A.W. Galston (1986). Polyamine metabolism and osmotic stress. *Plant Physiol.*, 82, 375–378.
- Tucker, M.R. y T. Laux (2007) Connecting the paths in plant stem cell regulation. *TRENDS in Cell Biology*, 17, 403-410.

- Tun-Dzul J. (2001). Chile Habanero y Tecnología de producción, SAGARPA-INIFAB.:5-16p.
- Ueda M. y T. Laux (2012). The origin of plant body axis. *Current Opinion in Plant Biology*, 15, 578-584.
- Us-Camas, R., G. Rivera-Solís, F. Duarte-Aké, C. De-la-Peña (2014). *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.*, 18(2), 187–201.
- Valle-Gough (2015) Análisis de la expresión de genes tipo WOX en la embriogénesis de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. pp. 94.
- Valle-Gough, R.E., S.A. Aviles-Viñas, S. López-Erosa, A. Canto-Flick, E. Gómez-Uc, L.A. Sáenz-Carbonell, N. Ochoa-Alejo, N. Santana-Buzzy (2015) Polyamines and WOX genes in the recalcitrance to plant conversion of somatic embryos of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Afr J Biotechnol*, 14, 569-581.
- Venkataiah P., T. Christopher y K. Subhash (2003). Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L.. *Journal of Plant Biotechnology*, 5(4), 245-250.
- Von Arnold S., I. Sabala, P. Bezhkov y L. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.
- Wallace, H.M., A.V. Fraser y A. Hughes (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.*, 376, 1–14.
- Walter, H. y J. Geuns (1987). High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiol.*, 83, 232–234.
- Wan H., W. Yuan, M. Ruan, Q. Ye, R. Wang, Z. Li, G. Zhou, Z. Yao, J. Zhao, S. Liu, Y. Yang (2011) Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biochem Bioph Res Co*, 416, 24-30.

- Weijers, D., M. Sauer, O. Meurette, J. Friml, K. Ljung, G. Sandberg, P. Hooykaas y R. Offringa (2005). Maintenance of embryonic auxin distribution for apical-basal patterning by PIN-FORMED-dependent auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17, 2517–2526.
- Wheeler, R.M., B.V. Peterson y G.W. Stutte (2004). Ethylene production throughout growth and development of plants. *HortScience*, 39, 1541–1545.
- Yang, X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29, 36-57.
- Yadav, J.S. y M.V. Rajam (1998). Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.*, 116, 617-625.
- Yadav, R.K., M. Perales, J. Gruel, T. Girke, H. Jönsson, G.V. Reddy (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev.*, 25, 2025-2030.
- Yanai, O, E. Shani, K. Dolezal, P. Tarkowski, R. Sablowski, G. Sandberg, A. Samach, N. Ori (2005). *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol*, 15, 1566-1571.
- Zapata, P.J., M. Serrano, M.T. Pretel, M.A. Botella (2008). Changes in the polyamine concentration induced by salt stress in seedlings of different species. *Plant Growth Regul.*, 56(2), 167–177.
- Zapata-Castillo, P.Y., A. Canto-Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz, F. Barahona-Pérez y N. Santana-Buzzy (2007). Somatic embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspension. *HortScience*, 42(2), 329-333.
- Zhang, Z y T. Laux (2011). The asymmetric division of the *Arabidopsis* zygote: from cell polarity to an embryo axis. *Sex Plant Reprod* 24:161-169.