



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el
comportamiento de los embriones somáticos de chile
habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tesis que presenta
Daniela Solís Marroquín

En opción al título de
DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



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 titulado EFECTO DEL CLORURO DE SODIO (NaCl) SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y Dra. Lourdes G. Iglesias Andreu, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, noviembre de 2011.

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, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: M. en C. Daniela Solís Marroquín

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte de los proyectos titulados 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), Obtención de variedades más productivas y más tolerantes de chile habanero a partir de la diversidad genética de la especie en Yucatán (FOMIX) bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca 204997 otorgada para la realización del doctorado después de maestría en Ciencias Biológicas: opción Bioquímica y Biología Molecular.

A mis asesoras la Dra. Nancy Santana Buzzy y Dra. Lourdes G. Iglesias Andreu quienes con su experiencia me ayudaron en mi formación como futura doctora que seré.

A mis miembros de comité tutorial y evaluadores el Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Javier Mijangos Cortés, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Guadalupe López Puc y Dra. Ma. Del Carmen Montalvo Peniche. Quienes con su criterio y conocimiento encaminaron mi tesis doctoral.

A los técnicos Adriana Canto Flick y Eduardo y a los compañeros de trabajo Carlos Alberto Lecona Guzmán, Susana Avilés Viñas, Jerico J. Bello Bello, Eunice Gómez Uc, Raúl E. Valle quienes con sus opiniones dieron sugerencias a mi trabajo.

A mi familia quienes me han apoyado siempre aún estando lejos. Juan José Solís Zavala, Ma. de Rosario Marroquín de Paz, Ma. de los Angeles Marroquín de Paz, Ivonne Berenice Ramírez Marroquín, Juan Alejandro Solís Marroquín. Dios nos proteja e ilumine siempre.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	5
1.1 El chile (<i>Capsicum</i> spp): Origen, importancia y clasificación	5
1.1.2 El chile habanero (<i>C. Chinense</i> Jacq.)	5
1.2 Morfogénesis <i>in vitro</i> del género <i>Capsicum</i>	7
1.2.1 La embriogénesis somática en plantas	12
1.2.2 La embriogénesis somática de <i>C. chinense</i> y su recalcitrancia	17
1.3 El estrés salino (NaCl) en las células vegetales	20
1.3.1 Selección <i>in vitro</i> para tolerancia a la salinidad	26
1.4. El uso del cloruro de sodio durante la morfogénesis <i>in vitro</i> (caso particular la embriogénesis somática)	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS GENERALES	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
JUSTIFICACIÓN	31
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
BIBLIOGRAFÍA	33
CAPÍTULO II	55
IN VITRO SELECTION OF A SALT TOLERANT EMBRYOGENIC LINE IN HABANERO PEPPER (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	55
2.1 ABSTRACT	56
2.2 INTRODUCTION	56
2.3 MATERIAL AND METHODS	57
2.3.1 Preparation of plant material	57
2.3.2 Induction of somatic embryogenesis	58
2.3.3 Evaluation of the effect of NaCl on SE (somatic embryogenesis) development.	58
2.3.4 Normal, deformed and dead embryos (%)	58
2.3.5 Dry weight and water contents	58
2.3.6 Germination of somatic embryos (%)	58
2.3.7 Proline determination	58
2.3.8 Determination of ion content	59
2.3.9 Protein extraction	59
2.3.10 Protein electrophoresis	59

2.3.11 DNA extraction and RAPD analysis	59
2.3.12 Data registered and Statistical analysis	60
2.4 RESULTS AND DISCUSSION	60
2.4.1 Effect of NaCl on the survival and development of somatic embryos	60
2.4.2 Behavior of dry weight and water content in SEs	62
2.4.3 Germination of SEs subjected to salt stress (NaCl)	62
2.4.4 Behavior of Proline content in SEs	63
2.4.5 Sodium and potassium content in somatic embryos under salt stress	64
2.4.6 Effect of saline stress on protein content and SDS-PAGE protein patterns of somatic embryos	66
2.4.7 RAPDs profiles in somatic embryos of Habanero pepper under stress by NaCl	69
2.5 DISCUSSION	70
2.6 ACKNOWLEDGMENTS	71
2.7 LITERATURE CITED	71
CAPÍTULO III	77
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	77
3.1 CONCLUSIONES	77
3.2 PERSPECTIVAS	78
ANEXOS	79

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Planta y fruto de la variedad Mayan Ba'alché de <i>C. chinense</i>	7
Figura 1.2 Comparación entre la morfología y desarrollo de la embriogénesis cigótica y somática (modificado de Zimmerman, 1993)	13
Figura 1.3 Diagrama esquemático del programa de desarrollo mostrandodiferentes niveles de tolerancia a la desecación en semillas de diferentes especies (modificado de Vertucci y Farrant, 1995)	14
Figura 1.4 Sección longitudinal del hipocotilo con células preglobulares (pg) originadas de células provasculares	18
Figura 1.5 Diferentess estados de desarrollo de los ESs de <i>C. chinense</i> . A, globular; B, corazón; C, torpedo; D, cotiledonar temprano; E, cotiledonar tardío.....	18
Figura 1.6 Vía general de la respuesta en plantas ante el estrés (modificado de Tuteja, 2007).....	21
Figura 1.7 Diagrama del movimiento de Na^{+1} en la planta (modificado de Apse y Blumwald., 2007).....	24
Figura 1.8 Representación esquemática de las determinantes bioquímicas y metabólicas ante la tolerancia al estrés salino (modificado de Bressan <i>et al.</i> , 2008).....	25
Figura 1.9 Diagrama metodológico.....	33
Figure 2.1 Effect of different saline concentrations on somatic embryos of <i>Capsicum chinense</i> : a) Deformed, normal and dead SEs; b) Developmental stages. Error bars indicate SE (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at $P \leq 0.05$	61
Figure 2.2 Effect of different concentrations of NaCl on: I) quality and development (3 weeks of culture); II) survival (6 weeks of culture).	61
Figura 2.3 Water content and dry weight in somatic embryos of <i>C. chinense</i> subjected to different concentrations of NaCl. Error bars indicate SE (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at $P \leq 0.05$	62
Figure 2.4 Germination of Habanero pepper somatic embryos after treatment with NaCl and transfer to germination medium (MS + GA_3 , a) 0 mM NaCl; b)	

75 mM NaCl; c) 100 mM NaCl; d) 200 mM NaCl; e) 300 mM NaCl.....	63
Figure 2.5 Germination of Habanero pepper somatic embryos from the treatment containing 100 mM NaCl.	63
Figure 2.6 Proline content in somatic embryos of <i>C. chinense</i> subjected to different concentrations (NaCl). Error bars indicate SE (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at P\0.05.....	64
Figure 2.7 SDS-PAGE profiles of proteins in somatic embryos of <i>Capsicum chinense</i> under different concentrations of NaCl, carril: 1, 0 mM NaCl; 2, 75 mM NaCl; 3, 100 mM NaCl; 4, 200 mM NaCl; 5, 300 mM NaCl.....	68
Figure 2.8 RAPD profiles of DNA extracted from somatic embryos of <i>C. chinense</i> , treated with and without salt, with the primer 06 (b). M: marcador; 1: 0 mM NaCl; 2: 75 mM NaCl; 3: 100 mM NaCl, 4: 200mM NaCl; 5: 300 mM NaCl.....	69

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Regeneración de plantas <i>in vitro</i> del género <i>Capsicum</i> (Fuente: Santana-Buzzy-et al., 2010; en prensa).....	8
Table 2.1 Sodium and potassium content in somatic embryos of <i>C. chinense</i> subjected to different concentrations of NaCl. Error bars indicate SE (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at P\0.05.....	66
Table 2.2 Variation in the protein content of somatic embryos treated with different concentrations of NaCl. Error bars indicate SE (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at P\0.05.....	67

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
AFLP	Marcador de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
AG ₃ ó GA ₃	Ácido giberélico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AtHKT1:1	Transportador de alta afinidad de potasio de Arabidopsis
BA	Benzilaminopurina
BRE	Brasinoesteróides
BSA	Albumina sérica bovina
CA	Contenido de agua
CE _e	Conductividad eléctrica
CHX	Antiportador del catión/H ⁺ de las células de la endodermis hacia el apoplasto de la estela
COR	En respuesta al frío
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
d	Días
DM	Materia seca
EDTA	Ácido tetraacético diaminoetileno
Em	Marcaje temprano con metionina
ES	Embriogénesis somáticas
ESs	Embriones somáticos
FAO	Organización de alimento y agricultura de las Naciones Unidas
FM	Materia fresca
HKT	Transportador de alta afinidad a potasio
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geográfica
ISSR	Marcador de inter secuencias simples repetidas
Kin	Cinetina
KIN	Inducidos por frío
LEA	Proteínas abundantes de la embriogénesis tardía
MS	Mushige Skoog
Nax2	Uniporte selectivo a Na ⁺ de las hojas a la raíz
NHX1	Antiportador vacuolar

NSCC	Canales de catión no selectivos
OsHKT2:1	Transportador de alta afinidad de potasio 2:1 en arroz
PAA	Ácido fenilacético
PAC	Paclobutrazol
PEG	Polietilenglicol
PI	Fósforo inorgánico
2iP	2 Isopenteniladenina
PVP	Polivinil pirrolidona
RAPD	Marcador de ADN polimórfico amplificado al azar
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
RD	Responsivos a la deshidratación
RFLP	Marcador de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
S	Coefficiente de sedimentación
SDS	Sulfato duodecil de sodio
SOS1	Proteína sensible a la sal 1 (antiportador)
TDZ	Tidiazuron

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (0, 75, 100, 200 y 300 mM) durante el proceso de la embriogénesis somática de *C. chinense*. Primero se evaluó la sobrevivencia de los embriones somáticos a los 30 días en el medio de cultivo, en diferentes dosis de sal, se obtuvo el 76% y el 46% de sobrevivencia para las concentraciones 75 y 100 mM de NaCl, respectivamente. El efecto selectivo causado por el NaCl ejerció una reducción del 22% de los embriones somáticos deformados en el tratamiento de 100 mM de NaCl. Se produjo un efecto desfavorable en el desarrollo de los embriones somáticos con 200 y 300 mM de NaCl, al permanecer en el estadio globular. Por otro lado, que con 75 mM hubo mayor proporción de embriones somáticos en estadios torpedo y cotiledonar, a diferencia de los de 100 mM donde la mayor parte de los embriones somáticos estuvieron en estadios globulares y cotiledonares. El contenido de agua de los embriones somáticos disminuyó al incrementar la concentración de NaCl y el peso seco aumentó conforme la concentración de NaCl se incremento en el medio de cultivo. Los embriones somáticos mostraron una germinación proporcional en tamaño a la concentración de 100 mM y la mejor germinación fue a 200 mM. El contenido total de proteínas, así como el de prolina incrementó conforme se aumenta la concentración de NaCl. El perfil cualitativo de proteínas también se modificó, detectándose un mayor número de bandas electroforéticas. En el análisis de un marcador molecular de tipo ADN polimórfico amplificado al azar sólo un cebador (OPK6) mostró la pérdida de dos bandas en la línea embriogénica tolerante a la salinidad (100 mM NaCl) comparada con el control. Estos resultados sugieren que los embriones somáticos pueden tolerar concentraciones por arriba de 100 mM de NaCl sin que su desarrollo sea afectado. Esto es porque ellos tuvieron suficientes mecanismos celulares para tolerar niveles relativamente altos a la salinidad.

ABSTRACT

In this paper we studied the effect of different concentrations of NaCl (0, 75, 100, 200 and 300 mM) during the process of somatic embryogenesis of *C. chinense*. First the survival of the somatic embryos was assessed at 30 days in the culture medium, different dose of salt, was obtained 76% and 46% of survival for the concentrations 75 and 100 mM NaCl, respectively. The selective effect caused by the NaCl was a reduction of the 22% deformed somatic embryos in the treatment of 100 mM NaCl. There was an unfavourable development of the somatic embryos effect, in the concentrations of 200 and 300 mM NaCl, to stay at the globular stage. On the other hand, 75 mM NaCl had higher proportion of SEs in stages torpedo and cotyledonar, as opposed to the 100 mM NaCl, where the most somatic embryos were globular stages and cotyledonaries. The water content of the somatic embryos has decreased by increasing the concentration of NaCl and dry weight increased as the concentration of NaCl was increased in the culture medium. The somatic embryos showed proportional germination in size to the concentration of 100 mM and the best germination was to 200 mM. The total content of proteins, as well as proline increased compliance increases the concentration of NaCl. Qualitative protein profile was also amended, detecting a great number of electrophoretic bands. In the analysis of a molecular marker of random amplificate polymorphic DNA type only a primer (OPK6) showed the loss of two bands on the embryogenic line tolerant to salinity (100 mM NaCl) compared to the control. These results suggest that somatic embryos of *C. chinense* can tolerate concentrations of NaCl up to 100 mM without their development being affected. Moreover, they have sufficient cellular mechanisms to tolerate salinity at relatively higher levels.

The first part of the report is a general introduction to the subject of the study. It discusses the importance of the study and the objectives of the research. The second part of the report is a detailed description of the methodology used in the study. This includes a discussion of the data collection methods, the sample size, and the statistical analysis techniques used. The third part of the report is a discussion of the results of the study. This includes a comparison of the results with the objectives of the study and a discussion of the implications of the findings. The fourth part of the report is a conclusion and a list of references.

INTRODUCCIÓN

La salinidad del suelo es un problema que se incrementa año con año en regiones áridas y semiáridas del mundo como consecuencia de la disminución de las precipitaciones de agua de lluvia, el mal manejo de agua de riego y el exceso de fertilizantes aplicados a los cultivos. Recientemente fue reportada la conductividad eléctrica de los suelos de Yucatán (con valores de 0.75 – 3.2 dS/m), los cuales por su alto nivel de cloro y sodio disuelto en el agua subterránea, resultan poco recomendados para la agricultura (Delgado, 2010).

Chile habanero, por ser una especie emparentada con *Capsicum annuum*, es considerada una especie susceptible a la salinidad (Chinnusamy, 2005). Debido a la importancia de este cultivo en la península de Yucatán y por las características organolépticas del fruto, resulta un modelo de mucho interés para diferentes tipos de estudios, dentro de los cuales se encuentra la obtención de líneas tolerantes a la salinidad. Debido a que la calidad de agua de riego en Yucatán corre el riesgo de una alta salinización, se hace necesario contar con un modelo (como la embriogénesis somática) que permita estudiar el efecto de este estrés de manera preliminar antes de ser evaluado en campo.

Actualmente se cuenta con un protocolo de embriogénesis somática altamente eficiente y reproducible; sin embargo, aún presenta problemas por el alto índice de deformación de los embriones y su baja conversión a plantas. Este comportamiento es reconocido como recalcitrancia a la morfogénesis. Existen evidencias de que el estrés fisiológico es uno de los factores que está involucrado en la recalcitrancia (Benson, 2000). El ambiente *per se* constituye un estrés fisiológico que provoca respuestas diversas durante la morfogénesis *in vitro*. Se ha reportado que la aplicación de cloruro de sodio puede favorecer la producción de embriones somáticos, así como su maduración y desecación o, por el contrario, podría provocar inhibición del crecimiento del embrión (Binh y Heszky, 1990, Kikuchi *et al.*, 2006 y Bliss *et al.*, 1986, respectivamente).

El cultivo *in vitro* se utiliza ampliamente como una herramienta muy útil para evaluar el efecto de la salinidad en diversas especies vegetales (Queirós *et al.*, 2007; Davenport *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2004; Tal, 1994; Unnikrishnan *et al.*, 1991). Una estrategia de

selección *in vitro* consiste en adicionar en un paso una determinada concentración de sales en el cultivo *in vitro* en un corto periodo de tiempo. Esto con el fin de evaluar el efecto que tiene dichas sales sobre los embriones somáticos. Así mismo, la detección de variantes en los niveles de ADN es de suma importancia para el uso de líneas seleccionadas *in vitro* en el mejoramiento de un cultivo. Las variantes pueden tener bases genéticas o epigenéticas, y su temprana identificación es de suma importancia (Al-Naggar et al., 2008). Es por ello que entre las diferentes técnicas moleculares, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) confirma ser la más usada para el estudio de variación en los niveles de ADN de los tratamientos (Rout et al., 1998; Soniya et al., 2001 and Bennici et al., 2003). Sin embargo, a pesar del éxito relativo de la selección “*bajo presión*” a partir de células de plantas superiores, para diferentes condiciones de estrés, la información existente sobre la base genética y los mecanismos que regulan la variación observada, aún es escasa. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el comportamiento de los embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante su desarrollo *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Naggar A.M.M., Saker M.M., Shabana R., Ghanem S.A., Reda A.H. and Eid S.A. (2008). *In vitro* selection and molecular characterization of salt tolerant canola plantlets. *Arab J. Biotech.*, 11 (2): 207-218.
- Bennici, A., Anzidei, M. and Vendramin, G.G. (2003). Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryo-genesis. *Plant Sci.* 33: 1-7.
- Benson, E. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance *in vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 141-148.
- Binh, D.Q. and Heszky, L.E. (1990). Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. *J. Plant Physiol.* 136: 336.

Bliss R, D; PLATT-ALOIA K. A & THOMSON W. W. (1986). The inhibitory effect of NaCl on barley germination. *Plant, Cell and Environment* . 9: 727-733.

Chinnusamy Viswanathan, Jagendorf Andre, Zhu Jian-Kang (2005). Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Sci.* 45:437–448.

Davenport, S.B., Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L. (2003). Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. - *Plant Growth Regul.* 40: 81-88.

Delgado Carranza Ma. del Carmen (2010). Zonificación agroecológica del estado de Yucatán con base en índices agroclimáticos y calidad agrícola del agua subterránea. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. 161 pp.

Kikuchi Akira, Sanuk Nobuya, Higashi Katsumi, Koshiba Tomokazu and Kamada Hiroshi. (2006). Absciscic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta.* 223: 637–645.

Gu, R., Liu, Q., Pei, D., Jiang, X. (2004). Understanding saline and osmotic tolerance of *Populus euphratica* suspended cells. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 78: 261-265.

Munns, R.(2002). Comparative physiology of salt and water stress *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.

Queirós F., Fidalgo F., Santos I. and Salema R (2007). *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* 51 (4): 728-734.

- Rout, G.R., Das, P. and Raina, S.N. (1998). Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 23-27.
- Soniya, E.V., Banerjee, N.S. and Das, M.R. (2001). Genetic analysis of somaclonal variation among callus derived plants of tomato. *Current Science*, 80 (9): 1213-1215.
- Tal, M. (1994). *In-vitro* selection for salt tolerance in crop plants - theoretical and practical considerations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*: ITRO, 175-180.
- Unnikrishnan S K., Prakash L., Josekutty P. C., Bhatt P. N. and Mehta A. R. (1991). Effect of NaCl Salinity on Somatic Embryo Development in *Sapindus trifoliatus* L... *Journal of Experimental Botany*. 42 (236): 401-406.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El chile (*Capsicum spp*): Origen, importancia y clasificación

Todos los chiles pertenecen al género *Capsicum* de la familia Solanaceae. Existen alrededor de 27 especies de *Capsicum* pero solo cinco han sido domesticadas: *C. annuum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* Linné y *C. pubescens* Ruiz y Pavón (López-Puc *et al.*, 2006). Barbara Pickersgill (1984) ha propuesto que las cinco variedades de chile son originarias de las montañas del sur de América, al oeste de Brasil, por el este de Bolivia y Paraguay y al norte de Argentina.

Los integrantes de este género contienen numerosos fitoquímicos incluyendo compuestos volátiles, ácidos grasos, capsaicinoides, carotenoides, vitaminas, proteínas, fibras y elementos minerales (Bosland y Votava, 2000). Recientes estudios han demostrado un efecto anticancerígeno y antimutagénico en los extractos de chile (de Mejía *et al.*, 1998; Maoka *et al.*, 2003).

La clasificación taxonómica del chile es la siguiente: Clase: Angiosperma, Subclase: Dicotyledonea, Superorden: Sympetala, Orden: Tubiforales, Familia: Solanaceae, Género: *Capsicum*.

1.1.2 El chile habanero (*C. chinense* Jacq.)

Capsicum chinense es una especie nativa del Amazonas, y proveniente de las Antillas fue introducida a la península de Yucatán, a través de Cuba (Zarco Padrón de Coronado, 2004).

El chile habanero es una planta de ciclo anual, pudiendo alcanzar hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico. Su altura es variable entre 75 y 120 cm. Las semillas son lisas, ovaladas, y pequeñas (2.5 a 3.5 mm) tienen testa de color café claro a

café oscuro y su periodo de germinación varía entre ocho y quince días. Tiene 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; puede alcanzar longitudes mayores a los 2 m. Su tallo es grueso, erecto y robusto y generalmente tiene tendencia a formar tres tallos en la primera ramificación, la que ocurre entre la décima y duodécima hoja, para después continuar bifurcándose, con un crecimiento semi-indeterminado; después de la primera trifurcación muy raramente las tres ramas alcanzan el mismo desarrollo. Las hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable 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 también depende de la variedad. Con una nutrición adecuada las hojas pueden alcanzar un tamaño superior a los 15 cm de longitud y ancho. Las flores son de color blanco; su tamaño varía entre 1.5 y 2.5 cm de diámetro de la corola; estos órganos se emiten en cada ramificación y se pueden presentar racimos hasta de seis flores, dando lugar a un promedio de tres frutos. El número de sépalos y pétalos también es variable (de cinco a siete) aún dentro de la misma especie, lo mismo que la longitud del pedúnculo floral. Los frutos se clasifican como una baya poco carnosa; son huecos y tienen tres lóculos; las semillas se alojan en placentas blancuzcas y secas, que no están envueltas por mucosa, y las membranas de los lóculos generalmente no se prolongan hasta el centro. Suelen ser de tamaño de 4.49 cm de largo y 3.62 cm de ancho. El chile habanero ha experimentado un sustancial incremento en la demanda internacional y doméstica. La superficie de cultivo del estado de Yucatán es cercana a las 400 ha y los rendimientos varían entre 8 y 12 ton/ha en suelos pedregosos del norte, y de 10 a 15 ton/ha en suelos mecanizados del sur (González-Estrada *et al.*, 2006).

En condiciones de invernadero el rendimiento es de 3.11 kg de frutos/ planta, y el color del fruto es naranja para la variedad Mayan Ba'alché (Figura 1.1).



Figura 1.1 Planta y fruto de la variedad Mayan Ba'alché de *C. chinense*.

1.2 Morfogénesis *in vitro* del género *Capsicum*

El cultivo de tejidos es una de las herramientas clave de la biotecnología vegetal, la cual permite explotar la naturaleza totipotente de las células vegetales. Este es un concepto propuesto por Haberlandt en 1902 y significa que las células vegetales tienen los mecanismos fisiológicos y genéticos necesarios para regenerar la planta completa en condiciones asépticas. A partir de una sola célula aislada la morfogénesis permite la regeneración de plantas a partir de células, tejidos y de órganos, y es un proceso fundamental en la aplicación de la biotecnología vegetal para la propagación y la mejora genética (Haberlandt, 1902).

En la actualidad existen numerosos reportes de procedimientos para inducir la formación *in vitro* de brotes de *Capsicum* (Gunay y Rao, 1978; Phillips y Hubstenberger, 1985; Agrawal *et al.*, 1989; Ochoa Alejo y Ireta-Moreno, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Christopher y Rajam, 1994; Szasz *et al.*, 1995; Christopher y Rajam, 1996; Ramírez-Malagon y Ochoa-Alejo, 1996; Venkataiah *et al.*, 2003; Anilkumar y Nair, 2004; Khan *et al.*, 2006; Peddaboina *et al.*, 2006). Algunos reportes sugieren una fuerte influencia del genotipo

sobre los procesos de regeneración (Ochoa-Alejo y Ireta-Moreno, 1990; Szasz *et al.*, 1995; Christopher y Rajam, 1996; Ramirez-Malagon y Ochoa-Alejo, 1996). La organogénesis también ha sido reportada por diversos autores (Gunay y Rao, 1978; Fari y Czako, 1981; Agrawal y Chandra, 1983; Phillips y Hubstenberger, 1985; Arroyo y Revilla, 1991; Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992; Ezura *et al.*, 1993; Büyükalaca y Mavituna, 1996; Binzel *et al.*, 1996a; Binzel *et al.*, 1996b), y la embriogénesis somática se ha reportado con menor frecuencia (Harini y Sita, 1993; Büyükalaca y Mavituna, 1996; Binzel *et al.*, 1996a; Binzel *et al.*, 1996b; Jo *et al.*, 1996; Kintzios *et al.*, 2001; Steinitz *et al.*, 2003). Sin embargo, todos los reportes se han realizado sólo en *Capsicum annuum*, y más recientemente en *Capsicum chinense*. En el Cuadro 1.1 se muestran los reportes sobre regeneración de plantas *in vitro* del género *Capsicum*.

Cuadro 1.1 Regeneración de plantas *in vitro* del género *Capsicum* (Fuente: Santana-Buzzy-*et al.*, 2010; en prensa).

Especie	Explante	Sistema de regeneración	RCV	Referencias
<i>C. annuum</i>	Hipocotilo	Organogénesis	BA+AIA	Gunay y Rao (1978)
<i>C. frutescens</i>	Cotiledón			
<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos	Oganogénesis	BA	Agrawal y Chandra (1983)
<i>C. annuum</i>	Plántulas	Organogénesis	BA	Phillips y Hubstenberger (1985)
<i>C. annuum</i>	Hipocotilo, cotiledón, tallo, hoja, raíz, ápice, embrión	Organogénesis	BA+AIA	Agrawal <i>et al.</i> (1989)
<i>C. annuum</i>	Hipocotilo	Organogénesis	AIA, 2iP	Ochoa-Alejo y Ireta-Moreno (1990)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón,	Organogénesis	AB+AIA	Arroyo y

<i>C. annuum</i>	hipocotilo Hipocotilo	Organogénesis	AIA, BA	Revilla (1991) Valera- Montero y Ochoa-Alejo (1992)
<i>C. annuum</i>	Plántulas	Organogénesis	BA+ANA	Ebida y Hu (1993)
<i>C. annuum</i>	Semillas maduras	Organogénesis	MS sin RCV	Ezura et al. (1993)
<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis somatic indirecta	10% CA, 2,4-D	Harini y Lakshmi Sita (1993)
<i>C. annuum</i>	Ápice	Meristemo axilar	BA	Madhuri y Rajam (1993)
<i>C. annuum</i> <i>C. praetermissum</i>	Ápice	Meristemo axilar	BA	Christopher y Rajam (1994)
<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogenesis somática indirecta	2,4-D	Buyukalacay Mavituna (1996)
<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos inmaduros	Embriogénesis somática directa	2,4-D, TDZ	Binzel et al. (1996)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA, AIA+AgNO ₃	Hyde y Phillips (1996)
<i>C. annuum</i> <i>C. praetermissum</i> <i>C. baccatum</i>	Hipocotilo, cotiledón, hoja	Organogénesis	BA+AIA	Christopher y Rajam (1996)
<i>C. annuum</i>	Hipocotilo	Organogénesis	AIB	Ramírez- Malagón y Ochoa-Alejo (1996)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA, AIA+BRE	Franck- Duchenne et al. (1998)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA+PAA	Husain et

<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos	Organogénesis	BA+ANA	<i>al.</i> (1999) Arous <i>et al.</i> (2001)
<i>C. annuum</i>	Plántulas, explantes embriogénicos	Organogénesis	TDZ	Dabauza y Pena (2001)
<i>C. annuum</i>	Hoja cotiledonar	Organogénesis	TDZ	Venkataiah <i>et al.</i> (2003)
<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos	Embriogénesis somática	2,4-D, centrofenoxina	Steinitz <i>et al.</i> (2003)
<i>C. annuum</i>	Hoja, meristemo	Organogénesis	BA, AIA+(AgNO ₃), ácido bezóico	Kumar <i>et al.</i> (2005)
<i>C. annuum</i>	Microsporas	Embriogénesis somática	2,4-D,	Bárány <i>et al.</i> (2005)
<i>C. annuum</i>	Hipocotilos	Embriogénesis somática	TDZ, AIB	Khan <i>et al.</i> (2006)
<i>C. annuum</i>	Anteras	Embriogénesis somática	2,4-D, AIA	Koleva-Gudeva <i>et al.</i> (2006)
<i>C. annuum</i>	Segmentos de nudo y plántulas	Organogenesis	TDZ	Ahmad <i>et al.</i> (2006)
<i>C. chinense</i>	Meristemas	Crecimiento de ápices	Osmoreguladores (mannitol y sorbitol)	Montalvo-Peniche <i>et al.</i> (2007)
<i>C. chinense</i>	Hoja, cotiledón hipocotilo, embriones cigóticos	Embriogénesis somática	2,4-D	López-Puc <i>et al.</i> (2006)
<i>C. frutescens</i>	Ápice	Proliferación axilar	BA+Kin	Sanatombi y Sharma (2007)
<i>C. annuum</i>	Cotiledones	Organogénesis	BA+PAA	Joshi y Kothari (2007)
<i>C. annuum</i>	Hojas, cotiledones,	Organogénesis	BA+AIA	Sanatombi y

<i>C. frutescens</i>	hipocotilo				Sharma (2008)
<i>C. chinense</i>					
<i>C. chinense</i>	Hoja, cotiledones, hipocotilo, embrones cigóticos	Embriogénesis somática indirecta	2,4-D		Zapata-Castillo et al. (2007)
<i>C. chinense</i>	Hipocotilo	Embriogénesis somática y análisis histológico	2,4-D		Santana-Buzzy et al. (2009)
<i>C. chinense</i>	Segmentos de nudo de plántulas	Organogénesis directa, brotes múltiples	TDZ+PAC		Bello-Bello et al. (2010)

*RCV's: Reguladores de Crecimiento Vegetal, BA: 6-benzilaminopurina, IAA: ác. indol-3-acético, 2iP: 2 isopenteniladenina, NAA: ácido1-naftalenacético

Capsicum es una planta muy versátil, pero carece de un sistema de regeneración *in vitro* que sea reproducible y eficiente. La incapacidad de los explantes de chile a la regeneración sugiere su naturaleza morfogénica recalcitrante, mientras que los otros miembros de las Solanáceas, tales como la patata, tomate, tabaco y petunia, con frecuencia se han utilizado como modelo en los sistemas de cultivo de tejidos. A pesar de ello, se ha realizado un conjunto de trabajos de investigación para explorar su potencial morfogénico a fin de lograr un sistema de regeneración apropiado para *Capsicum*. Morrison et al. (1986), Fari (1981), Ezura (1997), Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagon (2001) y Kothari et al. (2009) han publicado revisiones donde se puede apreciar los avances alcanzados en esta planta. La regeneración de las especies de *Capsicum* es severamente limitada debido a la extrema recalcitrancia de este género a la manipulación *in vitro* de sus explantes (Franck-Duchenne et al., 1998; Steinitz et al., 1999; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001).

Recientemente se han realizado los primeros reportes de regeneración *in vitro* de *C. chinense*, tanto a través de la organogénesis (Santana-Buzzy et al., 2005, 2006; Montalvo-Peniche et al., 2007; Bello-Bello et al., 2010) como por embriogénesis somática, directa e indirectamente (López-Puc et al., 2006; Zapata-Castillo et al., 2007; Santana-Buzzy et al., 2009). Más recientemente se estableció por el mismo grupo (Avilés-Viñas,

2007) un sistema de embriogénesis somática directa en medio líquido, altamente eficiente.

1.2.1 La embriogénesis somática en plantas

La embriogénesis somática (ES) es la vía morfogenética por la cual las células somáticas desarrollan estructuras similares al embrión cigótico (es decir con la bipolaridad y que no están conectados vascularmente con el explante). La ES pasa por una serie de estadios cronológicamente característicos sin fusión de gametos (Santana *et al.*, 2010, en prensa), lo que permite hacer un estudio del desarrollo del embrión somático.

De los sistemas de propagación *in vitro* existentes, la embriogénesis somática ofrece la ventaja de reducir el tiempo de multiplicación y sirve como un sistema eficiente para propagar y regenerar plantas con una alta uniformidad genética. Es además, un modelo de estudio de eventos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares que ocurren durante el inicio y desarrollo de la embriogénesis somática en plantas.

En la Figura 1.2, se ilustran las semejanzas y diferencias entre embriogénesis somática y cigótica. En dicha imagen se muestra cómo se da el desarrollo del embrión morfológica y espacialmente, para cada caso. También se aprecia cómo la histogénesis es similar en ambos casos; desde la formación del estadio globular hasta el cotiledorario. La variación entre la embriogénesis cigótica y somática se encuentra en los procesos de maduración durante el cual se da la síntesis de proteínas de reserva, seguida por la preparación de la desecación y dormancia de los embriones cigóticos.

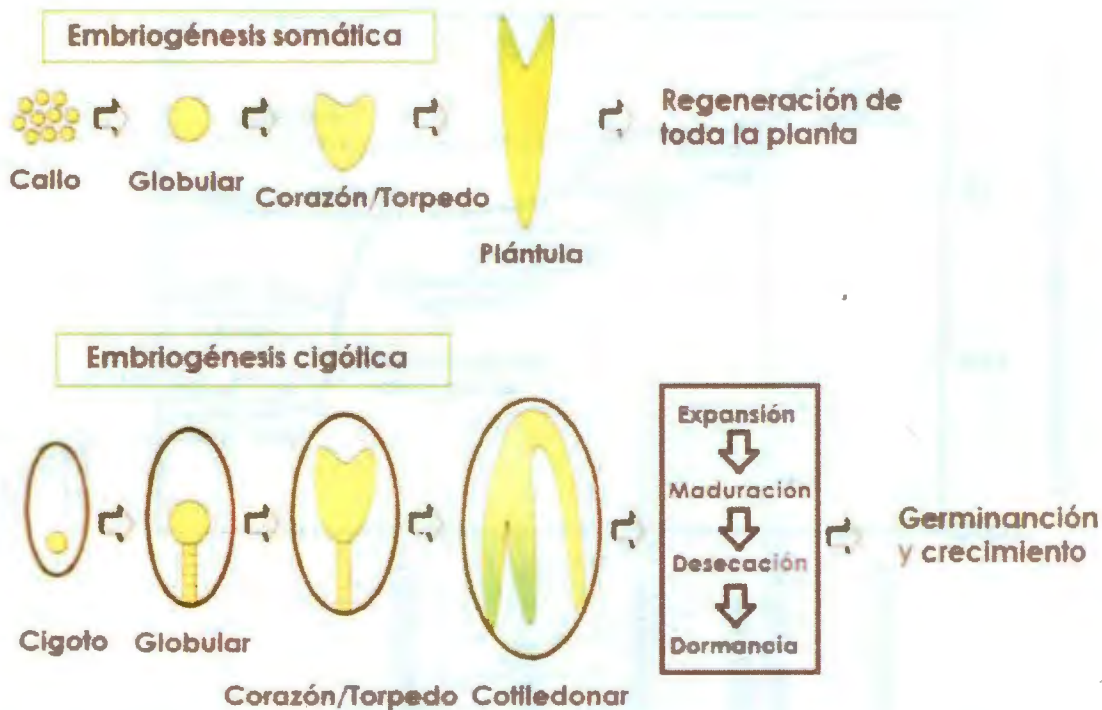


Figura 1.2 Comparación entre la morfología y desarrollo de la embriogénesis cigótica y somática (modificado de Zimmerman, 1993).

En la embriogénesis cigótica ocurren diversos cambios que van apareciendo conforme se da el desarrollo del embrión. Estos cambios tienen que ver con la tolerancia a la desecación en semillas para la protección del embrión y los cuales aparecen conforme disminuye el potencial hídrico. Dichos cambios se aprecian en la Figura 1.3.

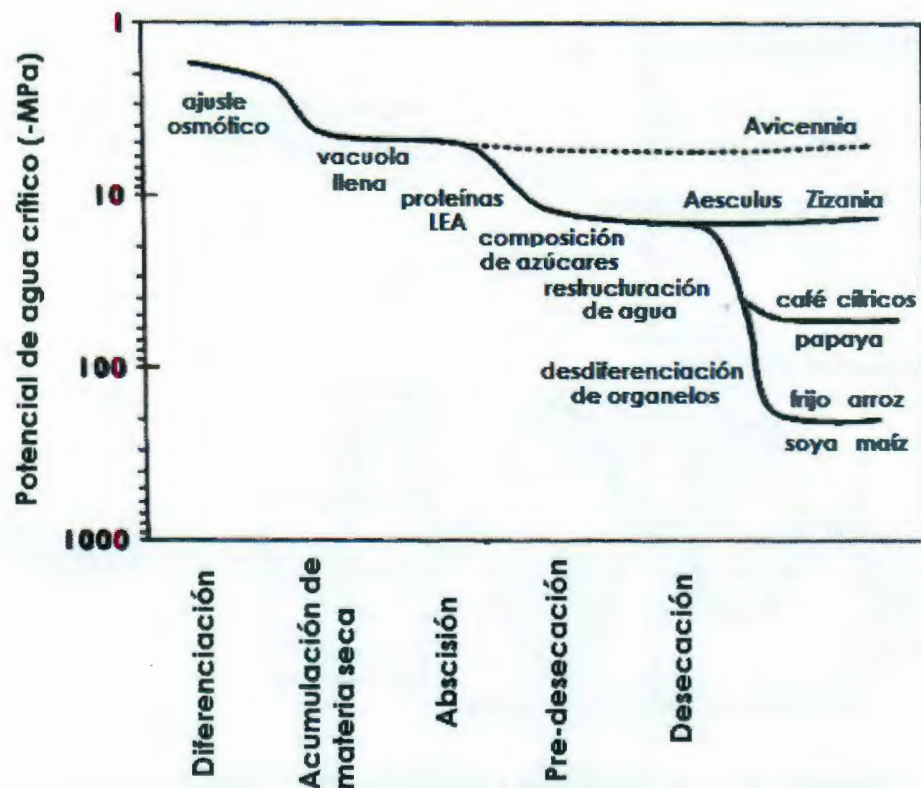


Figura 1.3 Diagrama esquemático del programa de desarrollo mostrando diferentes niveles de tolerancia a la desecación en semillas de diferentes especies (modificado de Vertucci y Farrant, 1995).

El genotipo, el tipo de explante, de los reguladores de crecimiento vegetal exógenos y los factores de estrés en la inducción y desarrollo de la embriogénesis somática son de gran importancia. Karami y Saidi (2009) encontraron que la competencia embriogénica de células somáticas puede ser estimulada con un bajo potencial osmótico en combinación con 2,4 D en el medio de cultivo, esto es debido a la organización de la cromatina. También se ha demostrado que otros estímulos inducen la embriogénesis somática. Por ejemplo; el estrés osmótico - un shock con sacarosa o cloruro de sodio - o de metales pesados - cobalto, níquel, zinc y cadmio (Zavattieri *et al*, 2010).

Durante el desarrollo del embrión cigótico, las proteínas de reserva son almacenadas en cuerpos proteicos que se localizan en el endospermo (Bewley y Black, 1985). Estos

cuerpos proteicos se forman en las vacuolas (las cuales acumulan a las globulinas) o en el retículo endoplasmático (en el que se almacena las prolaminas). En *Picea glauca* estos cuerpos proteicos están compuestos por una matriz soluble en la cual los cristaloides y globoides son frecuentemente encontrados (Misra y Green, 1990). Estudios posteriores demuestran que los cristaloides son las proteínas de reserva en las semillas cigóticas de *Picea glauca*. La síntesis de estas proteínas está regulada durante el desarrollo de los embriones somáticos en estadios cotiledonarios tempranos y tardíos (Misra y Green, 1991). Así mismo, Misra *et al.* (1993) evaluó el efecto del ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol en la maduración y desecación de los embriones somáticos de *Picea glauca*, encontrando que existen cuerpos proteicos en donde se almacenan dichas proteínas de reserva.

Las proteínas de reserva son generalmente clasificadas de acuerdo a su solubilidad como: albúminas, globulinas, prolaminas o glutelinas (Shewry *et al.*, 1995). En las dicotiledóneas la mayoría de las proteínas de reserva son globulinas (7S, 11S, 12S y 2S, donde S significa un coeficiente de sedimentación), mientras que en los cereales predominan las prolaminas y glutelinas. Las globulinas tales como 12S (legumin) y 7S (vicilin) en dicotiledóneas son utilizadas como un suplemento de nitrógeno en la germinación de embriones y plántulas (Leal *et al.*, 1995; Dong y Dunstan, 1996). En soya, la síntesis de precursores de polipéptidos 7S y 11S es similar en los embriones somáticos y cigóticos. En *Brassica napus* se detectó una proteína de reserva 12S en bajos niveles en los estadios globular y corazón. Durante la embriogénesis somática de alfalfa, las primeras proteínas de reserva sintetizadas son las 7S seguidas de las 11S, y mucho más tarde, las 2S (Krochko *et al.*, 1992).

Durante el estado de maduración en los embriones cigóticos ocurren varios cambios morfológicos y bioquímicos. Éstos se caracterizan por la deposición de sustancias de almacenamiento, represión de la germinación y adquisición de la tolerancia a la desecación (Thorpe, 1995). Mientras que los embriones somáticos no experimentan desecación y dormancia (Zimmerman, 1993). La síntesis y deposición de proteínas de reserva y abundantes proteínas de la embriogénesis tardía (LEA), durante la embriogénesis somática y cigótica, son usualmente reguladas por la expresión de genes

inducidos por el ácido abscísico (ABA) y el estrés hídrico (Dodeman *et al.*, 1997). En algunas especies, es necesario tratar los cultivos embriogénicos con ABA, a concentraciones de 10 a 50 μM , para estimular la maduración. Existen otros factores tales como el etileno, el estrés osmótico, el pH y el fotoperiodo que han sido reportados para la maduración de embriones somáticos en diferentes especies (George *et al.*, 2008).

Los embriones somáticos morfológicamente maduros se desarrollan en presencia de ABA. En especies recalcitrantes los embriones generalmente no pueden germinar y convertirse en plantas viables, a menos que ellas se sometan a desecación. En algunos casos es usado el polietilenglicol (PEG) para desecar embriones somáticos, pero en otros se requiere de un tratamiento específico de secado. Existe una desecación parcial que involucra una pérdida gradual y limitada del contenido de agua. Otro tipo de desecación es la completa, la cual causa una pérdida más drástica del contenido de agua por una solución de sales saturada en el medio (Stasolla *et al.*, 2002).

En muchas especies, es difícil que ocurra la germinación de los embriones somáticos y su conversión a planta. Es precisamente en esta etapa en la que se han observado anomalías (Steintz *et al.*, 2003), que se han clasificado en tres categorías:

- (1) Embriones fusionados (Rodríguez y Wetzstein, 1994; Carraway y Merkle, 1997; Benelli *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001; Tomaz *et al.*, 2001);
- (2) Carencia de cotiledones, presencia de un solo cotiledón o cotiledones malformados (Carraway y Merkle, 1997; Jayasankar *et al.*, 2002);
- (3) Carencia de parte aérea o anomalías en la diferenciación del meristemo apical (Nickle y Yeung, 1993; Suhasini *et al.*, 1996; Padmanabhan *et al.*, 1998; Stipp *et al.*, 2001; Jayasankar *et al.*, 2002).

Las principales causas de estas anomalías, probablemente se deban a la falta de maduración y baja tolerancia a la desecación y la dormancia. El ácido giberélico (AG_3) se ha empleado en el medio de cultivo durante la conversión de los embriones somáticos en plantas (Binzel *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2001; Junaid *et al.*, 2006). Es probable que el AG_3 sea necesario en los cultivos de embriones somáticos que experimentan dormancia (Choi *et al.*, 1999).

1.2.2 La embriogénesis somática de *C. chinense* y su recalcitrancia

López-Puc *et al.* (2006) trabajaron en un protocolo que induce embriogénesis somática directa en *C. chinense*. El trabajo consistió en hacer variar el contenido de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y el uso de diferentes explantes (embrión cigótico, hipocotilo, hojas cotiledonares). El hipocotilo resultó ser el mejor explante ya que se obtuvieron alrededor de 175 embriones somáticos por explante. El medio que mejor indujo la formación de los embriones somáticos fue el de Murashige y Skoog (MS) suplementado con 9.05 μM de 2,4-D. Posteriormente, en medio con 1.89 μM de ácido abscísico se maduraron los ESs y por último se germinaron en un medio MS con 1.1 μM de GA₃ (López-Puc, 2006).

En el mismo grupo, Zapata-Castillo *et al.* (2007) obtuvieron embriogénesis somática indirecta. En este trabajo utilizaron diferentes explantes (nodo, internodo, hipocotilo, media semilla y segmento de fruta) y medios de cultivos diferentes. La inducción del callo embriogénico fue con 9.04 μM de 2,4-D, 3% de sacarosa, 0.8% de gelrite, medio MS y en fotoperiodo por 30 días a 25 $\pm$ 2° C bajo condiciones de luz (40 – 50 $\mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$). Los embriones se formaron en el medio suplementado con 3.4 μM de tidiazurón.

Posteriormente a estos trabajo, Santana-Buzzy *et al.* (2009) caracterizaron histológicamente la ontogénesis de la embriogénesis somática directa inducida en hipocotilos. En este último trabajo se reveló la anatomía de las células proembriogénicas, originadas de las células provasculares del hipocotilo (Figura 1.4). Las células provasculares adquieren competencia embriogénica después de las 48h de inducción. Una intensa división mitótica y estructuras embriogénicas se observaron a lo largo del haz vascular, lo que da lugar a la formación de embriones somáticos. Después de dos semanas, se observaron los diferentes estadios de desarrollo de los embriones: preglobular, globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Figura 1.5).

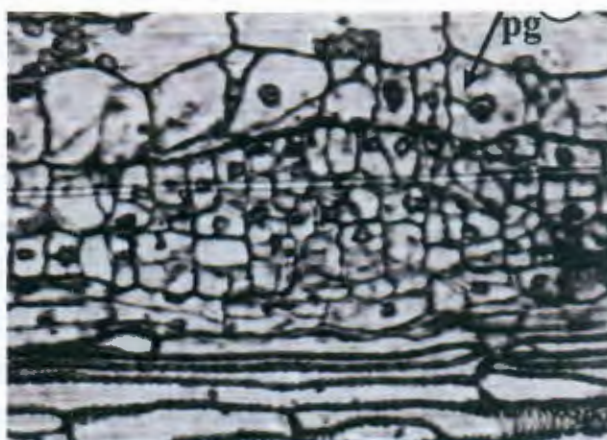


Figura 1.4 Sección longitudinal del hipocotilo con células preglobulares (pg) originadas de células provasculares (Santana-Buzzy, 2009).

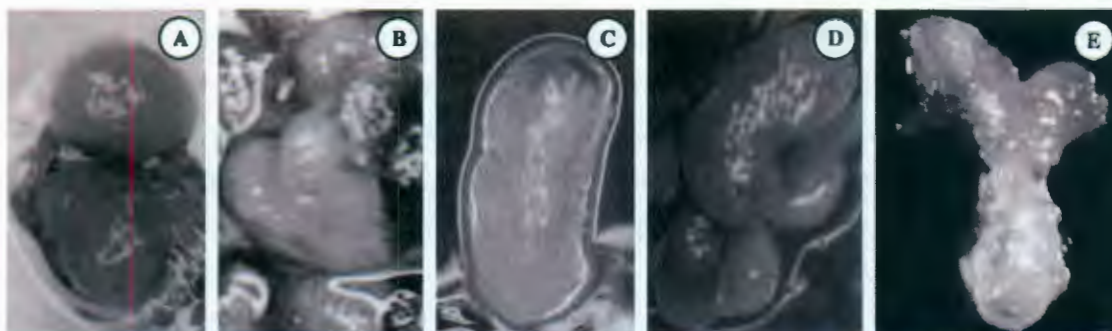


Figura 1.5 Diferentes estados de desarrollo de los ESs de *C. chinense*. A, globular; B, corazón; C, torpedo; D, cotiledonar temprano; E, cotiledonar tardío (Santana-Buzzy, 2009).

En el 2010, Aviles-Viñas, realizó una ligera modificación al protocolo de embriogénesis somática directa de López-Puc *et al.* (2006). Dicha modificación consistió en dividir la ES en dos etapas. La primera, fue la inducción de la embriogénesis somática en medio de cultivo semisólido y, la segunda, fue la proliferación de los embriones en un medio de cultivo líquido el cual contiene la mitad de la concentración del 2,4-D.

Todos los reportes anteriores de embriogénesis somática indican que es un sistema altamente eficiente y reproducible para *C. chinense*. Aunque se registró una alta

frecuencia de embriones deformados y, una baja tasa de germinación y de conversión de los embriones en plantas; siendo esto objeto de estudio para el fenómeno de recalcitrancia (Santana-Buzzy *et al.*, 2009).

Cabe hacer mención que la recalcitrancia se define como la incapacidad de las células, tejidos y órganos vegetales para responder a las manipulaciones del cultivo *in vitro*. La recalcitrancia puede ocurrir en cualquiera de las etapas del régimen de cultivo y se sabe poco acerca de los factores que la causan. Según Benson (2000), la recalcitrancia de las plantas al cultivo *in vitro* está influenciada fundamentalmente por tres factores:

- 1) La fisiología de la planta donadora: genotipo, estado fisiológico de la planta, tipo de tejido;
- 2) La manipulación *in vitro* de las células: composición basal del medio (macro – micro nutrientes, agentes gelificantes), reguladores de crecimiento (TDZ, jasmonatos, etileno), factores físicos (luz, temperatura, aireación) y;
- 3) El estrés fisiológico impuesto por la propia condición del cultivo *in vitro*: oxidativo (compuestos fenólicos), etileno.

Es por ello que la selección del explante a una edad fisiológica, la modificación de los componentes en el medio de cultivo y el uso de otros aditivos para el crecimiento contribuye al alivio del fenómeno. Algunas posibles soluciones a este problema se presentan a continuación (Alemanno *et al.*, 1997):

- (a) Si las anomalías morfológicas son frecuentes, uno de los factores que mejoraría este aspecto es el tipo de auxina y su concentración en el medio de cultivo;
- (b) La inducción de una fase de crecimiento antes de la fase de maduración en el procedimiento de la embriogénesis somática mejora el desarrollo del embrión;
- (c) La modificación de ciertos parámetros del medio de maduración, especialmente incrementos en la concentración de sacarosa y adición de ABA, favorecen síntesis de proteínas y almidón de reserva en embriones, respectivamente y;
- (d) Las variaciones en el medio de maduración da como resultado una deshidratación del embrión, ayudándolo a germinar.

El efecto del estrés abiótico sobre los embriones somáticos, se ha venido evaluando en los últimos años. Las condiciones ambientales adversas (estresantes) afectan el crecimiento y desarrollo, alterando la expresión de genes y modificando el metabolismo celular. En el cultivo *in vitro* existen diferentes factores del estrés, por citar algunos ejemplos: el estrés oxidativo provocado por una herida o corte, algunos reguladores de crecimiento vegetal, la baja o alta intensidad de la luz, algunos metales pesados, la baja o alta concentración de sales en el medio de cultivo, entre otros (Zavattieri *et al.*, 2010). También el estrés salino, se ha reportado que puede provocar cambios en el comportamiento de los embriones somáticos de diferentes especies (Unnikrishnan *et al.*, 1991)

1.3 El estrés salino (NaCl) en las células vegetales

El efecto del estrés en plantas puede ser estudiado a nivel celular, a nivel de tejidos y órganos, y a nivel de organismo completo. La Figura 1.6 muestra de manera general, la vía de transducción de señales en respuesta al estrés. La primera señal ante el estrés es percibida en la membrana por los receptores (receptor unido a la proteína G, canales iónicos, receptor tipo cinasa o histidina cinasa), los cuales generan moléculas señales secundarias, tal como Ca^{+2} , fosfato inositol, especies reactivas de oxígeno (ROS), y ABA. La señal de estrés se traduce dentro del núcleo e induce la expresión de muchos genes responsivos a estrés, cuyos productos permiten la adaptación de las plantas (Tuteja, 2007). Los genes responsivos al estrés pueden ser inducidos de manera inmediata o tardía. Los genes que se inducen dentro de pocos minutos a la percepción del estímulo, frecuentemente se expresan transitoriamente y sus productos (por ejemplo, varios factores de transcripción) pueden activar la expresión de genes tardíos (por ejemplo, RD[responsivos a la deshidratación], KIN[inducidos por frío], COR [en respuesta a frío]). Sobre todo, los productos de estos genes están involucrados directamente en la protección celular ante el estrés (por ejemplo, las proteínas LEA, proteínas anticongelantes, antioxidantes, chaperonas, y enzimas de detoxificación) o involucradas indirectamente en la protección (por ejemplo, el factor de transcripción, enzima de metabolismo PI) (Fig.1.6). Los productos de los genes inducidos por estrés están también

involucrados en la generación de moléculas reguladoras, tal como ABA, ácido salicílico, etileno, las cuales pueden iniciar una segunda ronda de señalización (Tuteja, 2007).

La transducción de señales ante el estrés requiere de la coordinación exacta de todas las moléculas señalizadoras involucradas, incluyendo modificaciones en las proteínas (metilación, ubiquitinización, glicosilación, etc.), adaptadores, y andamios (Xiong *et al.*, 2002). Para la tolerancia al estrés, la respuesta puede ser inhibición del crecimiento o muerte celular, la cual dependerá de que tipo de genes sean regulados o no.

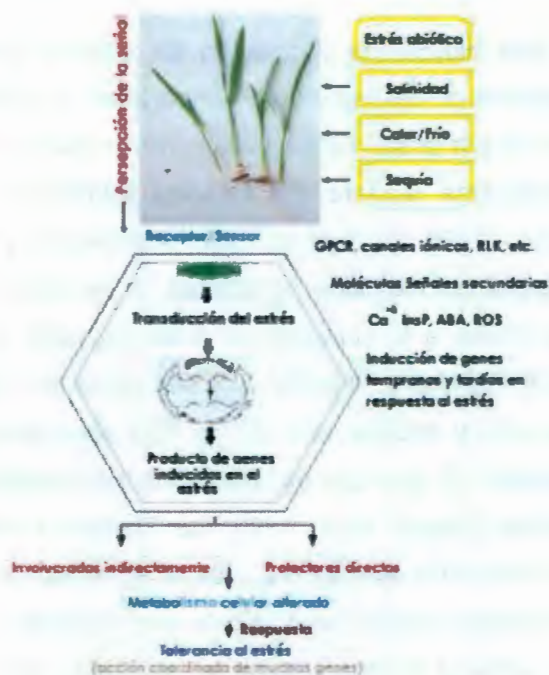


Figura 1.6. Vía general de la respuesta en plantas ante el estrés (modificado de Tuteja, 2007).

El mecanismo de tolerancia a la salinidad es un fenómeno complejo. En la tolerancia a la salinidad están involucrados varios componentes de diversas vías. En un interesante estudio con microarreglos de ADN complementario se analizaron 7000 genes de *Arabidopsis*, encontrándose que 194 fueron regulados por un alto estrés salino (250 mM

de NaCl), sugiriendo que muchos mecanismos de regulación transcripcional funcionan en vías de transducción de señales a estrés (Seki *et al.*, 2002).

Moléculas pequeñas tales como el calcio, la glicina betaína, la prolina, las ROS, el ABA en conjunto con varias bombas iónicas también juegan un papel importante en este proceso. Sin embargo, en los estudios se muestra que algunas proteínas unidas a calcio, factores de transcripción y enzimas como proteínas cinasas y helicasas también tienen un papel en la tolerancia al estrés salino.

Las proteínas LEA, son hidrofílicas y carecen de cisteína y triptófano, protegen la estructura y los componentes celulares (ej. membranas, enzimas y proteínas) ante el estrés osmótico impuesto por la sal. Éstas y sus correspondientes transcritos llegan a ser acumulados abundantemente durante los estadios avanzados del desarrollo de los embriones (Gaubier *et al.*, 1993; Corre *et al.*, 1996; Van Damme y Peumans, 1996; Vicient *et al.*, 1998). Estas proteínas han sido agrupadas de acuerdo a su secuencia y a su estructura, la cual es similar a la conocida en proteínas LEA en algodón (Dure *et al.*, 1989). El gen *Em* (early-methionine-labelled, por sus siglas en inglés) es un miembro de grupo I de los genes LEA y codifica una de las más abundantes proteínas citosólicas acumuladas en embriones. El gen *Em* es expresado solo durante el paso tardío de la maduración de la semilla (Gaubier *et al.*, 1993; Van Damme y Peumans 1996; Vicient *et al.*, 1998) o durante el desarrollo de los ES (Corre *et al.*, 1996). La expresión del gen *Em* es específico de embriones y puede ser inducido precozmente por ABA, como también por estrés osmótico, salino o hídrico (Morris *et al.*, 1990; Bostock y Quatrano 1992; Gaubier *et al.*, 1993). Las dehidrinas pertenecen al grupo II de los genes LEA (Dure *et al.*, 1989) y así más de 65 secuencias de dehidrinas en plantas han sido identificadas (Close, 1997). Estas juegan un papel en la adquisición de tolerancia a la desecación y previenen el daño en embriones, provocado por estrés hídrico (o de sequía), así como la germinación precoz de semillas (Close, 1997). Las proteínas LEA pueden prevenir la germinación precoz en embriones cigóticos o somáticos inmaduros por la aplicación de ABA, o bajo condiciones de estrés hídrico, de estrés salino, de estrés por frío y por herida (Morris *et al.*, 1990; Bostock y Quatrano, 1992; Danyluk *et al.*, 1994; Rouse *et al.*, 1996; Close, 1997; Richard *et al.*, 2000).

El estrés por salinidad está definido como un exceso de sales solubles, tal como el NaCl que se disocia en los iones cloro (Cl^-) y sodio (Na^+). El primer efecto del exceso de sales es el estrés osmótico, el cual causa deshidratación (pérdida de turgencia) y reducción de crecimiento. Posteriormente, ocurre el estrés iónico que es el que provoca toxicidad (Munns y Tester, 2008).

La salinidad es uno de los factores abióticos más importantes que limitan la productividad del suelo (Munns, 2002). Un suelo se clasifica como salino cuando la conductividad eléctrica es de 4 dS/m o más, lo que equivale a 40 mM de cloruro de sodio (NaCl) y genera un potencial osmótico de aproximadamente -0.2 MPa (Munns y Tester, 2008). La salinidad afecta el crecimiento y producción de los cultivos al reducir el potencial hídrico de la solución del suelo, disminuyendo así la disponibilidad de agua y creando un desequilibrio nutritivo, dado la elevada concentración de iones (Na^+ , Cl^-) que pueden interferir con la nutrición mineral y el metabolismo celular. En consecuencia, los diversos efectos observados a distintas escalas, desde reducción de turgencia y crecimiento hasta la pérdida de la estructura celular por desorganización de membranas e inhibición de la actividad enzimática, son el producto combinado del estrés hídrico, la toxicidad iónica y el desequilibrio nutricional. Durante el estrés, uno de los efectos más importantes es la inhibición de la división y expansión celular, y consecuentemente, el crecimiento lento que se refleja en la pérdida de productividad de la planta (Zhu, 2001).

El NaCl es una sal que se encuentra frecuentemente en terrenos de cultivo. Por ello, muchos estudios han sido orientados al entendimiento de los mecanismos involucrados en sus sistemas de transporte y mecanismos regulatorios que median la homeostasis de Na^+ en las plantas. El modelo de transporte de sodio a través de las raíces utiliza múltiples compartamentos: capa de la epidermis y corteza como un compartamento (con vacuolas) son separadas de la estela por la banda Casparian, las células estelares (con vacuolas) adyacentes al xilema (parénquima), o floema (células acompañantes), Figura 1.7. El diagrama esquemático muestra transporte radial y movimiento longitudinal de iones de Na^+ del suelo a través de las raíces, del xilema a los brotes, y recirculación por toda la planta. El Na^+ entra al citosol de las raíces por NSCC (canales de catión no selectivos) y posiblemente por otro transportador parecido al HKT (incluyendo OsHKT2;1). La baja

concentración citosólica de Na^+ es mantenida por la acción de un antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática (SOS1) y vacuolar (NHX1). Un antiportador CHX catión/ H^+ (CHX21) contribuye al movimiento de Na^+ de la células de la endodermis hacia el apoplasto de la estela. En la estela, el Na^+ entra al xilema por un antiportador Na^+/H^+ unido a la membrana plasmática (SOS1). En la raíz, el Na^+ entra al xilema de la raíz vía uniporte selectivo- Na^+ (AtHKT1;1, OsHKT1;5; Nax1). En las hojas, el Na^+ entra por uniporte selectivo- Na^+ (OsHKT1;5, AtHKT1;1 y Nax2), y por canales NSCC. Las concentraciones de Na^+ citosólico son mantenidas por la acción de ambos antiportadores Na^+/H^+ parecidos SOS1 y NHX1. Los mecanismos de entrada, salida y recirculación en el floema aún no son determinados (Apse y Blumwald., 2007). El desequilibrio del Na^+ es una consecuencia primaria de la alta concentración de NaCl y afecta la división, crecimiento y supervivencia celular (Zhu, 2003). El exceso de iones Na^+ y Cl^- puede conducir a cambios conformacionales en la estructura de las proteínas, mientras que el efecto osmótico lleva a la pérdida de turgencia celular (Munns y Tester, 2008).

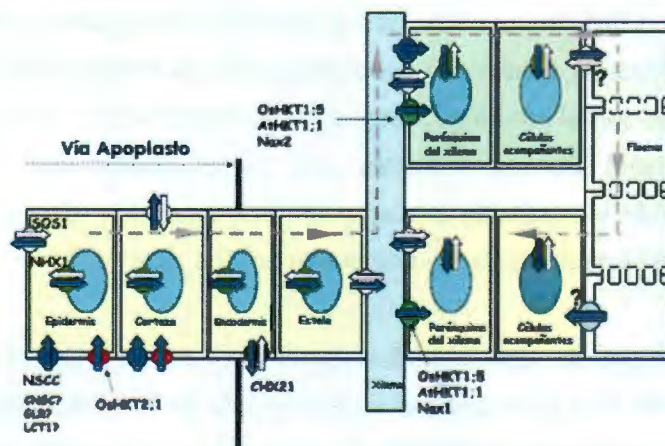


Figura 1.7. Diagrama del movimiento de Na^+ en la planta (modificado de Apse y Blumwald, 2007).

Los mecanismos involucrados en el estrés salino aún no son entendidos completamente debido a la participación de muchos genes en la resistencia a este estrés (Parida y Das, 2005). No obstante se sabe que las plantas involucran procesos para operar adicionalmente y asegurar su supervivencia. Entre ellos, se encuentra la exclusión de iones Na^+ y Cl^- del citoplasma y su compartimentalización en la vacuola. (Munns, 2002). Al

aumentar estos iones en la vacuola, para soportar el efecto osmótico, un gran número de plantas han desarrollado en su metabolismo la capacidad para sintetizar y acumular solutos compatibles u osmoprotectores de proteínas del citoplasma (Hasegawa *et al.*, 2000; Parida y Das, 2005). Estos solutos son acumulados a niveles osmoticamente significativos sin alterar el metabolismo de la planta, con la función de mantener la turgencia de los tejidos para así mantener la función celular (Ramanjulu y Sudhakar, 2000). Compuestos de diversa naturaleza química se encuentran agrupados dentro de los solutos compatibles: aminoácidos (prolina), compuestos cuaternarios de nitrógeno (glicina betaina), polioles (manitol), azúcares (trehalosa, sacarosa, fructanos) (Nuccio *et al.*, 1999). Para conseguir la adaptación a las condiciones salinas, se deben activar múltiples mecanismos. Se debe aumentar la capacidad de obtener y/o retener agua, y debe restituirse la homeostasis iónica (Figura 1.8). La representación esquemática del mecanismo celular se describe por categorías funcionales (por ejemplo, mantenimiento del potencial de membrana, depuración de ROS – especies reactivas de oxígeno-, tráfico de membrana alterado, cambio de proteínas), presentando una mejor identificación de metabolitos y familias de proteínas que constituyen defensas celulares ante el estrés iónico. Incluyendo estas funciones tales como cambio de proteínas, estructura de membrana, y reorientación del tráfico vesicular. No incluye funciones moleculares que también juegan roles importantes: reacomodo de la cromatina, transcripción/ajuste, transporte de ARN, o regulación de la traducción.

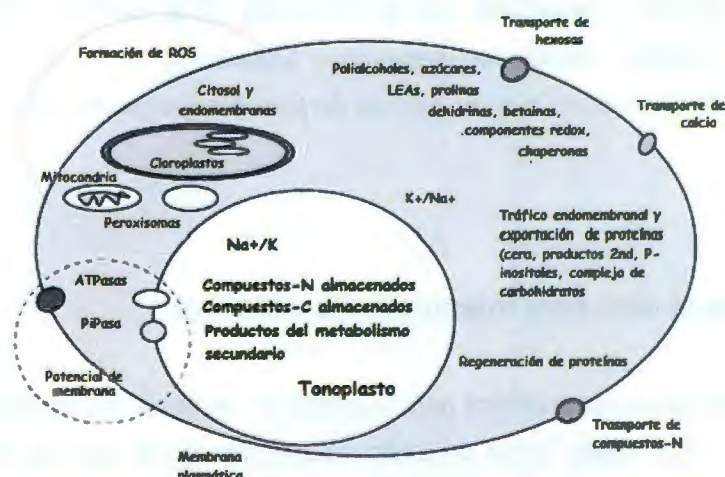


Figura 1.8 Representación esquemática de las determinantes bioquímicas y metabólicas ante la tolerancia al estrés salino. (modificado de Bressan *et al.*, 2008).

La prolina es un aminoácido que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas, cuando éstas crecen en condiciones óptimas. En condiciones de estrés, se ha encontrado que el contenido de prolina aumenta para actuar como un agente osmótico, protegiendo a la planta de la deshidratación. Muchas especies de plantas acumulan prolina libre en respuesta a la salinidad, sequía y frío (Chaman., 2007).

Se ha sugerido que la prolina participa en múltiples funciones en la tolerancia de las plantas al estrés; actuando como un mediador del ajuste osmótico, estabilizador de proteínas y de membranas, así como inductor de genes relacionados a estrés osmótico, fuente de carbono y nitrógeno fácilmente disponible en la rehidratación celular. También puede ser una fuente de equivalentes de reducción (del catabolismo de prolina) para sostener la fosforilación oxidativa y la generación de ATP durante la recuperación del estrés. Además, ayuda al control de la acidosis del citosol y puede mantener la relación NADH/NAD⁺ a valores compatibles con el metabolismo en la detoxificación del exceso de NH⁴⁺ y ayuda a las células a superar la tensión oxidativa como cosechador de especies reactivas de oxígeno (Chaman, 2007).

La tolerancia a la salinidad depende de la capacidad de una especie o cultivar para controlar la absorción y transporte de sodio y cloro en el tejido fotosintético (Parida y Das, 2005; Tester y Davenport, 2003). Así, una alta relación de potasio: sodio en la hoja se considera un indicador importante en la tolerancia a la salinidad (Kant y Kafkafi, 2002). Como un estudio inicial del mecanismo bioquímico de la adaptación a la sal, Bressan *et al.* (1985) encontró que las células de *Nicotiana tabacum* toleraban 248 mM de NaCl.

1.3.1 Selección *in vitro* para tolerancia a la salinidad

Se han reportado diferentes métodos para la selección de células tolerantes a salinidad, *in vitro* (Tal, 1990; 1993; 1994): a) de **un paso o selección corta**, que es aquella donde se adicionan diferentes concentraciones de sal al medio; b) de **dos pasos**, que consiste en la exposición de las células a estrés osmótico, y posterior a su adaptación, se someten a

estrés de salinidad; c) de selección de **paso largo**, en el que la sal se suministra al medio, gradualmente; d) **indirecto**, es aquel en el que mediante marcadores bioquímicos y/o moleculares, se identifican células tolerantes al estrés (Ej. sobreproducción de prolina, presencia de alguna proteína, genes asociados a estrés).

Según Tal (1994) el método para la selección *in vitro* de **un paso** o por **selección corta** previene el desarrollo de células adaptadas epigenéticamente (las que enmascaran a los mutantes tolerantes a la sal). Los trabajos de selección bajo presión *in vitro* requieren que el explante utilizado, sea de alto potencial morfogénico para lograr una regeneración exitosa. Durante la selección *in vitro* para la tolerancia a la salinidad las células son capaces de compartamentalizar el exceso de sales en la vacuola y sobrevivir por ajuste del potencial osmótico. Esta adaptación causa reducción en la división y elongación celular (Bressan *et al.*, 1985). Algunas plantas llegan a adaptarse a altas concentraciones de sales, como las halófitas y son incapaces de germinar en ausencia de ésta (Remotti, 1998). El estrés salino aplicado de manera indirecta, se detecta mediante compuestos osmóticamente activos, como glicinabetaina o prolina (Sabry *et al.*, 1995 y Stewart y Lee, 1974, respectivamente). Bressan *et al.* (1987) encontró un notable cambio bioquímico durante la adaptación de las células de tabaco a la sal, el cual es la acumulación de una proteína alcalina de 26 kDa llamada osmotina-1 la cual se acumuló y ayudó a proteger a la célula cuando se inició el estrés por salinidad. Sabry *et al.* (1995) encontró acumulación de glicinabetaina y **sacarosa** en plantas de trigo estresadas por sal. La glicinabetaina es conocida como un osmoprotector y es acumulada en ciertas especies bajo condiciones de sal y sequía. Los niveles elevados de ABA han sido correlacionados con incrementos a la tolerancia a la salinidad y su aplicación exógena de ABA acelera la adaptación a la salinidad del cultivo de células de tabaco (Singh *et al.*, 1987, LaRosa *et al.*, 1987). Esto explica el papel del ABA en la aclimatación de plantas a la salinidad y al estrés osmótico. La correlación entre el estrés y los cambios en los niveles de ABA ha sido bien estudiada a nivel molecular por Shinozaki y Shinozaki-Yamaguchi (1996).

El cultivo *in vitro* también ofrece la posibilidad para examinar el metabolismo alterado de las células (Tuteja, 2007), los efectos de los solutos compatibles (Parida y Das, 2005), la expresión de genes (Bressan, 2008) y la diferenciación celular (Yen y Yen, 1999). El

cultivo de células y tejidos sometidos a estrés salino se reportó en trabajos de Gulati y Jaiwal (1997), Hasegawa *et al.*, (1994), Tal (1994). Remotti (1998) menciona a diversos cultivos seleccionados *in vitro* bajo estrés salino.

La variación somaclonal observada en las plantas regeneradas a partir de células y tejidos (Larkin and Scowcroft, 1981) es considerada una fuente de genotipo nuevo para el mejoramiento de cultivo (Brettell *et al.*, 1886; Hadi y Bridgen, 1996). Ésta en combinación con mutagénesis puede ser benéfica para aislar líneas tolerantes a sequía y salinidad en una selección *in vitro* de corta duración (Samad *et al.*, 2001). Los cultivos *in vitro* han sido usados para la selección de tolerancia a salinidad (Bressan *et al.*, 1985; Rosas *et al.*, 2003) y a sequía y frío (Adkins *et al.*, 1995; Remotti, 1998; Xing y Rajashekhar, 2001).

La evaluación y caracterización de la variación somaclonal para salinidad y sequía, espontánea e inducida, puede probar el cultivo exitoso en condiciones de estrés. Las técnicas moleculares de variación somaclonal por ejemplo: RFLP, AFLP, RAPD, microsatélites e ISSR etc., están siendo usadas para caracterizar la variación genética y epigenética inducida. Entre estas técnicas moleculares, el análisis por "Random Amplified Polymorphic DNA" (Williams *et al.*, 1990) es una simple, rápida y fácil forma de análisis de un tratamiento *in vitro* utilizando pequeñas cantidades de ADN y no requiere de una previa información de la secuencia. Estos beneficios justifican la frecuente aplicación de la técnica en estudios de variación genética (Mondal y Chand, 2002; Bennici *et al.*, 2003 y Feuser *et al.*, 2003).

1.4 El uso del cloruro de sodio durante la morfogénesis *in vitro* (caso particular la embriogénesis somática)

En *Brassica napus* L. se observó un decremento sobre el diámetro de los callos formados y en la regeneración de brotes y raíces a 68.33 mM de NaCl (Chamandoosti, 2007).

En un estudio realizado en tejido calloso de dos genotipos de arroz (Basmati 370 y Basmati Kashmir), se evaluó el efecto iso-osmótico de PEG y NaCl. Se observó que el potencial hídrico y osmótico disminuye conforme se incrementan la concentración de

ambos agentes estresantes; mientras que la turgencia y el contenido de prolina iban en aumento (Ahmad *et al.*, 2007). La tasa de crecimiento se reduce en ambos agentes estresantes y el contenido de Na^+ aumentó conforme incrementó las concentraciones de ellos. El estrés inducido por NaCl redujo el contenido de K^+ y Ca^{+2} , pero el estrés por PEG los incrementó. Existe una mejor tolerancia (tanto con PEG y NaCl) para uno de los genotipos del callo de arroz (Basmati-370) porque fue menor la reducción en el crecimiento y el peso seco fue mayor. Así mismo, las cantidades de cationes, prolina y la turgencia fueron más altas (Ahmad *et al.*, 2007).

En el cultivo de callos de dos especies de tomate (*Solanum lycopersicum* y *Solanum pennellii*) y de sus híbridos con diferentes concentraciones de NaCl, el aumento relativo del peso fresco del callo fue mayor en *S. pennellii* y sus híbridos (Cano *et al.*, 1996). Los contenidos de Cl^- , Na^+ , prolina, valina, isoleucina y leucina aumentan al incrementar la concentración de NaCl en el cultivo del callo de tomate de ambas especies. Existió, de igual manera, un incremento o variación en el contenido de prolina en el tejido calloso de seis cultivares de *S. esculentum* Mill., Pascal, Imperial, Queen, Tnshet crystal, Tnshet star and Pahuja sometidos a diferentes concentraciones de NaCl (Mohamed *et al.*, 2007).

En ápices de zanahoria se necesitó un tratamiento con estrés o un sistema de inducción basado en un tipo de estrés, ya sea 0.7 M de sacarosa, 0.3 M de NaCl o 37° C, para que las células somáticas adquieran competencia embriogénica en un medio libre de fitohormonas, en el que la participación del ABA fue esencial para esta adquisición (Kikuchi *et al.*, 2006).

Se ha reportado que concentraciones medias (40 mM) de sal en el medio de cultivo, pueden estimular la proliferación celular y como consecuencia, el incremento del número de embriones somáticos durante el cultivo *in vitro* de trigo (Galiba y Yamada, 1988). También se ha observado que la aplicación de agentes osmóticos o sales en el medio de cultivo, incrementan el número de embriones en los cultivos de células en suspensión de zanahoria (Nomura y Komamine, 1986). Se han encontrado algunos reportes donde el cloruro de sodio en el medio de cultivo de células en suspensión de arroz ayuda a la capacidad de regeneración del callo embriogénico (Binh y Heszky, 1990). Así mismo se

han obtenido cultivos de células tolerantes de *Citrus sinensis* (Kochba *et al.* 1982; Ben-Hayyim, 1987), de alfalfa y arroz (Winicov, 1991,1996) y de *Solanum tuberosum* L. (Marconi *et al.*, 2001; Queirós *et al.*, 2007). Por otra parte, el estrés con NaCl ha sido utilizado para obtener líneas embriogénicas tolerantes a la salinidad. Así, se ha reportado la obtención de embriones somáticos tolerantes a NaCl, de *Vitis* (Lebrun *et al.*, 1983), de *S. trifoliatum* (Unnikrishnan *et al.*, 1991) y de cebada (Espelund *et al.*, 1992).

HIPÓTESIS

El estrés inducido por cloruro de sodio (NaCl) reduce el número de los embriones somáticos deformados de *C. chinense* Jacq.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) sobre el comportamiento (desarrollo y calidad) de los embriones somáticos de chile habanero (*C. chinense* Jacq).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del NaCl sobre: la calidad de los embriones somáticos (normales y deformados), el desarrollo, el porcentaje de sobrevivencia, el contenido de agua y la germinación.
2. Determinar el perfil proteico de los embriones somáticos de *C. chinense* Jacq. sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.
3. Estudiar el efecto del NaCl sobre el contenido de prolina en embriones somáticos de *C. chinense* Jacq.

4. Evaluar mediante marcadores moleculares de tipo RAPDs, el efecto del estrés de cloruro de sodio sobre la variación en el perfil de ADN de los embriones somáticos de *C. chinense* Jacq.
5. Determinar la relación sodio (Na^+) y potasio (K^+) en embriones somáticos de *C. chinense* Jacq. tratados a diferentes concentraciones de NaCl.

JUSTIFICACIÓN

Al exponer las células vegetales a estrés salino *in vitro* se activan mecanismos de adaptación que pueden ser reflejados a nivel macroscópico (un menor crecimiento, cambio en la relación parte aérea/raíz, limitación de la expansión foliar) como consecuencia de cambios bioquímicos (síntesis de ácido abscísico, solutos osmoprotectores) y fisiológicos (alteración de la permeabilidad de las membranas a los iones y al agua, cierre estomático, disminución de transpiración y fotosíntesis, etc.). Esta respuesta adaptativa está gobernada por señales moleculares que regulan la relación con el medio externo (ej., cambios en la actividad de canales y transportadores de membranas) y por la activación y transcripción de genes entre cuyos efectos está la modificación de rutas biosintéticas que resultan en ajuste osmótico y protección de las estructuras celulares (Leidi y Pardo, 2002). Por otro lado, durante el cultivo *in vitro* se pueden producir cambios genéticos, conocido esto como variación somaclonal, la cual puede ser inducida durante la manipulación de las células *in vitro*. Esta variación ha sido ampliamente utilizada para la selección de variantes somaclonales en el mejoramiento genético de numerosas especies de interés económico.

Tomando en cuenta lo antes mencionado, y considerando que chile habanero es una especie muy importante para la región; que los cambios climáticos conducen irremisiblemente a una creciente reducción de la disponibilidad de agua y como consecuencia de esto, a un incremento de los niveles de sales en el suelo; ligado a esto, el uso excesivo de químicos en el suelo durante el cultivo. Entonces, chile habanero requiere de la implementación de modelos biotecnológicos eficientes que permitan, en

menor tiempo que los métodos tradicionales, obtener líneas mejoradas para caracteres de interés agronómico. Considerando además que contamos con un sistema de embriogénesis somática altamente eficiente y reproducible para esta especie y que la recalcitrancia del género se manifiesta en la incapacidad para la germinación y conversión de los embriones en plantas, entonces la exposición de los embriones somáticos a diferentes concentraciones de NaCl pudiera provocar un mejor desarrollo y calidad (morfología, maduración, germinación, etc.). Cabe mencionar que se ha reportado la producción de regenerantes tolerantes a salinidad mediante el método de selección *in vitro* de un paso, en especies como arroz, betabel, canola, alfalfa y tabaco, obteniéndose plantas fértiles y genéticamente estables a partir de células morfogénicas (Vajrabhaya *et al.*, 1989; Freytag *et al.*, 1990; Jain *et al.* 1990; Winicov, 1991; Sumaryati *et al.*, 1992). Conociendo las limitaciones que presenta la regeneración de la ES de Capsicum chinense, es necesario incorporar NaCl al medio de cultivo para estudiar el comportamiento sobre la calidad y desarrollo de los ESs de chile habanero.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el diagrama experimental (Figura 1.9) se muestra el procedimiento seguido para estudiar el efecto del NaCl sobre el comportamiento de los embriones somáticos de chile habanero (*C. chinense*). Como fuente de material vegetal se utilizaron plántulas asépticas procedentes de semillas de la var. Mayan Ba'alché, germinadas *in vitro*. Los explantes fueron tomados del hipocotilo disectado en segmentos de 1.0-1.5 cm. Se utilizaron 50 explantes por tratamiento. Para la inducción de la embriogénesis somática se utilizó el protocolo de Avilés-Viñas (2007). Una vez inducido el proceso, los embriones fueron transferidos a medio líquido bajo condiciones de estrés salino de entre 0 (testigo) y 300 mM de NaCl por 30 días. El efecto del NaCl se analizó a través del 1) número de embriones somáticos normales, deformados y muertos en los diferentes tratamientos; 2) el estado de desarrollo de los embriones somáticos y germinación; 3) el contenido de agua y el peso seco; 4) el contenido de proteínas totales y el patrón electroforético; 5) los contenidos de prolina y, así como de Na⁺ y K⁺ y 6) la variación en el perfil de ADN, mediante marcadores moleculares de tipo RAPDs (Figura 9).

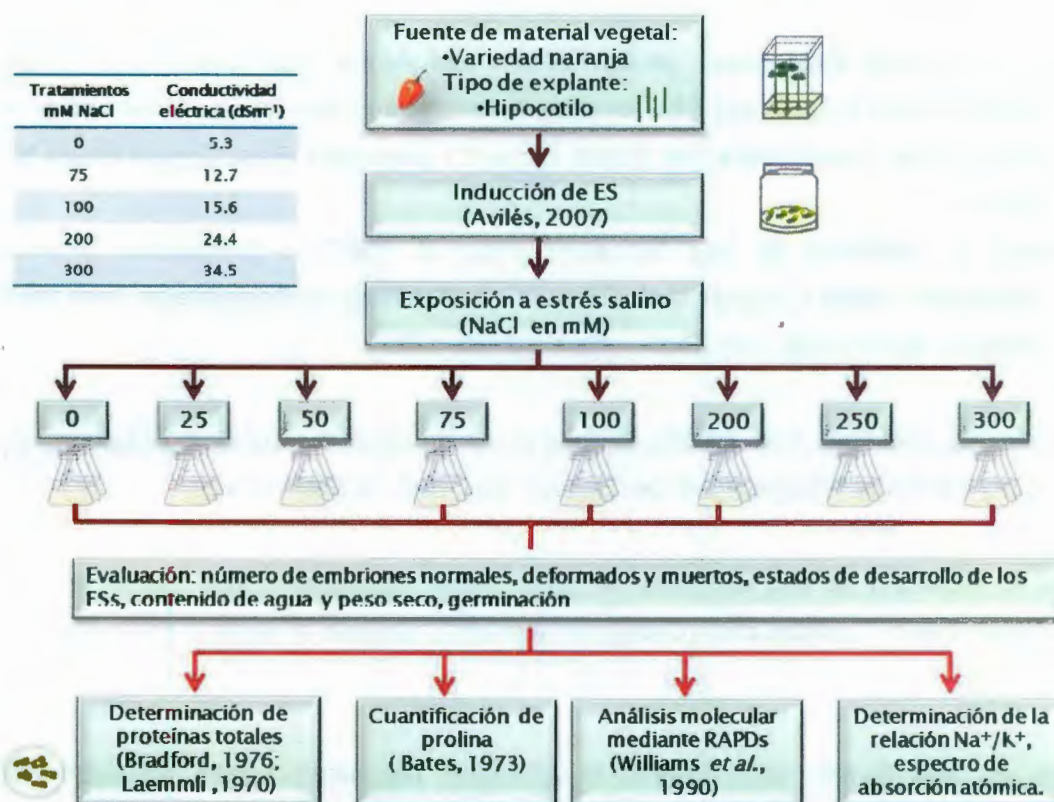


Figura 1.9 Diagrama metodológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Adkins, S.W., Kunanuvatchaidach, R. and Godwin, I.D. (1995). Somaclonal variation in rice: Drought tolerance and other agronomic characters. *Australian Journal of Botany*, 43 (2): 201-209.
- Agrawal, S., Chandra, N., and Kothari, S.L., (1989), Shoot-tip culture of pepper for micropropagation. *Curr. Sci.*, 57: 1347-1349.
- Agrawal, S., Chandra, N. (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annum* L. var. Mathania. *Curr. Sci.* 52: 645 - 646.

- Ahmad Muhammad Sajid Aqeel, Javed Farrukh and Ashraf Muhammad. (2007). Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes *Plant Growth Regul* 53: 53–63.
- Alemanno L., Berthouly M, and Michaux-Ferriere N. (1997). A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants, *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*. 33:163-172.
- Anilkumar, M., and Nair, A.S., (2004), Multiple shoot induction in *Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder. *Plant Cell Biotech. Mol. Biol.*, 5(3&4): 95-100.
- Arous, S., Boussaid, M. and Marrakchi, M. (2001) Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chilli (*Capsicum annuum* L.) *Journal of Applied Horticulture* 3: 17-22.
- Arroyo, R., and Revilla, M.A., (1991), *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep.*, 10: 414-416.
- Apse Maris P. and Blumwald Eduardo. (2007). Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters* 581: 2247–2254.
- Avilés, Susana (2007). Papel del etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida Yucatán, México. 65pp
- Bárány, I., González-Melendi, P., Fadón, B., Mityko, J., Risueño, M.M. and Testillano, P.S. (2005) Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.) subcellular rearrangements through development. *Biology of the Cell* 97: 709–722.
- Bates LS. Waldren RP & Teare ID (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39: 205 – 207.

- Bello-Bello, J., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Gómez-Uc, E., Robert, M., Iglesias-Andreu, L.G. and Santana-Buzzy N. (2010) Improvement of *in vitro* proliferation and elongation of Habanero pepper shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. *Hortscience* (in press).
- Benelli C., Fabbri A., Grassi S., Lambardi M. and Rugini E. (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*O. europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 76: 112–119.
- Ben-Hayyim, G., (1987). Relationship between salt tolerance and resistance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured citrus cells. *Plant Physiology*. 85: 430-3.
- Bennici, A., Anzidei, M., Vendramin, G.G. (2003). Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant science*. 1-7.
- Benson, E. (2000) Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance *in vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 36: 141–148.
- Bewley JD. And Black M. (1985). Seed development and maturation. In: *Seeds: Physiology of Development and Germination*. New York. Plenum Press. 29 – 88.
- Binh, D.Q. and Heszky, L.E. (1990). Restoration of the regeneration potential of long-term cell culture in rice (*Oryza sativa* L.) by salt pretreatment. *J. Plant Physiol.* 136: 336.
- Binzel M., Sankhla N., Joshi S. and Sankhla D. (1996a). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*C. annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 536–540.

- Binzel, M. L.; Sankhla, N.; Joshi, S.; Sankhla, (1996b). D. *In vitro* regeneration in chile pepper (*Capsicum annuum* L.) from 'half-seed-explants'. Plant Growth Reg. 20: 287 - 293.
- Bosland, P. W., and Votava, E.J., (2000). Peppers: Vegetables and Spice *Capsicums*. Crop Production Science in Horticulture 12.CAB International Publishing, Wallingford, England, UK.pp 204.
- Bostock RM, Quatrano RS (1992). Regulation of Em gene expression in rice: interaction between osmotic stress and abscisic acid. Plant Physiol. 98: 1356–1363.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72: 248-254.
- Bressan, R.A., Singh, N.K., Handa, A.K., Kononowicz, A. and Hasegawa, P.M. (1985). Stable and unstable tolerance to NaCl in cultured tobacco cells. In: Freeling, M. (ed.) Plant genetics: Proceedings of third annual ARCO Plant Cell Research Institute –UCLA symposium on Plant Biology: New Series, A. R. Liss, New York. pp 755- 769.
- Bressan, R.A., N.K. Singh, A.K. Handa & R.Mount, (1987). Stability of altered genetic expression in cultured plant cells adapted to salt. In: L. Monti & E. Porceddu (Eds.), Drought Resistance in Plants, pp. 41–57. Commission of the European Communities, Brussels.
- BressanRay A., Bohnert Hans J. and Hasegawa P. Michael. (2008). Genetic Engineering for Salinity Stress Tolerance in:Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology.Elsevier. USA. pp.347-384.
- Brettell, R.I.S., Dennis, E.S., Scowcraft, W.R., Peacock, W.J. (1986). Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol Gen Genet. 202: 235-239.

- Buyukalaca, S.; Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant Regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss.Organ Cult.* 46: 227 – 235.
- Cano Emilio A., Francisco Perez- Alfocea, Moreno Vicente, and Bolarin Maria C.(1996). Responses to NaCl stress of cultivated and wild tomato species and their hybrids in callus cultures.*Plant Cell Reports.* 15: 791-794.
- Carraway D. and Merkle S. (1997).Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut.*Can. J. For. Res.* 27: 1805–1812.
- Chaman Medina Mercedes Elizabeth (2007).Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum* L. inducido por NaCl. *Amaldoa* 14 (2): 251- 258.
- Chamandoosti F. (2007). Effect of sodium chloride on establishment of callos and organogenesis in *Brassica napus* L. *Pakistan Journal of Biological Science.* 10(21): 3880 – 3884.
- Choi Y.E., Yang D.C., Yoon E.S. and Choi K.T. (1999).High efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos.*Plant Cell Rep.* 18: 493–499.
- Choi Y.E., Yang D.C., Kusano T. and Sano H. (2001).Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Panax ginseng* by plasmolyzing pre-treatment of cotyledons.*Plant Cell Rep.* 20: 616–621.
- Christopher, T., and Rajam, M. V., (1994), *In vitro* clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 38: 25-29.
- Christopher, T., and Rajam, M.V., (1996), Effect of genotype, explants and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46: 245-250.

- Close TJ (1997). Dehydrins: a commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* .100: 291–296.
- Corre F, Henry Y, Rode A, Hartmann C (1996). Em gene expression during somatic embryogenesis in the monocot *Triticum aestivum* L. *Plant Sci* 117: 139–149.
- Danyluk J, Houde M, Rassart E, Sarhan F (1994). Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant Gramineae species. *FEBS Lett* 344: 20–24.
- De Mejia G., E., Quintanar-Hernandez, A., and Loarca-Pina, G., (1998). Antimutagenic activity of carotenoids in green peppers against some nitroarenes. *Mutat. Res.* 416(1-2): 11-19.
- Dodeman VL, Ducreux G y Kreis M (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493 – 1509.
- Dong JZ, Dunstan DI (1996). Expression of abundant mRNAs during somatic embryogenesis of white spruce (*Picea glauca* (Moench)Voss). *Planta*. 199: 459–466.
- Dure LI, Crouch M, Harada J, Ho T-H D, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung ZR (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol Biol.* 12: 475–486.
- Ebida, A.I.A. and Hu, C.Y. (1993) *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*. 13: 107–110.
- Ericson, M. C., Alfinito, S. H. (1984). Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* 74: 506-9.
- Espelund Mari, Saebae-Larssen Stein, Wayne Hughes D, Galau Glenn A., Larsen Frank and Jakobsen Kjetill S. (1992). Late embryogenesis-abundant genes encoding

- proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid and osmotic stress. *The Plant Journal*. 2(2): 241-252.
- Ezura, H.; Nishimiya, S.; Kasumi, M. (1993). Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 12: 676 - 680.
- Ezura, H. (1997) Micropropagation of *Capsicum* species (pepper). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 39: 48-59.
- Fari, M. and Czako, M. (1981) Relationship between position and morphogenetic response of pepper hypocotyls explants cultured *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 15: 207-213.
- Feuser, S., Meler, K., Daquinta, M., Guerra, M.P. and Nodari, R.O. (2003). Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananus comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 221- 227.
- Foolad MR, Jones RA. (1993). Mapping salt-tolerance genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) using trait-based marker analysis. *Theoretical Applied Genetics*.87: 184 - 192.
- Franck-Duchenne, M., Wang, Y., Ben Tahar, S. and Beachy, RN. (1998) *In vitro* stem elongation of sweet 1344 pepper in media containing 24-epi-brassinolide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1345: 79-84.
- Freytag, A. M.; Wrather J.A.; Erichsen, A. W (1990). Salt tolerance sugarbeet progeny from tissues cultures challenged with multiple salts. *Plant Cell Rep.* 8: 647 – 650.
- Galiba, G. and Yamada, Y. (1988). A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissues culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Rep.* 7: 55.

- Gaubier P, Raynal M, Hull G, Huestis GM, Greller F, Arenas C, Pagès M, Delseny M (1993). Two different Em-like genes are expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds during maturation. *Mol Gen Genet*. 238: 409–418.
- George Edwin F., Hall Michael A. and De Klerk Geert-Jan (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. (3rd Edition) .Volume 1. 501 pp.
- Goldberg RB, Barker SJ, Peres-Grau L. (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*. 56: 149 – 60.
- González Estrada T., Gutiérrez Pacheco L. C. y Contreras Martín F. (2006). El chile habanero de Yucatán. *Ciencia y Desarrollo*. Mayo pp 9-15.
- Gulati, A. and Jaiwal, P. K. (1997). The potential of plant tissue culture and related techniques for the improvement of salt tolerance in higher plants., in P. K. Jaiwal, R. P. Singh, and A. Gulati (eds.), *Strategies for improving salt tolerance in higher plants*. Enfield, New Hampshire, USA: Sci. Publishers, Inc. pp. 321- 363.
- Gunay, A.L., and Rao, P.S., (1978). *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Sci. Letts.*, 11: 365-372.
- Haberlandt, G. (1902) Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, Math-Naturwiss. Kl.* 3: 69-92.
- Hadi, M.Z., Bridgen, M.P. (1996). Somaclonal variation as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fournieri* Compacta Blue. *Plant Cell Tiss and Org Cult*. 46:43-50.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Nelson, D. E., Samaras, Y., and Rhodes, D. (1994). Tissue culture in the improvement of salt tolerance in plants., in A. R. Yeo and T. J. Flowers (eds.), *Soil Mineral Stresses*, 21 Berlin: Springer-Verlag. pp. 83-125.

- Hasegawa, P.M., R.A., Bressan, J-K, Zhu, H.J., Bohnert. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.
- Harini, I., and Sita, G.L. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 89: 107-112.
- Harsh Nayyar. (2003). Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water-stressed wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) as affected by calcium and its antagonists. *Environmental and experimental botany.* 50 (3): 253-264.
- Husain, S., Jain, A. and Kothari, S. L. (1999) Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Reports* 19: 64-68.
- Hyde, C.L. and Phillips, G.C. (1996) Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration on chile pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32: 72-80.
- Jain, R. K.; Jain, S.; Nainawatee, H.S., *et al.* (1990). Salt-tolerance in *Brassica juncea* L. I. *In vitro* selection, agronomic evaluation and genetic stability. *Euphytica* 48: 141 - 152.
- Jayasankar S., Bondada B., Li Z. and Gray D. (2002). A unique morphotype of grapevine somatic embryos exhibits accelerated germination and early plant development. *Plant Cell Rep.* 20: 907-911.
- Jo, J.-Y., Choi, E.-Y., Choi, D., and Lee, K.-W. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant. Biol.* 39: 127-135.

- Joshi, A. and Kothari, S.L. (2007) High copper levels in the medium improve shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 88: 127–133.
- Junaid A., Mujib A., Bhat M. and Sharma M. (2006). Somatic embryo proliferation, maturation and germination in *C. roseus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 84: 325-332.
- Karami Omid y Saidi Abbas (2009). The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic Embryogenesis. *Mol Biol Rep. Springer*.
- Kant Surya And Kafkafi Uzi (2002). Potassium and Abiotic Stresses in Plants in: Potassium for sustainable crop production. pp. 233 – 251.
- Khan, H., Siddique, I., Anis, M., (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biol. Plant.* 50(4): 789-792.
- Kikuchi Akira, Sanuk Nobuya, Higashi Katsumi, Koshiha Tomokazu and Kamada Hiroshi. (2006). Absciscic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta*. 223: 637–645.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J.B. and Lymperopoulos, C. (2001) Effect of vitamins and inorganic micronutrient on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67: 55–62.
- Kochba, J., Ben-hayyim, G., Spiegel-roy, P., Neumann, H., and Saad, S., (1982). Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos of *C. sinensis* and *C. aurantium*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 106:111-18.
- Koleva-Gudevaa, L.R., Spasenokib, M. and Trajkovaa, F. (2007) Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media *Scientia Horticulturae* 111: 114–119.

- Kothari, S.L. Joshi, A. Kachhwaha, S and Ochoa-Alejo, N. (2009) Chilli peppers A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*. 20: 35-48.
- Krochko JE, Pramanik SK, Bewley JD.(1992). Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*. 99: 46 -53.
- Kumar, V., Gururaj, H.B., Prasad, N.B.C., Giridhar, P. and Ravishankar, G.A. (2005) Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Sci 1420 Horticulture Amsterdam* 106: 237-46.
- Laemmli Uk.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- LaRosa, P., Rhodes, D., Clithero, J., Watad, A., and Bressan, R. (1987). Absciscic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiology* 85: 174-181.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Leal I, Misra S, Atree SM, Fowke LC (1995). Effect of absciscic acid, osmoticum and desiccation on 11S storage protein gene expression in somatic embryos of white spruce. *Plant Sci.* 106: 121-128.
- Lebrun, L., Rajasekaran, K., and Mullins, M. G., (1983). Selection *in vitro* for NaCl tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of Botany*. 56: 733-9.
- Leidi Eduardo O. y Pardo José M. (2002). Tolerancia de los cultivos al estrés salino: qué hay de nuevo. Departamento de Biología Vegetal Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC Sevilla, España. Número II.

- López-Puc G.; Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P., Montalvo-Peniche M., Barahona-Perez F., Santana-Buzzy N. and Iglesias-Andreu L. (2006). Direct Somatic Embryogenesis: A Highly Efficient Protocol for *In Vitro* Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*. 41 (7): 1645-1650.
- Madhuri, V., Rajam, M.V. (1993) Apical shoot meristem culture in red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2: 67-68.
- Maoka, T., Mochida, K., Ito, Y., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Enjo, F., Ojata, M., Nobukumi, Y., Tokuda, H., and Nishino, H., (2001), Cancer chemopreventive activity of carotenoids in the fruits of red paprika *Capsicum annuum* L. *Cancer Letts.*, 172(2): 103-109.
- Marconi Patricia, Benavides María P., Caso Osvaldo H. (2001). Growth and physiological characterisation of regenerated potato (*Solanum tuberosum*) plants affected by NaCl stress. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 29: 45-50.
- Misra S, Green MJ.(1990). Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. I. Seed protein and protein body composition of mature embryo and the megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss). *Plant Science*. 68: 163 – 173.
- Misra S, Green MJ.(1991). Developmental gene expression in conifer embryogenesis and germination. II. Crystalloid protein synthesis in the developing embryo and megagametophyte of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss). *Plant Science*. 78: 61- 71.
- Misra, S., Attree S.R., Leal J. and Fowke L.C.(1993). Effect of abscisic acid, osmoticum and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Annals of Botany*. 71: 11 – 22.
- Misra N., Dwivedi UN.(2004). Genotypi difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Sci*. 166: 1135-1142.

- Mohamed A.N., Rahman M.H., Alsadon A.A. and Islam R. (2007). Accumulation of Proline in NaCl-treated Callus of Six Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Cultivars. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 17(2): 217-220.
- Mondal, T.K. and Chand, P.K. (2002). Detection of genetic variation among micro propagated tea *Camellia sinensis* (L. O.Kuntze) by RAPD analysis. *In vitro Cell. Biol.-Plant*, 38: 296-299.
- Montalvo-Peniche María del C., Iglesias-Andreu Lourdes G., Mijangos-Cortés Javier O., Nahuat-Dzib Sara L., Barahona-Pérez Felipe, Canto-Flick Adrina, Santana-Buzzy Nancy (2007). In Vitro Germplasm Conservation of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience*. 42(5): 1247-1252.
- Morris PC, Kumar A, Bowles DJ, Cuming AC (1990). Osmotic stress and abscisic acid induce expression of the wheat Em genes. *Eur J Biochem*. 190: 625-630.
- Morrison, R.A., Koning, R.E. and Evans, D.A. (1986) Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Journal of Plant Physiology* 126: 1-9.
- Munns R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ*. 28: 239-250.
- Munns Rana and Mark Tester (2008). Mechanisms and Salinity Tolerance. *Annu. Rep. Plant Biol.* 59: 651 - 681.
- Nickle C. and Yeung E. (1993). Failure to establish a functional shoot meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryos of *D. carota*. *Am. J. Bot.* 80: 128-1291.
- Nomura, K. and Komamine, A. (1986). Embryogenesis from microinjected single cells in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci.* 44: 53.

- Nuccio M.L., D. Rhodes, S. McNeil, A. Hanson, 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 128-134.
- Ochoa-Alejo, N., Ireta-Moreno, L., (1990), Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyls tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Scientia Hort.* 42: 21-28.
- Ochoa-Alejo, N. and Ramírez-Malagón, R. (2001) *In vitro* chilli pepper biotechnology. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 37: 701–729.
- Padmanabhan K., Cantliffe D., Harrell R. and McConnell D. (1998). A comparison of shoot-forming and non-shoot-forming somatic embryos of sweet potato (*I. batatas*) using computer vision histological analysis. *Plant Cell Rep.* 17: 685–692.
- Parida K.A., A.B. Das. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 60: 324-349.
- Peddaboina, V., Christopher, T., Subhash, K., (2006). *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. *Scientia Hort.*, 107(2): 117-122.
- Phillips, G.C., and Hubstenberger, J.F., (1985). Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4: 261-269.
- Pickersgill, B. (1984). Migrations of chili peppers, *Capsicum* spp., in the Americas. In *Pre-Columbian Plant Migration*; Stone, D., Ed.; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA. Volume 76, pp. 105-123.
- Queirós F., Fidalgo F., Santos I. and Salema R (2007). *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biología Plantarum*. 51 (4): 728-734.

- Ramanjulu S., C. Sudhakar. (2000). Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Journal of Plant Physiology* 157: 81-85.
- Ramirez-Malagon, R., and Ochoa-Alejo, N., (1996). An improved and reliable chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Rep.*, 16: 226-231.
- Remotti, P.C., (1998). Somaclonal variation and *in vitro* selection for crop improvement. In: S.M. Jain, D.S. Brar & B.S. Ahloowalia (Eds.), *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, pp. 169–201. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Richard S, Morency MJ, Drevet C, Jouanin L, Seguin A (2000). Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol Biol.* 43: 1–10.
- Rodríguez A. and Wetzstein H. (1994). The effect of auxin type and concentration on pecan (*C. illinoensis*) somatic embryo morphology and subsequent conversion in plants. *Plant Cell Rep.* 13: 607–611.
- Rouse DT, Marotta R, Parish RW (1996). Promoter and expression studies on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Lett* 381: 252–256.
- Rosas, H.G., Garcia, S.S., Reyes, G.R., Ontiveros, J.L.R. and Villasenor, A.C.R. (2003). Preliminary results on *in vitro* selection for tolerance to chloride excess in avocado. *Revista Chapingo Serie Horticulture* 9(1): 39-43.
- Rus, A., B. Lee, A. Muñoz, A. Sharkhuu, J. Zhu, R. Bressan, P. Hasegawa (2004). AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in plant. *Plant Physiology* 136: 2500-2511.

- Sabbah S & Tal M (1990) Development of callus and suspension cultures of potato resistant to NaCl and mannitol and their response to stress. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 21: 119–128
- Sabry, S.R.S., L.T. Smith & G.M. Smith, (1995). Osmoregulation in Spring wheat under drought and salinity stress. *J Genet & Breed* 49: 55–60.
- Samad, M.A., Begum, S., Majid, M.A. (2001). Somaclonal variation and irradiation in sugarcane calli for selection against red rot, water logged conditions and delayed or non-flowering characters. *IAEA-TECDOC-1227*: 45-50.
- Sanatombi, K. and Sharma G.J. (2008) *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. *Biology Plant.* 52: 141–145.
- Sanatombi, K., and Sharma, G.J. (2007) Micropropagation of *Capsicum Annuum* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 35: 57–64.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Barahona-Pérez, F., Montalvo-Peniche, M. C., Zapata-Castillo, P. Y., Solís-Ruiz, A., Zaldívar-Collí, A., Gutiérrez-Alonso, O. and Miranda-Ham, M. L. (2005) Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience.* 40 (31): 1829-1831.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias-Adreu, L., Montalvo-Peniche, M. C., López-Puc, G. and Barahona-Pérez, F. (2006) Improvement of in vitro culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience.* 41(2): 405- 409.
- Santana-Buzzy, N., López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Balam-Uc, E., Avilés-Viñas, S., Solís-Marroquín, D., Lecona-Guzmán, C., Bello-Bello, J.J., Gómez-Uc, E. and Mijangos-Cortés, J. (2009). Ontogenesis of the Somatic Embryogenesis of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience.* 44: 113–118.
- Santana-Buzzy, N., J.J. Bello-Bello, L. G. Iglesias-Andreu, J. J. Zúñiga-Aguilar, A. Canto-Flick, S. A. Avilés-Viñas, C. A. Lecona-Guzmán, D. Solís-Marroquín, E. Gómez-Uc, E. Balam-Uc, G. F. Arcos Ortega, J. O. Mijangos-Cortés. 2010. Chapter 24 Tissues

Culture of Capsicum species. In: Peppers: Botany, production and uses. (Ed. Vincent M. Russo). Edit. CABI. (IN EDITION)

Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi- Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression of profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* 31: 279–292.

Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. (1995). Seed storage protein: structure and biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 945 - 956.

Shinozaki, K. and Shinozaki-Yamaguchi, K. (1996). Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology.* 7 (2): 161-167.

Singh, N. K., Larosa, P. C., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1987). Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 84: 739-743.

Singh, N. K., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. (1985). Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 126-37.

Sivritepe, N., H.O. Sivritepe, A. Eris. (2003). The effects of NaCl priming on salt tolerance in melon seedling grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae.* 97: 229-237.

Stipp L., Mendes B., Piedad S. and Rodríguez A. (2001). *In vitro* morphogenesis of *C. melon* var. inodorus. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65: 81–89.

Suhasini K., Sagare A. and Krishnamurthy V. (1996). Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*C. arietinum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 6–10.

- Sumaryti, S.; Negrutin, I.; Jacobs, M. (1992). Characterization and regeneration of salt- and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). *Theor. Appl. Genet.* 83: 613 – 619.
- Stasolla Claudio, kong Lisheng, Yeung Edward C., and Thorpe Trevor A. Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology (2002). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38: 93–105.
- Steinitz B., Küsek M., Tabib Y., Paran I. and Zelcer A. (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 39: 296–303.
- Steinitz, B., Wolf, D., Matzevitch-Josef, T. and Zelcer, A. (1999) Regeneration *in vitro* and genetic transformation of pepper (*Capsicum* spp.) The current state of art *Capsicum* and Egg *Plant Newsletter*. 18: 9-15.
- Stipp L., Mendes B., Piedad S. and Rodríguez A. (2001). *In vitro* morphogenesis of *C. melon* var. *inodorus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65: 81–89.
- Suhasini K., Sagare A. and Krishnamurthy V. (1996). Study of aberrant morphologies and lack of conversion of somatic embryos of chickpea (*C. arietinum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32: 6–10.
- Stewart G R & Lee I A. (1974). The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*. 120: 279-89.
- Szasz, A., Nervo, G., and Fari, M., (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 Cell Rep.* 14: 666-669.

- Tal, M. (1994). *In vitro* selection for salt tolerance in crop plants - theoretical and practical considerations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 175-180.
- Tal M (1993). *In vitro* methodology for increasing tolerance in crop plant . Act Hortic. 336: 69 – 78.
- Tal M (1990). Somaclonal variation for salt resistance. In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 11. Somaclonal variation in crop improvement I. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 236 – 257.
- Tal, M. and Katz, A. (1980). Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: The effect of proline on the growth of callus tissue of *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* under salt and water stress. *Z. Pflanzenphysiol.* 98:283-288.
- Tester M., R. Davenport (2003). Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503 – 527.
- Thomas C., Bronner R., Molinier J., Prinsen E., Van Onckelen H. and Hahne G. (2002). Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflowers embryos. *Planta* 215: 577–583.
- Tomaz M., Mendes B., Filho F., Demetrio C., Jansakul N. and Rodríguez A. (2001). Somatic embryogenesis in *Citrus* spp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:446–45.
- Thorpe E. (1995). *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academia Publisher. Netherlands.
- Tuteja, N. (2007) Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology: Osmosensing and Osmosignaling*, 428: 419-438.

- Unnikrishnan S K., Prakash L., Josekutty P. C., Bhatt P. N. and Mehta A. R. (1991). Effect of NaCl Salinity on Somatic Embryo Development in *Sapindus trifoliatum* L. *Journal of Experimental Botany*. 42 (236): 401-406.
- Vajrabhaya, M; Thanapaisai, T; Vajrabhaya, T. (1989). Development of salt tolerant lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8: 411 – 414.
- Valera-Montero, L. L.; Ochoa-Alejo, N. (1992). A novel approach for chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Sci.* 84:215 - 219.
- Van Damme EJM, Peumans WJ (1996). Molecular cloning of two classes of Em-like proteins from the seeds of the leguminous tree *Robinia pseudoacacia*. *Tree Physiol.* 16: 841–845.
- Venkataiah, P., Christopher, T., and Subhash, K., (2003), Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. *J. Plant Biotech.*, 5(4): 245-250.
- Vertucci, C.W. y Farrant, J.M. (1995). Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J. & GALILI, G. (Eds) *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker. pp 237-271.
- Vicient CM, Roco TJ, Delseny M (1998). Characterization of an Em-like gene of *Brassica napus*. *J Exp Bot.* 49: 1061–1062.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Winicov, I. (1991.) Characterization of salt tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) Plants regenerated from salt tolerant cell-lines. *Plant Cell Reports*. 10:561-564.

- Winicov, I. (1996). Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt-tolerant cell lines. *Plant Sci.* 113: 105-111.
- Winicov, I. and Shirzadegan, M. (1997) Tissue specific modulation of salt inducible gene expression: Callus versus whole plant response in salt tolerant alfalfa. *Physiologia Plantarum*. 100: 314-319.
- Xing, W. and Rajashekar, C.B. (2001). Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Expt Bot.* 46: 21-28.
- Xiong, L., Schumaker, K. S., and Zhu, J.-K. (2002). Cell signaling during cold, drought and salt stress. *Plant Cell* 14: S165–S183.
- Yen, H. C. E. and Yen, S. K. (1999). Effect of high salinity on tracheary element differentiation in light-grown callus of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 58: 59-65.
- Zapata-Castillo, Y. P., A. Canto-Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz., F. Barahona-Pérez and N. Santana-Buzzy. (2007). Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*C. chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. *HortScience*, 42(2): 1-5.
- Zarco Padron de Coronado, I (2004). La capsaicina del molcajete al cerebro. *Cuadernos de nutrición*. 27: 68 – 81.
- Zavattieri, Maria Amely; Frederico, António Miguel; Lima, Mónica; Sabino, Rui; Arnholdt-Schmitt, Birgit. (2010). Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*. 13 (1): 1-9.
- Zhu, J.-K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. 6: 66-71.
- Zhu, J.K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 441-445.

Zimmerman J Lynn. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*. 5: 1411-1423.

CAPÍTULO II

Este capítulo se presenta en forma de un manuscrito aceptado para su publicación en la revista Hortscience. En él se describe detalladamente los resultados de los experimentos realizados para el cumplimiento de los objetivos planteados en la tesis.

IN VITRO SELECTION OF A SALT TOLERANT EMBRYOGENIC LINE IN HABANERO PEPPER (*Capsicum chinense* Jacq.)

Daniela Solís-Marroquín, Carlos A. Lecona-Guzmán, Adriana Canto-Flick, Jericó Jabín Bello-Bello, and Nancy Santana-Buzzy¹

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, 97200, México

Lourdes Iglesias-Andreu

Laboratorio de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101. Colonia Emiliano Zapata, CP.91090, Jalapa, Veracruz, México

¹To whom reprint requests should be addressed; e-mail buzzy@cicy.mx.

Additional index words. Habanero pepper (*Capsicum chinense*), NaCl stress, somatic embryo, survival, salinity tolerance

2.1 ABSTRACT

The effect of NaCl salinity on growth and development of somatic embryos of Habanero pepper (*Capsicum chinense*) was examined. Incorporation of 75 and 100 mM NaCl into the medium greatly increased the growth and development of somatic embryos and both these concentrations favored the production of secondary embryos. However, supplementation of 200 and 300 mM NaCl to the medium showed a negative effect on the growth and development of somatic embryos. Increased concentrations of NaCl provoked a significant reduction in the survival rate of embryos; the average lethal dose (was 46%). Furthermore, a lower tolerance to salt stress (NaCl) was observed in deformed somatic embryos. Concentrations of 200 and 300 mM NaCl significantly delayed development in the surviving embryos, in both treatments. These embryos remained at the globular stage throughout culture. At 75 mM NaCl, most of the embryos were observed in the torpedo and cotyledonary stages. However, the embryos exposed to 100 mM NaCl were observed mainly in the globular and cotyledonary stages. It is quite likely that the transition from one intermediate stage of development to another occurs rapidly. With the exception of the concentration at 300 mM NaCl, salt stress stimulated embryonic germination, particularly at 100 mM NaCl. The content of proline in somatic embryos increased substantially in response to salinization. The analysis with molecular markers RAPDs showed the loss of two bands in the DNA profile of embryos subjected to 100 mM NaCl; these bands were present in the other treatments, including the control. The results suggest that somatic embryos of *C. chinense* can tolerate concentrations of NaCl up to 100 mM without affected their development. Moreover, they have sufficient cellular mechanisms to tolerate salinity at relatively higher levels.

2.2 INTRODUCTION

Salinity has been recognized as a major factor limiting crop productivity, especially in irrigated areas. It is estimated that of the earth's surface, about 400 million hectares of land are affected by salinity (Flowers et al., 1977). The increase of salt concentration in the soil is one of the most serious environmental threats to plant survival. It is estimated that a third of all arable land on Earth is arid or semiarid, and half of the arid regions under risk

are affected by salinity. It also represents one of the most important problems for the growth and development of cultivated plants; gravely affecting successful crop production (Munns, 2002). According to data reported by the FAO (2005), a large percentage of land dedicated to agriculture in the world is naturally saline (21%) or can be salinized (19.5%) through inadequate irrigation practices (Chinnusamy and Zhu, 2003). Some reports confirm that salt stress can bring about physiological, biochemical and genetic changes in plants (Dajic, 2006).

In vitro culture is a very useful tool to evaluate the effect of salinity and to select salt tolerant varieties in plant species (Queirós et al., 2007; Davenport et al., 2003). The method of *selection under pressure* has been used to obtain salt tolerant somatic embryos in species such as, *Vitis* (Lebrun et al., 1985), wheat (Galiba and Yamada, 1988), *Brassica juncea* (Kirti, et al., 1991), wheat (Arzani y Mirodjagh, 1999), eggplant (Mukherjee, 2002), maíz (Urechian, 2003), *Triticum durum* (Zair et al., 2003), sugar cane (Gandonou et al., 2005). Unnikrishnan et al. (1991) reported that somatic embryos of *S. trifoliatum* can tolerate high concentrations of NaCl without affecting growth. The aim of this study was to evaluate the effect of different NaCl concentrations on the development of somatic embryos in Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.).

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 Preparation of plant material. Seeds of Habanero pepper cv. Mayan Ba' alché were surface sterilized with a solution of ethanol at 70% for 5 min, rinsed three times in sterile distilled water, soaked in a solution of commercial sodium hypochlorite at 13% for 15 min, and rinsed again three times (1 min) in sterile distilled water. The sterile seeds were cultured in glass jars with 20 mL germination medium composed of mineral salts recommended by Murashige and Skoog (MS; Anexo 1) (1962), supplemented with 1.156 μM GA₃, 3% sucrose and 0.2% gelrite. The pH was adjusted to 5.7 before sterilization in autoclave. The cultures were incubated in darkness for 7 d to accelerate germination. After the seeds had germinated, they were transferred to a 16-h photoperiod (40 – 50 μmol

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) at 25 ± 2 °C. The hypocotyls were extracted from the dissection of plantlets at 15 d of germination.

2.3.2 Induction of somatic embryogenesis. In order to induce somatic embryogenesis, hypocotyl explants were cultured in the salts recommended by Murashige and Skoog (MS) (1962) and were always supplemented with 9.05 μM 2,4-D, 3% sucrose, 206.35 μM cysteine-HCl, 554.93 μM myo-inositol and 29.64 μM thiamine-HCl. The media were solidified with 0.2% gelrite and the pH was adjusted to 5.8 before they were sterilized in autoclave (121 °C for 15 min). The cultures were incubated at 25 ± 2 °C, under continuous light conditions ($40 - 50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) for 30 d.

2.3.3 Evaluation of the effect of NaCl on SE (somatic embryogenesis) development. In order to evaluate the effect of NaCl on somatic embryo development, different concentrations of NaCl (0, 75, 100, 250 and 300 mM; Anexo 2) were added to the medium MS supplemented with 4.5 μM 2,4-D, 3% sucrose, 206.35 μM cysteine-HCl, 554.93 μM myo-inositol and 29.64 μM thiamine-HCl. After 30 d, fully developed embryos were collected and used for evaluation:

2.3.4 Normal, deformed and dead embryos (%). All embryos were counted with a stereoscope Nikon and were registered with photographic evidence.

2.3.5 Dry weight and water contents. After 30 d of salt culturing, fresh and dry weights were recorded. One portion of somatic embryos was lyophilized and the water content was calculated according to $(\text{fw} - \text{dw}) / \text{fw}$; where dw was dry mass.

2.3.6 Germination of somatic embryos (%). After pretreatment with NaCl, the somatic embryos were transferred to germination liquid medium (50 mL) composed of MS salts, 1.156 μM GA_3 and 3% sucrose. The liquid medium (50 mL) was incubated in darkness for 15 d and continuous light for 15 d at 25 ± 2 °C.

2.3.7 Proline determination. Free proline content was determined according to Bates et al. (1973). 100 mg of dry weight of somatic embryos was homogenized in 3% aqueous sulphosalicylic acid and was filtered (Whatman No. 1 paper). The supernatant was mixed

with acid ninhydrin and glacial acetic acid in a test tube and boiled at 100 °C for 1 h. The reaction was stopped by cooling the tubes in an ice bath. The chromophore formed was extracted with toluene and the absorbance of the resulting organic layer was measured at 520 nm (Genesis 10uv). The concentration of proline was estimated by referring to a standard curve prepared using L-proline.

2.3.8 Determination of ion content. Oven-dried somatic embryos were digested in 200 mM HCl and 10 mM MgCl₂ for 12 h. After complete digestion of the sample, the final volume was adjusted to 50 mL with distilled water and the contents of Na⁺ and K⁺ were determined by inductively coupled plasma emission mass spectroscopy (Perkin-Elmer PE3100).

2.3.9 Protein extraction. Somatic embryos (100 mg) were homogenized at 4 °C with 300 µL of extraction buffer [(11 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.45 mM polyvinylpyrrolidone (PVP-40), 0.75 mM sucrose, 0.042 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.002 mM ascorbic acid, 0.005 mM bovine serum albumin (BSA), 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂]. The homogenate was vortexed for 5 min and centrifuged at 13 000 rpm for 10 min. The supernatant obtained was used for estimation of protein content (Bradford, 1976).

2.3.10 Protein electrophoresis. The total protein equivalent to 4 µg was subjected to SDS-PAGE (12.5% polyacrylamide) at 24 °C for 3 h at a constant current of 160 V (Laemmli, 1970). The protein gels were stained with silver (Anexo 3) and relative molecular weights were determined by running standard molecular weight marker mix (Invitrogen).

2.3.11 DNA extraction and RAPD analysis. DNA isolation was performed using the SDS method (Anexos 4 y 5). RAPD was performed as described by Williams et al. (1990) with minor modifications. Briefly, PCR amplification was performed in 30 µL reaction mix containing 100 ng genomic DNA, 0.5 unit Taq polymerase, 200 mM each of dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 pmole random primer (Operon) and appropriate amplification buffer. The mixture was assembled on ice. Amplification was performed for 45 cycles using My cycler BIORAD thermal cycler, as follows: One cycle at 92 °C for 1 min and then 45 cycles at 94

°C for 1 min, 34 o 32 °C for 1 min and 72 °C for 2 min (for denaturation, annealing and extension, respectively). Reaction was finally incubated at 72 °C for 7 min and a further 10 min at 4 °C. Four random decamer oligonucleotide primers (OPK4, OPK6, OPK9 and OPK19; Anexo 6) were used for RAPD analysis based on their ability to amplify *C. chinense* genome and provide reproducible amplification patterns. **Agarose electrophoresis.** The amplification products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose in TBE buffer, stained with 0.3 mg/mL ethidium bromide and photographed under UV light. One marker was used, i.e. 1 kbp DNA ladder (Invitrogen).

2.3.12 Data registered and Statistical analysis. All experiments were repeated at least three times. Each treatment was photographed with a Kodak camera. All the data were subjected to analysis of variance (ANOVA) of simple classification, significance was determined at 95% confidence level, Tukey test (SPSS 16.0). The graphics were plotted with SigmaPlot 11.0 program.

2.4. RESULTS AND DISCUSSION

2.4.1 Effect of NaCl on the survival and development of somatic embryos. The results obtained from exposing Habanero pepper somatic embryos (SEs) to different concentrations of NaCl showed significant differences between treatments for all the variables evaluated, in comparison with the control treatment (Figure 2.1a; Anexo 7). Embryo survival declined as the concentration of NaCl was increased in the culture medium. At 100 mM NaCl, the survival rate was 46%. Higher concentrations of NaCl provoked a drastic reduction in embryo survival. Deformed embryos showed greater sensitivity to salt stress in comparison with normal embryos and were unable to survive concentrations above 100 mM NaCl. Embryo development was also affected by the concentration of NaCl in the culture medium. In Figure 2.1b (Anexo 7) we can see that, at concentrations of 200 and 300 mM NaCl, most of the surviving somatic embryos were at the globular stage, while at 75 and 100 mM NaCl, the most abundant stages were torpedo and cotyledonary, respectively. Similar results were reported by Rai (2010) working with somatic embryos of guava subjected to 150 – 200 mM NaCl in the culture medium.

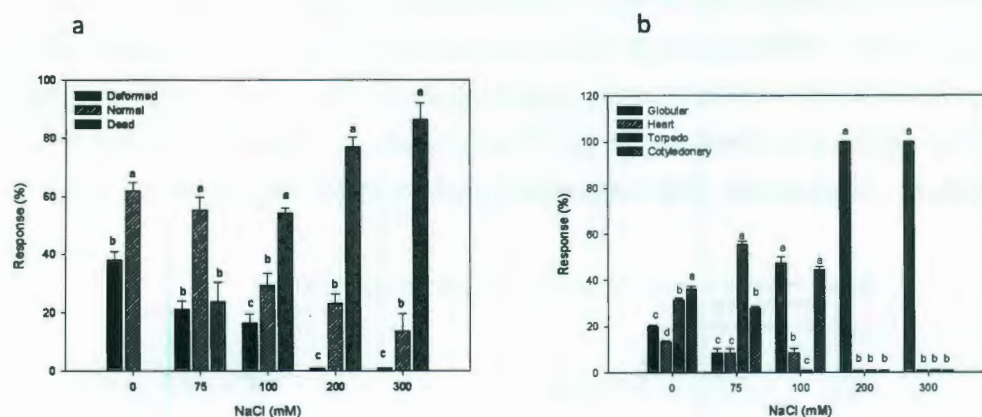


Figure 2.1 Effect of different saline concentrations on somatic embryos of *Capsicum chinense*: (a) Deformed, normal and dead SEs; (b) Developmental stages. Error bars indicate standard error (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at $P \leq 0.05$.

In contrast with the survival rate, both development and quality of the somatic embryos were actually favored by increased concentrations of NaCl in the culture medium, particularly in the 75 and 100 mM NaCl treatments, at 3 weeks of culture (Fig. 2.2-I: a-e). At 6 weeks of culture, a significant reduction in the number of somatic embryos was observed (Fig. 2.2-II: a-e).

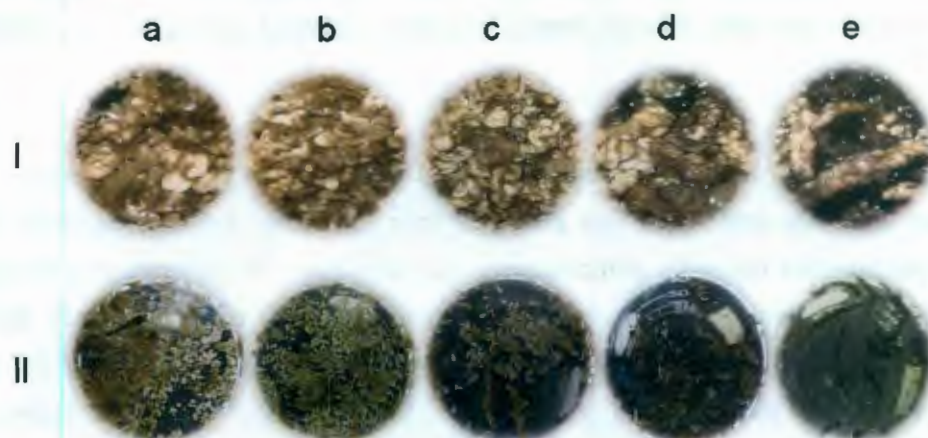


Figure 2.2 Effect of different concentrations of NaCl (a, 0 mM; b, 75 mM; c, 100 mM; d, 200 mM; and e, 300 mM) on: I) quality and development (3 weeks of culture); II) survival (6 weeks of culture).

2.4.2 Behavior of dry weight and water content in SEs. As shown in Figure 2.3, water content fell significantly while dry weight (dw) increased in the somatic embryos exposed to increasing concentrations of NaCl in the culture medium. These results were accorded with Errabii et al. (2007) and Ahmad et al. (2007) who analyzed callus of *Saccharum* sp. and *Oryza sativa* L., respectively, after subjecting them to different concentrations of NaCl.

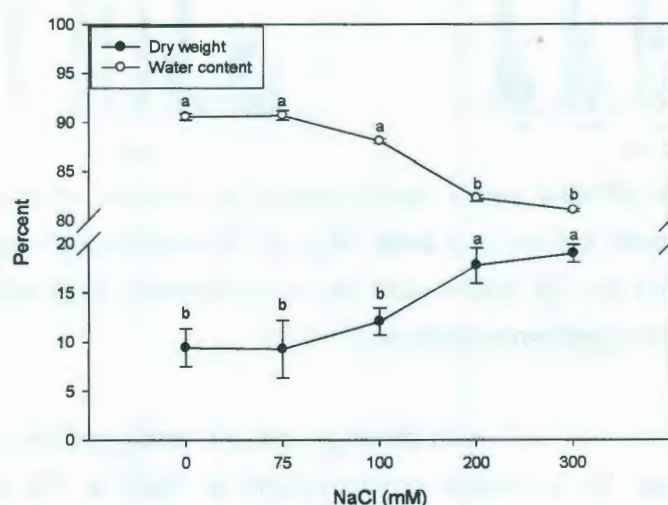


Figura 2.3 Water content and dry weight in somatic embryos of *C. chinense* subjected to different concentrations of NaCl. Error bars indicate standard error ($n = 3$). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at $P \leq 0.05$.

2.4.3 Germination of SEs subjected to salt stress (NaCl). With the exception of the treatment with 300 mM NaCl, the embryos from the other saline treatments showed greater germination capacity, particularly in root formation, in comparison with embryos from the control treatment (Fig. 2.4a). Embryos subjected to 75 mM NaCl presented profuse rooting, with very long disproportionate roots in relation to the size of the embryo (Fig. 2.4b), while the embryos treated with 100 and 200 mM NaCl formed well-proportioned roots and cotyledons (Fig. 2.4c and d). However, conversion to plantlet was not observed. Embryos from the treatment with 300 mM NaCl did not germinate (Fig. 2.4e). Figure 2.5 shows germinated embryos after treatment with 100mM NaCl. These

results allow us to infer that salt stress (NaCl) can substantially improve somatic embryo germination of a species (*C. chinense*), widely recognized as recalcitrant to germination and conversion to plants.

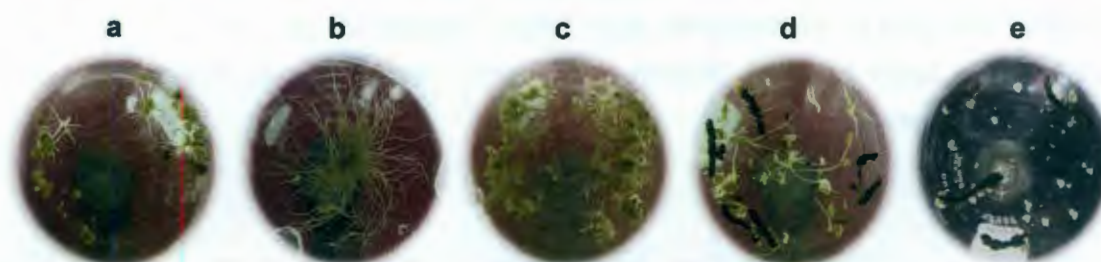


Figure 2.4 Germination of Habanero pepper somatic embryos after treatment with NaCl and transfer to germination medium (MS + GA₃). a, 0 mM NaCl; b, 75 mM NaCl; c, 100 mM NaCl; d, 200 mM NaCl; and e, 300 mM NaCl.



Figure 2.5 Germination of Habanero pepper somatic embryos from the treatment containing 100 mM NaCl.

2.4.4 Behavior of Proline content in SEs. Proline content in somatic embryos significantly increased in response to concentrations of NaCl in the culture medium (Fig. 2.6), if we compare 0 mM NaCl treatment with the highest concentration of NaCl (300 mM) in the liquid medium, we obtained 1.71 $\mu\text{mole proline / g dw}$ vs. 196.11 $\mu\text{mole proline / g dw}$, respectively.

In plants, a common response to osmotic stress is the accumulation of compatible osmolytes. According to Mademba et al. (2003), proline accumulation helps to stabilize

proteins at high ionic strength or at low water activity. Several studies have shown that exposure to increasing sodium chloride concentrations caused an increase in proline content in *Hordeum marinum* and *Hordeum vulgare* (Garthwaite et al., 2005), date palm callus (Al-Khayri, 2002); *Carrizo citrange* (Arbona et al., 2003); somatic embryos of *Sapindus trifoliatus* L. (Unnikrishnan et al., 1991); *Saccharum* sp. callus (Errabii et al., 2007); *Oryza sativa* L. callus (Ahmad et al., 2007); and *Phaseolus vulgaris*, L. callus (Stoeva and Kaymakanova, 2008).

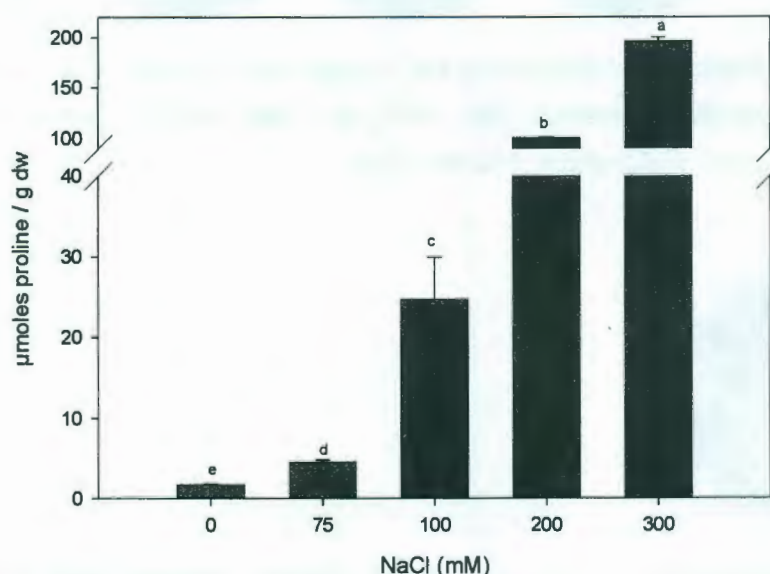


Figure 2.6 Proline content in somatic embryos of *C. chinense* subjected to different concentrations (NaCl). Error bars indicate standard error ($n = 3$). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at $P \leq 0.05$.

2.4.5 Sodium and potassium content in somatic embryos under salt stress. With increasing concentrations of NaCl in the medium, the level of K^+ in somatic embryos declined, whereas Na^+ content increased significantly (Table 2.1). The results of the present study may be interpreted on the basis of an earlier assumption that the excess of Na^+ compensates for the loss of K^+ ions (Kumar et al., 2008). The analysis of K^+ content

results shows that the treatments at 75, 100 and 200 mM NaCl differed significantly from the control treatment (0 mM NaCl) but showed no difference between each other. The Na^+ content in the same treatments, on the other hand, increased between 7 and 25 times, with respect to the control treatment (0 mM NaCl). The lowest K^+ content was registered in the treatment with the highest concentration of NaCl (300 mM). The highest Na^+ content was also detected at this concentration, differing significantly from the other treatments, including the control. According to several reports, (Slonov, 1986; Udovenko and Evdokimov, 1970; Mansour et al., 1993), the mechanism of ion binding to cytoplasmic proteins might solve the problem of Na^+ concentration in tolerant protoplasm, as it may operate with specific cytoplasmic proteins. Plant and Bray (1999) reported that many of the proteins synthesized under salinity have unknown functions, and some of them are cytosolic. Some of these proteins may be suitable for ion binding to alleviate ion toxicity in the cytoplasm of tolerant plants. Therefore, salt tolerant genotypes are believed to intercept and immobilize Na^+ in a confined volume of cytoplasm. In this way, sensitive elements of the cell protoplasm are protected from direct and indirect toxic influences of Na^+ . Sensitive cultivars would presumably lack this ability to immobilize Na^+ , thus leading to a high Na^+ level in the cytoplasm. In parallel with Na accumulation and a decline in K^+ content, the Na^+/K^+ ratio increased at all concentrations of NaCl. The increase in Na^+ content of cells was accompanied by a decrease in K^+ accumulation and differences in Na^+/K^+ ratio under saline conditions. Similar results were reported by Cherian and Reddy (2003). According to Apse et al. (1999), potassium plays a role in many enzymatic activities in plant cell, and maintaining cytosolic Na^+/K^+ ratio is a key requirement for growth under high saline conditions.

Table 2.1 Sodium and potassium content in somatic embryos of *C. chinense* subjected to different concentrations of NaCl. Error bars indicate standard error ($n = 3$). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at $P \leq 0.05$.

NaCl concentration (mM)	K ⁺ content ($\mu\text{g} / \text{g dw}$)	Na ⁺ content ($\mu\text{g} / \text{g dw}$)	Na ⁺ /K ⁺ index
0	18 $\pm$ 0a	2.9 $\pm$ 0.5 ^a	0.16
75	9.6 $\pm$ 0.3b	14.54 $\pm$ 0.8b	1.51
100	10 $\pm$ 0.3b	47.6 $\pm$ 2.4c	4.76
200	8 $\pm$ 2.5b	50 $\pm$ 3c	6.25
300	1.1 $\pm$ 0.9c	60 $\pm$ 1.5d	54.54

2.4.6 Effect of saline stress on protein content and SDS-PAGE protein patterns of somatic embryos. The effect of saline stress on protein content of somatic embryos subjected to different concentrations of NaCl during their development is shown in Table 2.2. A gradual increase in protein content is observed in response to an increment in NaCl concentration in the culture media. Protein content was observed in a range of 11.06 - 15.16 μg protein / mg fw, with the concentration of 300 mM NaCl provoking the highest protein content in somatic embryos. These results also concur with those reported by Bekheet et al. (2000) on *Asparagus officinalis*. They found a positive correlation between protein content of callus cultures and salt stress level in culture medium. In this connection, Poljakoff-Mayber (1982) reported that osmotic adaptation under salinity stress may be achieved by ion uptake or by internal synthesis and accumulation of organic solutes. Dubey (1994) reported that the marked increase in protein content in callus cultures grown on saline media may be due to synthesis of new proteins (osmoprotectant protein) or inactivation of proteolytic enzymes. Under stress conditions, some proteins that specifically respond to stress are induced in many plants, although both the expression and function of such proteins are unclear. It has been suggested that there is a relationship between some forms of plant adaptation and tolerance to stresses and the expression of stress induced proteins. In the SDS-PAGE analysis, 40 bands were

observed in a range of molecular weights from 200 to 6 kDa (Fig. 2.7). Somatic embryos of *Capsicum chinense* Jacq. exposed to salt stress, showed differences in the expression of peptides with molecular weights of 60.95, 56.44 and 7.5 kDa in response to increasing concentrations of NaCl in the medium. Similar behavior has been reported in *Jatropha curcas* (Kumar et al., 2008), *Trigonella* (Niknam et al., 2006) and *Solanum tuberosum* (Queirós F. et al., 2007). New bands were observed in somatic embryos exposed to 200 and 300 mM NaCl, respectively, with molecular weights of 43, 35.2, 34, 19.2, 17 and 7.5 kDa.

Table 2.2 Variation in the protein content of somatic embryos treated with different concentrations of NaCl. Error bars indicate standard error (n = 3). Within each set of experiments, bars with different letters on same treatment are significantly different at P<0.05.

NaCl concentration (mM)	Protein content (µg / g fw)
0	11.06. $\pm$ 0.91bc
75	10.2 $\pm$ 0.45c
100	11.6 $\pm$ 0.59bc
200	13.82. $\pm$ 0.68ab
300	15.16 $\pm$ 0.36 ^a

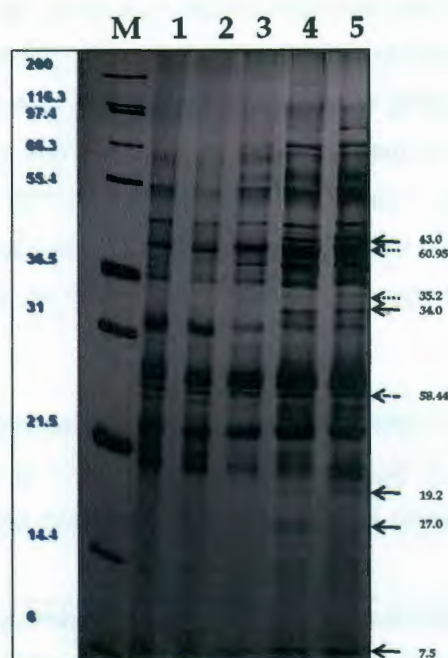


Figure 2.7 SDS-PAGE profiles of proteins in somatic embryos of *Capsicum chinense* under different concentrations of NaCl, carril: 1, 0 mM NaCl; 2, 75 mM NaCl; 3, 100 mM NaCl; 4, 200 mM NaCl; and 5, 300 mM NaCl.

Similar results were reported by Queirós et al. (2007), who also detected the presence of new polypeptides with molecular weights of 32.3 and 34 kDa in potato callus subjected to salt stress. These polypeptides are probably related to CDSP proteins of 32 and 34 kDa, identified in potato plants subjected to water stress (Pruvot et al., 1996a) and subsequently observed plants of the same species cultivated under salt stress conditions. From this we can infer that these proteins might be associated with tolerance to osmotic stress (Pruvot et al., 1996b). Mikolajczyk (2000) observed a band of 43.4 kD which could be related to a kinase protein of 42 kD; this protein activates rapidly in response to hyper-osmotic stress during the culture of tobacco cells. The late embryogenesis abundant-like proteins (LEA) accumulate in the vegetative tissues of all plant species in response to osmotic stress, caused by drought, salinity or cold (Xiong and Zhu, 2002). Several salt-induced proteins have been identified in plant species and have been classified into two distinct groups (Mansour, 2000; Pareek et al., 1997; Ali et al., 1999); salt stress proteins, which accumulate only due to salt stress, and stress associated proteins, which also accumulate

in response to heat, cold, drought, water-logging, and high and low mineral nutrients. Proteins that accumulate in plants grown under saline conditions may provide a storage form of nitrogen that is reutilized when stress is over (Singh et al., 1987) and may play a role in osmotic adjustment. Proteins may be synthesized de novo in response to salt stress or may be present constitutively at a low concentration and increase when plants are exposed to salt stress (Pareek et al., 1997).

2.4.7 RAPDs profiles in somatic embryos of Habanero pepper under stress by NaCl.

Eleven primers of the Operon series were tested to find RAPD markers that revealed DNA polymorphism between embryonic salt-tolerant lines preceded different treatment. Only one primer (OPK6) showed differences. The rapid profile showed a loss of two bands in the embryonic salt-tolerant line (100 mM NaCl) compared to control (Fig. 8). Both bands of about 4000 and 4200 kb were isolated for future analysis.

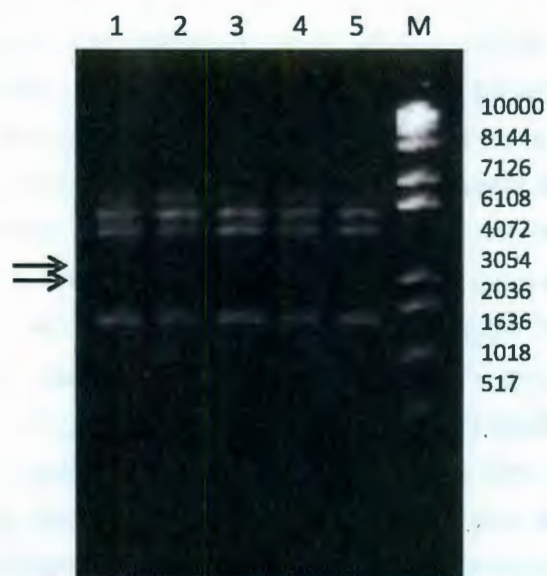


Fig. 2.8 RAPD profiles of DNA extracted from somatic embryos of *C. chinense*, treated with and without salt, with the primer 06 (b). M, marcador; 1, 0 mM NaCl; 2, 75 mM NaCl; 3, 100 mM NaCl; 4, 200mM NaCl; and 5, 300 mM NaCl.

2.5 DISCUSSION

Plants respond to salt stress at three different levels, i.e., cellular, tissue and whole plant level (Borsani et al., 2003). The separate study of each level of response is the best way to correctly place the pieces in order to understand the whole picture of salt tolerance. However, as plant cells become specialized during ontogeny, it is clear that the adaptive mechanisms to tolerate salt stress may be different. Cell-based mechanisms of ion homeostasis and the synthesis of osmoprotectants are essential determinants for salt tolerance. Integration and coordination of the responses of cells, tissues, and organs are required for a proper tolerance to salt stress. Moreover, because salt tolerance is regulated throughout plant development and is a tissues specific phenomenon, plant tolerance responses at one stage of development are not necessarily the same at other stages (Johnson et al., 1992; Lauchli and Epstein, 1990). Therefore, the mechanisms of tolerance at specific stages of plant development must be studied in order to understand the biochemical events that play important roles in the responses to salt stress (Borsani et al., 2001).

There are a large number of reports in the literature claiming that plants with increased salt tolerance have been obtained. The main problem is that the different plant species, developmental stages, organs, promoters and salt conditions involved, make it difficult to compare the degree of salt tolerance conferred by different genes (Borsani et al., 2003).

Detecting genetic variation from morphological features is quite difficult; the variants may have genetic or epigenetic basis, therefore, early detection of these is of prime importance. Consequently, detection of variants at DNA level is particularly useful in order to obtain *in vitro* selected lines for crop improvement. Among the different molecular techniques, RAPD is widely used to study the variation at DNA level among the variants (Rout et al., 1998; Soniya et al., 2001 and Bennici et al., 2003). The detection of some polymorphic bands in the selected line, only reported in this study, concur with a study by Saif et al. (2001) on genetic variation detection using RAPD technique in irradiated with gamma rays from a ⁶⁰Co-source and salt stressed sugarcane calli and multiplication potato *in vitro* from nodal segments potato (200mM NaCl).

In our study, RAPD analysis of genetic variation in a selected salinity tolerant embryogenic line suggested that the variation can be detected at an early developmental stage of somatic embryos, even before conversion into plant and hardening in the green house. It is clear therefore, that *in vitro* selection conditions have induced varied amount of genetic

changes among the selected salt tolerant lines. The reported variation at DNA level can be attributed to somaclonal variations. Cellular and molecular mechanisms behind the variations are mitotic irregularities leading to chromosomal instability, occurrence of gene amplification or deletion, gene inactivation or reactivation of silent genes, and DNA methylation in the case of epigenetic variation and point mutations.

2.6 ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CONACYT and FOMIX.

2.7 LITERATURE CITED

1. Al-khayri, J.M. 2002. Growth proline accumulation, and ion content in sodium chloride-stressed callus of date palm. *In vitro Cellular and Development Biology-Plant* 38:79-82.
2. Ali, G., P.S. Srivastava, and M. Iqbal. 1999. Proline accumulation, protein pattern and photosynthesis in regenerants grown under NaCl stress. *Biol. Plant* 42:89-95.
3. Ahmad, M.S.A., F. Javed, and M. Ashraf. 2007. Iso-osmotic effect of NaCl and PEG on growth, cations and free proline accumulation in callus tissue of two indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Plant Growth Regul.* 53:53-63.
4. Apse, M.P., G.S. Aharon, W.A. Snedden, and E. Blumwald. 1999. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* 285:256-1258.
5. Arbona, V., V. Flors, J. Jacas, P. García-agustín, and A. Gomez-Cadenas. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiology* 44:388-394.
6. Arzani, A., and S.-S. Mirodjagh. 1999. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 58:67-72.
7. Bates, L.S., R.P. Waldren, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.

8. Bekheet, S.A., H.S. Taha, E.S. Sawires, and M.K. El-Bahr. 2000. Salt stress in tissue cultures of *Asparagus officinalis*. *Egyp. J. Hort.* 27:275-287.
9. Bennici, A., M. Anzidei, and G.G. Vendramin. 2003. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryo-genesis. *Plant Sci.* 33:1-7.
10. Borsani, O., J. Cuartero, J.A. Fernandez, V. Valpuesta, and M.A. Botella. 2001. Identification of two loci in tomato reveals distinct mechanisms for salt tolerance. *Plant Cell* 13:873-888.
11. Borsani, O., V. Valpuesta, M.A. Botella,. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73:101-115.
12. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
13. Cherian, S., and M.P. Reddy. 2003. Evaluation of NaCl tolerance in callus cultures of *Suaeda nudiflora* Moq. *Biol. Plant* 46:193-198.
14. Chinnusamy, V., and J.-K. Zhu. 2003. Plant salt tolerance, p. 241-270. In: H. Hirt, K. Shinozaki (eds.) *Plant Responses To Abiotic Stress*. Vo. 4. Springer-Verlag, Berlin.
15. Dajic, Z. 2006. Salt stress, p. 41-99. In: K.V. Madhava, A.S. Raghavendra and K. Janardhan (eds.). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, Netherlands.
16. Davenport, S.B., S.M. Gallego, M.P. Benavides, and M.L. Tomaro. 2003. Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells. *Plant Growth Regul.* 40:81-88.
17. Dubey, R. 1994. Protein synthesis by plants under stressful conditions. p. 277-299. In: P. Mohommad (ed). *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker, New York.
18. Errabii, T., C.B. Gandonou, H. Essalman, J. Abrin, M. Idaomar, and N.S. Senhaji. 2007. Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures. *Acta Physiol Plant* 29:95-102.
19. FAO. 2005. Global network on integrated soil management for sustainable use of sal-affected soil. <http://fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>

20. Flowers, T.J., P.F. Troke, and A.R. Yeo. 1977. The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 28:89-121.
21. Garthwaite, A., R.J. Von bothmer, and T.D. Colmer. 2005. Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots. *Journal of Experimental Botany* 56:2365-2378.
22. Galiba, G., and Y. Yamada. 1988. A novel method for increasing the frequency of somatic embryogenesis in wheat tissues culture by NaCl and KCl supplementation. *Plant Cell Rep.* 7:55-58.
23. Gandonou, C., J. Abrini, M. Idaomar, and N.S. Senhaji. 2005. Response of sugarcane (*Saccharum* sp.) varieties to embryogenic callus induction and in vitro salt stress. *African Journal of Biotechnology* 4:350-354.
24. Johnson, D., S. Smith, and A. Dobrenz. 1992. Genetic and phenotypic relationships in response to NaCl at different developmental stages in alfalfa. *Theor. Appl. Gen.* 83:833-838.
25. Kirti, P.B., S. Hadi, P.A. Kumar, and V.L. Chopra. 1991. Production of sodium-chloride-tolerant *Brassica juncea* plants by in vitro selection at the somatic embryos level. *Theor. Appl. Genet.* 83:233-237.
26. Kumar, N., S.D.V.N. Pamidimarri, M. Kaur, G. Boricha, and M.P. Reddy. 2008. Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. *Biologia* 63:378-382.
27. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
28. Lauchli, A., and E. Epstein. 1990. Plant responses to saline and sodic conditions, p. 113-137. In: K.K. Tanji (ed). *Agricultural salinity assessment and management*. Amer. Soc. Civil Eng., New York.
29. Lebrun, L., K. Rajasekaran, and M.G. Mullins. 1985. Selection in Vitro for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* Scheele. *Annals of botany* 56:733-740.
30. Mademba, F., U.A. Boucherea, and F.R. Larher. 2003. Proline accumulation in cultivated citrus and its relationship with salt tolerance. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78:617-623.

31. Mansour, M.M.F., O.Y. Lee-Stadelmann, and E.J. Stadelmann. 1993. Solute potential and cytoplasmic viscosity in *Triticum aestivum* and *Hordeum vulgare* under salt stress. A comparison of salt resistant and salt sensitive lines and cultivars. *J. Plant Physiol.* 142:623–628.
32. Mansour, M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant* 43:491–500.
33. Mikolajczyk, M., S.A. Olubunmi, G. Muszynska, D.F. Klessig, and G. Dobrowolska. 2000. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12:165–78.
34. Mukherjee, A. 2002. Effect of NaCl on In Vitro Propagation of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 102-103:431-441.
35. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239-250.
36. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15:473–479.
37. Niknam, V., N. Razavi, H. Ebrahimzadeh, and B. Sharifizadeh. 2006. Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents, and antioxidant enzymes in seedling and calli of two *Trigonella* species. *Biol. Plant* 50:591-596.
38. Pareek, A., S.L. Singla, A. Grover. 1997. Salt responsive proteins/genes in crop plants, p. 365–391. In: P.K. Jaiwal, R.P. Singh and A. Gulati (eds.). *Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plant*. Oxford and IBH publication Co., New Delhi.
39. Plant, A.L., and E.A. Bray. 1999. Regulation of gene expression by abscisic acid during environmental stress, p. 303–331. In: H.R. Lerner (ed.). *Plant Responses to Environmental Stresses*. Marcel Dekker, New York.
40. Poljakoff-Mayber, A. 1982. Biochemical and physiological responses of higher plants to salinity stress, p. 245-270. In: A. San Pietro (ed.). *Biosaline research. A look to the future*. Plenum Press, New York.
41. Pruvot, G., S. Cuiné, G. Peltier, and P. Rey. 1996a. Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants. *Planta* 198:471-479.

42. Pruvot, G., J. Massimino, G. Peltier, P. Rey. 1996b. Effects of low temperature, high salinity and exogenous ABA on the synthesis of two chloroplastic drought-induced proteins in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant* 97:123-131.
43. Queirós, F., F. Fidalgo, I. Santos, and R. Salema. 2007. *In vitro* selection of salt tolerant cell lines in *Solanum tuberosum* L. *Biologia Plantarum* 51:728-734.
44. Rai, M.K., V.S. Jaiswal, and U. Jaiswal. 2010. Regeneration of plantlets of guava (*Psidium guajava* L.) from somatic embryos developed under salt-stress condition. *Acta Physiol. Plant*
45. Rout, G.R., P. Das, and S.N. Raina. 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39:23-27.
46. Saif-Ur-Rasheed, M., S. Asad, and Y. Zafar. 2001. Use of radiation and *in vitro* techniques for development of salt tolerant mutants in sugarcane and potato, p. 61-74. In: International Atomic Energy Agency, Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. *In vitro* techniques for selection of radiation induced mutations adapted to adverse environmental conditions. IAEA, Vienna.
47. Singh, N.K., C.A. Bracken, P.M. Hasegawa, A.K. Handa, S. Buckel, M.A. Hermodson, F. Pfankoch, F.E. Regnier, and R.A. Bressan. 1987. Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cells. *Plant Physiol.* 85:529-536.
48. Slonov, L.K., 1986. Effects of trace elements on the physicochemical properties of plant cell protoplasm bicoloids under salinization conditions. *Fiziol. Rast.* 13:1024-1028.
49. Soniya, E.V., N.S. Banerjee, and M.R. Das. 2001. Genetic analysis of somaclonal variation among callus derived plants of tomato. *Current Science* 80:1213-1215.
50. Stoeva, N., and M. Kaymakanova. 2008. Effect of salt stress on the growth and photosynthesis rate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Central European Agriculture* 9:385-392.
51. Udovenko, G.V., and U.M. Evdokimov. 1970. Changes of plant salt resistance during ontogenesis in connection with certain properties of the protoplasm. *Fiziol. Rast.* 17:590-598.

52. Unnikrishnan S.K., Prakash L., Josekutty P. C., Bhatt P. N. and Mehta A. R. 1991. Effect of NaCl Salinity on Somatic Embryo Development in *Sapindus trifoliatu*s L. Journal of Experimental Botany. 42:401-406.
53. Urechean V. 2003. The influence of stress induced by NaCl on morphogenetic aspects of the callus initiated from immature maize embryos. Bulg. J. Plant Physiol. Special issue:336–352.
54. Xiong, L., and J.-K. Zhu. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. Plant Cell Environ. 25:131-139.
55. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Raflaski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
56. Zair, I., A. Chlyah, K. Sabounji, M. Tittahsen, and H. Chlyah. 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 73:237–24.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 Conclusiones

Se evidenció que el estrés salino con NaCl afectó el crecimiento y el desarrollo de los embriones somáticos de *C. chinense*, observándose que a 75 y 100 mM de NaCl se favorecieron ambos procesos, mientras que concentraciones superiores (200 y 300 mM de NaCl) resultaron desfavorable en general para los embriones.

La sobrevivencia de los ESs de chile habanero disminuyó con el incremento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo, resultando 100 mM la concentración adecuada (dosis letal media) para la selección *in vitro* de líneas embriogénicas tolerantes a estrés salino, en esta especie.

Los diferentes tratamientos salinos estimularon la germinación de los ESs de *C. chinense*, excepto la concentración de 300 mM de NaCl la cual no respondió favorablemente.

Se demostró, a través de los diferentes indicadores evaluados (*sobrevivencia, contenido de proteínas totales y de prolina, relación Na⁺/K⁺, contenido de agua y peso fresco*) que los embriones somáticos de chile habanero sometidos a 100 mM de NaCl son tolerantes a estrés salino, corroborado además, a partir de los resultados del análisis de ADN con marcadores del tipo RAPDs.

Con base en estos datos, se puede concluir que la hipótesis planteada al inicio del trabajo resultó cierta.

3.2 Perspectivas

Los resultados de este estudio constituyen un importante avance en los esfuerzos que se realizan para el mejoramiento genético de chile habanero. Este cultivo representa un símbolo para la cultura yucateca y es fuente de ingreso para un gran número de familias en la región. Sin embargo, está necesitado de variedades mejoradas, y que sobre todo, sean más tolerantes a las condiciones de estrés que les impone el ambiente. Contar con un modelo de selección bajo presión para estrés de salinidad para esta especie, y la identificación de una línea embriogénica tolerante a este estrés, constituye un importante aporte al desarrollo tecnológico de este cultivo. Sin embargo, se requiere aún de estudios similares en las etapas de plántula y de campo, los cuales se ven limitados por la incapacidad de conversión que presentan los embriones somáticos del género *Capsicum*.

Anexo 1. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962)

Compuesto	Formula	mg. L-1
Macroelementos		
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1,650
Nitrato de potasio	KNO_3	1,900
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Fosfato de potasio	KH_2PO_4	170
Sal disódica deetilendiaminotetracetato	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Microelementos		
Sulfato de manganeso monohidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Sulfato cúprico pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Suplementos		
Tiamina		0.10
Piridoxina		0.5
Ácido nicotínico		0.5
Glicina		2.0
Mionositol		100
Sacarosa		30,000

Anexo 2. Conductividad eléctrica del medio

Tratamientos mM NaCl	Conductividad eléctrica (dSm ⁻¹)
0	5.3
75	12.7
100	15.6
200	24.4
300	34.5

Anexo 3. Tinción con nitrato de plata para geles

Primero se hidratarán los geles durante una hora con tres cambios de etanol al 30% cada 20 min. Posteriormente los geles se pretratarán con una solución al 0.02% de tiosulfato de sodio por un periodo de 1.5 min, inmediatamente los geles serán enjuagados con agua por 1 min con tres cambios cada 20 s. Luego los geles serán incubados en una solución de nitrato de plata al 0.2% y formaldehído al 0.03% por 20 min. Después del periodo de incubación, la solución de plata será descartada y los geles serán enjuagados con agua dos veces por 20 s. A continuación se llevará acabo el revelado con una solución de carbonato de sodio al 6%, formaldehído al 0.019% y 0.4 mM de tiosulfato de sodio. Una vez que la solución reveladora se torne oscura será necesario cambiarla por otra porción de solución reveladora fresca. Es de suma importancia llevar acabo el revelado con la solución completamente transparente. Después de adquirir la intensidad de tinción deseada el revelado será detenido descartando la solución reveladora y adicionando ácido acético al 12% y metanol al 50%. Los geles teñidos serán almacenados en ácido acético al 1% a 4°C hasta llevar acabo los siguientes análisis. Todo este proceso se realizará en un equipo de agitación Stovall a 30 rpm.

Anexo 4. Método de extracción de ADN con SDS

- 1) Macerar 0.3 g de tejido congelado con nitrógeno líquido.
- 2) Tomarlo con una espátula y colocarlo en un tubo eppendorf con 1 ml del amortiguador de SDS.

10 ml	Tris HCl pH 7.4
2.5 ml	NaCl 5 M
2.5 ml	EDTA 0.5 M pH 8.0
2.5 ml	SDS 10%
32.5 ml	H ₂ O estéril
50 ml	Volumen Final

- 3) Agregar 500 μ L de fenol y 500 μ L de cloroformo, centrifugar a 13000 rpm/5 min/TA.
- 4) Recuperar el sobrenadante y añadir 0.8 vol de isopropanol frío (-20°C), agitar por inversión e incubar a -80°C durante 1 hora.
- 5) Centrifugar a máxima velocidad durante 5 min.
- 6) Lavar la pastilla dos veces con etanol 76% frío.
- 7) Secar la pastilla y resuspender en Tris 10 mM (50 μ L) y agregar 1 μ L de RNAsa (100 mg/ml).
- 8) Fraccionar en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (1 mg/ml).

Anexo 5. Protocolo de tratamiento de RNAsa

1. Secar la pastilla Resuspender en 300 μ L de agua bidestila ultrapura.
3. Agregar 3 μ L de RNAsa (10 mg/ml).
4. Incubar durante 30 min. A 37° C.
5. Precipitar con 1 vol de acetato de sodio 3 M y 1000 μ L de isopropanol.
6. Incubar 1 h a -80° C ó toda la noche a -20° C.
7. Centrifugar a 1300 rpm 20 min a 4°C.
8. Lavar la pastilla 2 veces con 500 μ L de etanol absoluto.
9. Secar la pastilla y resuspender en agua bidestila ultrapura.

Anexo 6. Cuadro 2. Kit de cebadores RAPDs marca BIOSELEC®.

Nombre del cebador	Secuencia	Temperatura de fusión (T _m)
Tubek-04	5'-CCG CCC AAA C-3'	34° C
Tubek-06	5'-CAC CTT TCC C-3'	32° C
Tubek-09	5'-CCC TAC CGA C-3'	34° C
Tubek-19	5'-CAC AGG CGG A-3'	34° C

Anexo 7. Evaluación de variables en los embriones somáticos de *Capsicum chinense*.

Tratamientos	0 mM NaCl	75 mM NaCl	100 mM NaCl	200 mM NaCl	300 mM NaCl
Total de embriones	880	880	880	880	880
Número de embriones deformados	335 $\pm$ 2.9a	185 $\pm$ 2.9b	144 $\pm$ 3.1c	-	-
Número de embriones normales	545 $\pm$ 2.9a	488 $\pm$ 4.4b	258 $\pm$ 4.2c	203 $\pm$ 3.3d	120 $\pm$ 5.8e
Número de embriones sobrevivientes	880 $\pm$ 4.69a	673 $\pm$ 6.67b	402 $\pm$ 1.79c	203 $\pm$ 3.34d	120 $\pm$ 5.77e
Sobrevivencia (%)	100	76	46	23	14
Contenido de agua (%)	90.57 $\pm$ 1.11a	90.7 $\pm$ 1.71a	88.07 $\pm$ 0.95a	82.24 $\pm$ 1.03b	80.99 $\pm$ 0.52b
Peso seco (%)	9.43 $\pm$ 1.11b	9.27 $\pm$ 1.71b	12.09 $\pm$ 0.95b	17.76 $\pm$ 1.03a	18.98 $\pm$ 0.52a
Prolina (μ mole prolina / g PS)	1.71 $\pm$ 0.130d	4.52 $\pm$ 0.47e	24.72 $\pm$ 8.71c	100.57 $\pm$ 1.53b	196.11 $\pm$ 5.92a

Medias con diferentes letras son significativamente diferentes (media $\pm$ ES, según dócima de Tukey $p \leq 0.05$).