



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS EN LA
EMBRIOGENÉISIS SOMÁTICA DE CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

CARLOS ALBERTO LECONA GUZMÁN

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

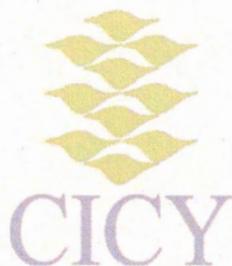
(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



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 ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS EN LA EMBRIOGENÉISIS SOMÁTICA 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, 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, 27 de Febrero del 2012.

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 registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: MC. CARLOS ALBERTO LECONA GUZMÁN

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) y "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

Primero y antes que nada, gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este periodo de estudio.

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy, a quien agradezco sus sabios consejos, así como el compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (No. de registro 205064).

A los miembros de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dra. Nancy Santana, Dra. Lourdes G. Iglesias Andreu, Dra. María del Carmen Montalvo Peniche, Dr. Javier Orlando Mijangos Cortez, Dr. Cesar de los Santos Briones, Dr. Oscar Moreno Valenzuela y Dr. Manuel Martínez Estévez por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la M.C. Adriana Canto Flick y M.C. Eduardo Balam Uc por su apoyo técnico prestado para la realización de este trabajo.

A mis amigos: Susana, Jericó, Carlos, Rosalía, Mildred y Ángel con quienes he pasado momentos inolvidables, gracias por su amistad y a todos los compañeros del laboratorio 09 gracias por su apoyo y colaboración.

DEDICATORIAS

A mi familia:

Que con tanto cariño me han ayudado a concretar el sueño de estar acá. Por su amor y apoyo incondicional en la realización de mis metas y objetivos a pesar de la distancia.

Especialmente con todo mi amor a mi madre, quien me ha enseñado con su ejemplo a rebasar todas las barreras que la vida nos presenta, a querer ser mejor cada día, a entender que no hay nada imposible y que sólo hay que esmerarse y sacrificarse, si es necesario, para lograr las metas que nos planteamos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	5
1.1 INTRODUCCIÓN.....	5
1.2 ANTECEDENTES.....	6
1.2.1 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	6
1.2.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES).....	7
1.2.3 HISTODIFERENCIACIÓN.....	8
1.2.4 MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	8
1.2.5 GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	9
1.2.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>CAPSICUM SPP.</i>	10
1.2.7 PROTEÍNAS EN EMBRIONES CIGÓTICOS.....	13
1.2.7.1 PROTEÍNAS DE RESERVA.....	13
1.2.7.2 PROTEÍNAS <i>LEA</i>	14
1.2.8 ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS.....	15
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18

CAPÍTULO II.....	25
CHANGES IN THE PROTEIN PROFILE OF HABANERO PEPPER.....	25
(<i>CAPSICUM CHINENSE</i> J.) SOMATIC EMBRYOS DURING DEVELOPMENT.	
2.1 ABSTRACT.....	26
2.2 INTRODUCTION.....	27
2.3 MATERIAL AND METHODS.....	28
2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	30
REFERENCES.....	38
CAPÍTULO III.....	45
EFFECTO DEL ÁCIDO ABCÍSICO EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS.....	45
EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO.	
3.1 INTRODUCCIÓN.....	45
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
3.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	46
3.2.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	46
3.2.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	47
3.2.3.1 INDUCCIÓN.....	47
3.2.3.2 HISTODIFERENCIACIÓN.....	47
3.2.4 ANÁLISIS BIOQUÍMICO.....	47
3.2.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS.....	47

3.2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS.....	47
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	49
3.3.1 EFECTO DEL ABA EN LA FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	49
3.3.2 EFECTO DEL ABA EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES.....	52
SOMÁTICOS DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.	
3.3.3 EFECTO DEL ABA EN EL PERFIL DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES.....	53
SOMÁTICOS DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.	
3.4 CONCLUSIONES.....	55
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	56
CAPÍTULO IV.....	61
EFFECTO DE LA ASPARAGINA EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS.....	61
EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO.	
4.1 INTRODUCCIÓN.....	61
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
4.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	63
4.2.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	63
4.2.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	63
4.2.3.1 INDUCCIÓN.....	63
4.2.3.2 HISTODIFERENCIACIÓN.....	64

4.2.4 ANÁLISIS BIOQUÍMICO.....	64
4.2.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS.....	64
4.2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS.....	64
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	65
4.3.1 EFECTO DE LA ASPARAGINA SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS.....	65
SOMÁTICA DE CHILE HABANERO	
4.3.2 EFECTO DE LA ASN EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES.....	68
SOMÁTICOS DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.	
4.3.3 EFECTO DE LA ASN EN EL PERFIL DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES.....	69
SOMÁTICOS DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.	
4.4 CONCLUSIONES.....	72
4.5 BIBLIOGRAFÍA.....	73
CAPÍTULO V.....	75
DISCUSIÓN GENERAL.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	77
CAPÍTULO VI.....	81
CONCLUSIÓN GENERAL.....	81

LISTADO DE FIGURAS

Figure 2.1. Somatic embryogenesis and developmental stages in *Capsicum chinense*. Somatic embryos obtained directly from explants after A) 2 weeks of culture and B) 5 weeks of culture. Developmental stages correspond to C) globular, D) heart-shaped, E) torpedo, and F) cotyledonary; G) zygotic embryo isolated from *C. chinense*..... 31

Figure 2.2. Total protein content of somatic embryos of *Capsicum chinense* at different developmental stages. Data are the means of at least 3 independent replicates. Error bars represent standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($P \leq 0.05$)..... 32

Figure 2.3. Protein pattern (12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) of somatic embryos from *Capsicum chinense* jacq. MM: molecular weight marker; Zyg: zygotic embryo; G: globular somatic embryo; H: heart-shaped somatic embryo; T: torpedo-shaped somatic embryo; C: cotyledonary somatic embryo.....36

Figure 2.4. Two-dimensional isoelectrofocusing/sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (IEF/SDS-PAGE) of A) zygotic embryo and B) cotyledonary somatic embryo from *Capsicum chinense*. A total of 25 μg protein was separated on the first dimension in a lineal gradient (pI 3–10); the second dimension was by 15% SDS-PAGE; gels were silver stained.....37

Figura 3.1. Embriones somáticos en estadio globular después de 45 días de cultivo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ABA. A) Tratamiento control Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D; B) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 3.78 μM ABA, C) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 18.9 μM ABA, D) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 37.8 μM ABA..... 49

Figura 3.2. Embriones somáticos en estadio corazón y torpedo a 75 días de cultivo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ABA. A-B) tratamiento control, C-D) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 3.78 μM ABA, E-F) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 18.9 μM ABA, G-H) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 37.8 μM ABA.....50

Figura 3.3. Estadíos de desarrollo de embriones somáticos a 85 días de cultivo.....	51
Figura 3.4. Efecto del ABA en el contenido de proteínas en diferentes estadíos de desarrollo de ESs de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. Cada valor es el promedio de 5 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa, Tukey ($p \leq 0.05$).....	52
Figura 3.5. Efecto de ABA en el Perfil de proteínas de mezcla embriones somáticos de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. SDS-PAGE al 15%. Carril 1, control, Mezcla de ESs - ABA; 2, Mezcla de ESs tratados con 3.78 μM ABA; 3, Mezcla de ESs tratados con 18.9 μM ABA; 4, Mezcla de ESs tratados con 37.8 μM ABA. M. Marcador de peso molecular.....	54
Figura 4.1. Embriones somáticos en estadio globular después de 45 días de cultivo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de Asn: A) 4.09 μM de 2,4-D (control); B) 4.09 μM de 2,4-D + 3.8 mM Asn; C) 4.09 μM de 2,4-D + 7.6 mM Asn; D) 4.09 μM de 2,4-D + 15.2 mM Asn.....	66
Figura 4.2. Embriones somáticos después de 65 días de cultivo A-B) Control; C-D) ESs tratados con 3.8 mM de Asn; E-F) ESs tratados con 7.6 mM de Asn; G-F) ESs tratados con 15.2 mM de Asn.....	67
Figura 4.3. Estadíos de desarrollo de embriones somáticos a 80 días de cultivo. Medio MS suplementado 4.05 μM de 2,4-D y diferentes concentraciones de Asn A-B) ESs tratados con 3.8 mM de Asn; C-D) ESs tratados con 7.6 mM de Asn; E-F) ESs tratados con 15.2 mM de Asn.....	67
Figura 4.4. Efecto de la Asn en el contenido de proteínas en mezclas de ESs en diferentes estadíos de desarrollo de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. Cada valor es el promedio de 5 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes difieren según dócima de Tukey ($p \leq 0.05$).....	68
Figura 4.5. SDS-PAGE al 15% de embriones somáticos a los 15 días de cultivo en medio líquido. Carril 1, Mezcla de ESs tratados sin Asn; 2, Mezcla de ESs tratados con 3.8 mM Asn; 3, Mezcla de ESs tratados con 7.6 mM Asn; 4, Mezcla de ESs tratados con 15.2 mM Asn. M: Marcador de peso molecular.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Régimen de inversión de capital en virtud de la especie Cuadro
1997-2001 11

Cuadro 1.2. Régimen de inversión de capital en virtud de la especie Cuadro
1997-2001 12

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Reportes de regeneración de plantas *in vitro* de la especie *Capsicum annuum*.....11

Cuadro 1.2. Reportes de regeneración de plantas *in vitro* de la especie *Capsicum chinense* Jacq.....13

ABREVIATURAS

ESs	Embriones Somáticos
ABA	Ácido Abscísico
Asn	Asparagina
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
LEA	late embryogenesis abundant
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
AIA	Ácido Indolacético
CIN	Cinetina
MS	Murashige y Skoog
ES	Embriogénesis Somática
AG ₃	Ácido Giberélico
ES	Embriogénesis Somática
BAP	Benzilaminopurina
TDZ	Thidiazuron
AgNO ₃	Nitrato de Plata
AIB	Ácido Indol Butirico
RAB	Responsive to ABA

2D-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones
SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida, empleando dodecil sulfato de sodio
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
IEF	Isoelectroenfoque
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonil
PVPP	Polivinilpirrolidona
TCA	Ácido Tricloro Acético
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
pI	Punto Isoeléctrico
2DE	Two-dimensional isoelectrofocusing

RESUMEN

En este trabajo se estudió el perfil de proteínas de embriones somáticos (ESs) de *Capsicum chinense* Jacq. durante su desarrollo. Nuestros resultados muestran un perfil de proteínas para el embrión cigótico de *Capsicum chinense* en el que se encontraron 9 bandas que no se expresaron en el perfil proteico de los embriones somáticos de esta especie. Coincidentemente, 5 de estas bandas poseen pesos moleculares similares a los reportados para proteínas de reserva en otras especies. El contenido de proteínas mostró una clara tendencia a disminuir a medida que el embrión somático avanza en su desarrollo. Para incrementar el contenido y composición de las proteínas endógenas se estudió el efecto de precursores de proteínas como el Ácido Abscísico (ABA) y un aminoácido como la Asparagina (Asn). Cuando se utilizó el tratamiento con ABA a una concentración de 37.8 μM , el contenido y composición de proteínas fue mayor así como la calidad de los ESs obtenidos respecto al tratamiento control. La adición de Asn al medio de cultivo ocasionó la expresión de siete péptidos que antes no se encontraban en los embriones somáticos y que se encuentran en el perfil del embrión cigótico. Los resultados obtenidos permiten inferir que, aunque la incapacidad de los embriones somáticos de *C. chinense* para germinar y convertirse en plantas no puede ser atribuida exclusivamente al bajo contenido así como al comportamiento de las proteínas a lo largo del desarrollo del embrión somático, son un factor que debe tomarse en cuenta al momento de analizar las causas y/o los efectos de la recalcitrancia de la especie, probablemente del género *Capsicum*.

ABSTRACT

In this work we studied the protein profile of somatic embryos (ESs) of *Capsicum chinense* Jacq. during its development. Our results show that in zygotic embryo were detected 9 bands that were not present in somatic embryos of this species. Coincidentally, 5 of these bands showed similar molecular weights to the reported reserve proteins in other species. The protein content was significantly lower in somatic embryos than in zygotic embryos, with a clear downward trend in globular to more advanced stages, swooping dramatically in the protein content of cotyledonary stage somatic embryos. This behavior contrasts with the reported for other species, which although lower protein content of zygotic embryos, somatic embryos show an increase towards the later stages of development. To determine the effect of exogenous treatments on the content of proteins in somatic embryos, we evaluated the effect of abscisic acid (ABA) and asparagine (Asn). The result showed that when ABA was used at a concentration of 37.8 mM, the protein content and composition was higher, and the quality of somatic embryos was better, compared to control treatment. While with the addition of Asn to the culture medium was observed the expression of seven new peptides, which were not observed in untreated embryos. These seven bands were present in the protein profile of the zygotic embryo. The results obtained allow us to infer that, although the inability of somatic embryos of *C. chinense* to germinate and become plants cannot be attributed exclusively to low and to the behavior of proteins during somatic embryo development if it is a factor to be considered when analyzing the causes and / or the effects the recalcitrance of the species, probably of the genus *Capsicum*.

INTRODUCCIÓN

Capsicum es un género reconocido como recalcitrante a la regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro*, razón por la que aún resulta muy difícil aplicar las técnicas biotecnológicas para su mejoramiento genético. Aunque son pocos los reportes de morfogénesis de chile *in vitro*, hasta fecha reciente, sólo se había logrado la inducción de brotes y la embriogénesis somática en la especie *C. annuum* (Agrawal y Chandra, 1983; Ochoa-Alejo e Ireta, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Szasz *et al.*, 1995; Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996; Binzel *et al.*, 1996; Husain *et al.*, 1999; Harini y Lakshmi, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Binzel *et al.*, 1996; Steintz *et al.*, 2003). Sin embargo, estos protocolos de embriogénesis somática de *Capsicum*, muestran baja eficiencia, baja reproducibilidad, baja capacidad de germinación y alto índice de embriones deformados, mientras que los brotes adquieren forma de roseta y no alcanzan a elongarse después de formados.

Esta incapacidad del género *Capsicum* para desarrollar plantas completas *in vitro*, limitan sustancialmente el uso de las técnicas biotecnológicas en el mejoramiento y propagación de sus cultivares. Recientemente se ha reportado protocolos de embriogénesis somática directa e indirecta así como protocolos de inducción de brotes múltiples en otra especie del género, *Capsicum chinense* (López-Puc *et al.*, 2008; Zapata-Castillo *et al.*, 2009; Bello-Bello *et al.*, 2010). Actualmente se cuenta con un sistema de Embriogénesis Somática Directa de Alta Eficiencia en Medio Líquido (Avilés-Viñas and Santana-Buzzy, datos sin publicar) en este protocolo no se tienen problemas de dependencia, ni del genotipo, ni del explante, ya que contrario a lo reportado para *C. annuum*, se puede inducir la embriogénesis somática a partir de diferentes tipos de explantes, siendo el hipocotilo el más eficiente. Sin embargo, todavía se comparten dos de los problemas reportados para el género *Capsicum*: la alta frecuencia de embriones deformados y la baja capacidad de germinación de los embriones somáticos, lo que limita drásticamente la regeneración de plantas completas en la especie. Para lograr un mayor entendimiento sobre la naturaleza de este fenómeno que afecta a los chiles entre muchas otras especies vegetales, se han estudiado el papel que juegan diferentes factores en la recalcitrancia del género *Capsicum*: el etileno acumulado en los recipientes de cultivo; las proteínas endógenas en los embriones somáticos; las poliaminas, tanto endógenas como

adicionadas al medio de cultivo; los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) exógenos, particularmente el 2,4-D; algunos genes asociados con la histodiferenciación y la formación del meristemo apical, entre otros.

El panorama de las proteínas endógenas en la embriogénesis somática de chile habanero, tampoco ha sido muy alentador al relacionarlo con la baja capacidad de germinación de los embriones somáticos de esta especie. En estudios realizados por Lecona-Guzmán (2008), donde se estudió el comportamiento de las proteínas endógenas a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de chile habanero, se observó que, contrario a lo reportado para embriones somáticos de otras especies, el contenido de proteínas de los embriones somáticos de chile habanero disminuyó con el avance de su desarrollo, mostrando el embrión globular el de mayor concentración de proteínas, mientras que en el estadio cotiledonar las proteínas disminuyen, llegando a ser dramáticamente bajo su contenido. Estos resultados permiten inferir que, este grupo de proteínas que están presentes en el perfil proteico del embrión cigótico, y ausentes en el perfil proteico del embrión somático cotiledonar, pudieran tener alguna relación con la maduración del embrión y en consecuencia, con la incapacidad de estos embriones somáticos para germinar y convertirse en plantas.

Es por esto que es necesario optar por estrategias que permitan incrementar el contenido endógeno y composición de las proteínas en los embriones somáticos de chile habanero. Una estrategia viable es la adición de Ácido Abscísico al medio el cual está involucrado en la síntesis de proteínas como *LEA* o de reserva importantes para la maduración del embrión o de algún aminoácido como la Asparagina, ya que las células los utilizan como fuente de nitrógeno, además que está relacionada a la síntesis de proteínas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. and Chandra, N. (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Curr. Sci.* 52:645-46.
- 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.
- Bello-Bello Jericó J., Canto-Flick Adriana, Balam-Uc Eduardo, Gómez-Uc Eunice, Robert Manuel L. , Iglesias-Andreu Lourdes G. and Santana-Buzzy Nancy. (2010). Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. *Hortscience* 45(7):1093–1098.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996). Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 535-540.
- Binzel, M.L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996b). *In vitro* regeneration in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) from "half- seed explants". *Plant Growth Regul.* 20:287-293.
- Buyukalaca, S. and Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.
- Harini, I. and Sita, G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 89: 107-112.
- Husain, S., Jain, A. and Kothari, S.L. (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep.* 19:64-68.
- Lecona G. Carlos A. (2008). Estudio de las proteínas en embriones cigóticos y embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 61 p.

- Lopez-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.
- Ochoa-Alejo, N. and Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. Sci. Hort. 42:21-28.
- Ramírez-Malagon, R. and Ochoa-Alejo, N. (1996). An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. Plant Cell Rep. 16:226-231.
- 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.
- 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.
- Zapata-Castillo P., Canto-Flick A., Lopez-Puc G., Solís-Ruiz A. Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2007). Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. Hortscience 42(2): 329-333.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es una valiosa alternativa para la propagación de algunas especies y es considerado el método morfogénico de multiplicación más eficiente ya que permite obtener miles de plantas en espacios tan reducidos como un matraz, o de manera industrial en biorreactores de gran capacidad. Esta herramienta biotecnológica adquiere una gran relevancia en aquellas especies clasificadas como recalcitrantes a la morfogénesis, como es el caso del género *Capsicum*.

No obstante que se han descrito numerosos reportes de morfogénesis *in vitro* de *Capsicum annuum* (Agrawal y Chandra 1983; Arroyo y Revilla, 1991; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996a; Binzel *et al.*, 1996b; Ramírez Malagon y Ochoa-Alejo, 1996; Husain *et al.*, 1999) la reproducibilidad y eficiencia de los procesos inducidos aún siguen siendo bajas (Binzel *et al.*, 1996a; Binzel *et al.*, 1996b). Recientemente se han realizado los primeros reportes en otra especie de este género, *C. chinense*, la cual aunque ha mostrado mayores tasas de regeneración y mayor reproducibilidad de los procesos, presenta diferentes inconvenientes aún para que estos procesos ocurran con la calidad requerida (López-Puc *et al.*, 2006). Aunque existen grupos altamente experimentados estudiando la recalcitrancia del género *Capsicum*, la información con la que se cuenta actualmente es escasa y exclusivamente en la especie *C. annuum*, y la reproducibilidad y eficiencia de los procesos inducidos aún siguen siendo bajas. En *Capsicum chinense* es necesario resolver la problemática de germinación y la conversión a planta de los embriones somáticos obtenidos, aunque los protocolos de regeneración que se han reportado (López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007) son altamente eficientes y reproducibles.

Este estudio nos permitirá ampliar las líneas de investigación en la embriogénesis somática de *Capsicum chinense* Jacq. ya que es necesario realizar estudios en la búsqueda de marcadores bioquímicos exclusivos de la embriogénesis somática de esta especie, así como la búsqueda de nuevos protocolos en los cuales se incrementen el contenido y la expresión de las proteínas en los embriones somáticos.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Se llama cultivo de tejidos vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

El CTV es una herramienta invaluable para la resolución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal, ya que por una parte ofrece una serie de sistemas modelo ideales para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural y por otro lado tiene una aplicación práctica en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Los primeros trabajos tuvieron un éxito muy limitado, debido a tres factores fundamentales. El primero fue el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*; el segundo fue el uso frecuente de tejidos vegetales maduros y bien diferenciados para iniciar los cultivos. Estos tejidos, como se sabe actualmente, son los que muestran una menor capacidad de respuesta al cultivo *in vitro* (Pérez-Molphe *et al.*, 1999). El tercer factor que retardó el desarrollo de las técnicas de CTV fue la ignorancia de la existencia y del papel que juegan en el desarrollo vegetal las llamadas fitohormonas o reguladores del crecimiento. Estas sustancias eran desconocidas hasta 1928, cuando Went y Timan descubrieron la auxina conocida como ácido indolacético (AIA) y en 1955 Skoog descubrió la citocinina conocida como cinetina (CIN).

Skoog y Miller (1957) fueron los primeros que consiguieron manipular la formación *in vitro* de brotes, raíces y tejido calloso mediante el uso de diferentes combinaciones de auxina (AIA) y citocinina (CIN). Otro de los pasos fundamentales para la consolidación de las técnicas de CTV lo dieron Murashige y Skoog (1962), al desarrollar el medio de cultivo MS que reunía las características apropiadas para ser utilizado en el cultivo de una gran variedad de tejidos de diferentes especies vegetales; dicho medio de cultivo sigue utilizándose de manera rutinaria en innumerables trabajos que se realizan actualmente.

1.2.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES)

Una de las características más notables del cultivo de tejidos vegetales es que ciertas células y bajo ciertas condiciones, tienen la capacidad de formar embriones mediante un proceso muy similar a la embriogénesis cigótica. A este proceso se le denomina embriogénesis somática y es una de las pruebas más notables de la totipotencia de las células vegetales.

Los embriones somáticos tienen, al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de la germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual, por lo que la nueva planta será genéticamente igual a la donadora de la célula inicial. Al proceso de conversión de una célula somática en una célula proembriónica se le llama inducción y existen ciertos factores determinantes para que este proceso suceda, como son: genotipo, grado de diferenciación de las células del explante, auxinas y aislamiento celular (Perez-Molphe *et al.*, 1999). La iniciación y desarrollo de embriones a partir de tejido somático de una planta fue reconocido por primera vez por Steward *et al.* (1958) y Reinert (1958 y 1959) en zanahoria (*Daucus carota*). Desde esa fecha, han sido desarrolladas numerosas investigaciones sobre la embriogénesis somática de zanahoria han sido desarrolladas, tanto en variedades cultivadas como silvestres (Tisserat *et al.*, 1979; Ammirato, 1983) y el número de especies con capacidad embriónica, de forma directa o indirecta se ha ido incrementando. La embriogénesis somática, adventicia o asexual es la iniciada a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat *et al.*, 1979). Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y se ha determinado mediante análisis histológicos, que no poseen conexión con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser capaces de formar plantas completas. Desafortunadamente, en la mayoría de los reportes, la información convincente sobre la formación de un embrión bien desarrollado capaz de desarrollar una planta completa aun no es clara (Santana, 1993).

La embriogénesis somática es un modelo que nos permite estudiar y entender las bases moleculares y celulares de las plantas, así como estudiar la capacidad embriónica de las células somáticas (Feher *et al.*, 2003). En los últimos años se ha utilizado para estudiar la capacidad embriónica de células somáticas utilizando como modelo embriogénesis de mutantes de *Arabidopsis* (Feher *et al.*, 2003).

Las fases fundamentales de la *ES* son la inducción, histodiferenciación, maduración, germinación y conversión del embrión. Cada una de éstas fases es regulada por diversos factores (Rudús *et al.*, 2006).

1.2.3 HISTODIFERENCIACIÓN

En el proceso de histodiferenciación, las masas de células proembriónicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular simultánea. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación, se requiere la eliminación de las auxinas exógenas (Perez-Molphe *et al.*, 1999). Uno de los fenómenos iniciales en esta etapa es el establecimiento de una polaridad en las masas de células proembriónicas. Esta polaridad se mantiene durante todo el desarrollo del embrión. Durante la etapa de la histodiferenciación, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledóneas, estos estadios son: globular, de corazón y de torpedo, mientras que en la monocotiledóneas son: globular, coleoptilar y escutelar. El desarrollo de la embriogénesis somática se asemeja a la embriogénesis cigótica tanto en su morfología como en su desarrollo, pues en ambos procesos los embriones pasan a través de los mismos estadios que incluyen el globular, corazón, torpedo y cotiledonario (McKersie y Brown, 1996). Por otra parte Nakamura *et al.* (1992), basados en un estudio de microscopía electrónica, propusieron 8 diferentes estadios de desarrollo los cuales son: célula somática madre, embrión preglobular, embrión globular, embrión elongado, embrión corazón temprano, embrión corazón, embrión torpedo y embrión cotiledonar.

1.2.4 MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Durante la maduración, los embriones somáticos experimentan cambios morfológicos y bioquímicos. Estos se caracterizan por la deposición de sustancias de almacenamiento, represión de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación (Thorpe, 1995). Sin embargo, hay especies en las que los embriones somáticos no se desarrollan normalmente. En algunos casos germinan, pero no se convierten en plántulas normales. El desarrollo del embrión y la maduración pueden en ciertos casos interrumpirse por la germinación precoz, lo que provoca que las plántulas no se desarrollen normalmente (Jiménez, 2005).

En embriones somáticos en estado temprano de su desarrollo, la disminución de la concentración de auxinas en el medio de cultivo puede romper el ciclo de continua proliferación de masas proembriónicas y permitir a los embriones el desarrollo y maduración, debido a que esta reducción de auxinas ejerce un efecto de disminuir la friabilidad aumentando los contactos célula-célula y permitiendo un incremento en la polaridad dentro del grupo de células embriónicas (Merkle, 1990).

1.2.5 GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

El proceso de germinación, comienza con la pérdida de humedad de la semilla (inhibición) y se completa cuando la radícula, se extiende penetrando las estructuras que lo rodea (Bewley, 1997). Para que la germinación ocurra en orden, los embriones somáticos deben de tener brotes funcionales y raíces capaces de tener crecimiento meristemático (Merkle, 1990). Altos niveles de auxinas pueden inhibir el desarrollo y crecimiento de brotes meristemáticos, por lo que si embriones jóvenes no son transferidos a un medio con baja concentración o sin presencia de auxinas, después de la inducción a embriogénesis, estos no madurarán adecuadamente y generarán embriogénesis secundaria. En esta etapa puede ser necesaria la adición de carbón activado al medio de cultivo para remover la mayor cantidad de auxinas como sea posible de los embriones somáticos (Buchheim *et al.*, 1989). A bajos niveles de auxinas después de la iniciación de los cotiledones, se logra una temprana formación de brotes. En condiciones no apropiadas de cultivo, la germinación puede ocurrir prematuramente teniendo como consecuencia plántulas débiles o con poca viabilidad (Merkle, 1990).

En muchas especies de plantas, es difícil que ocurra la germinación de los embriones somáticos y su conversión a planta. Es en esta etapa donde 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 que los embriones somáticos presentan falta de maduración y falta de

tolerancia a la desecación y la dormancia. Para lograr la conversión del embrión y mejorar la eficiencia de la regeneración a planta, se han evaluado diferentes estrategias, como la adición de agentes osmóticos, tales como: carbohidratos y azúcares alcohol (Sorbitol y Manitol). Los RCV como el ácido giberélico (AG_3) se han empleado en el medio de cultivo durante la conversión de los embriones somáticos en plantas (Binzel *et al.*, 1996a; Choi *et al.*, 2002; 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).

1.2.6 CULTIVO *in vitro* DE *Capsicum* spp.

Aunque algunas especies de la familia Solanaceae se han convertido en modelo de morfogénesis *in vitro*, como es el caso de *Nicotiana tabacum*, existen también especies, incluso géneros, reconocidos como recalcitrantes a la regeneración de plantas *in vitro*. Ejemplo de ello es el género *Capsicum* en la que la única especie que ha respondido a la inducción de diferentes procesos morfogénéticos *in vitro*, es *Capsicum annuum* (Tabla 1.1), aunque la reproducibilidad y eficiencia de los procesos inducidos aún siguen siendo bajas (Binzel *et al.*, 1996a; Binzel *et al.*, 1996b).

Numerosos investigadores han descrito metodologías para inducir la regeneración *in vitro* de diferentes cultivares de *Capsicum annuum* por diferentes vías morfogénicas (Agrawal y Chandra 1983; Arroyo y Revilla, 1991; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996a; Binzel *et al.*, 1996b; Ramírez Malagon y Ochoa-Alejo, 1996; Husain *et al.*, 1999), así como el estudio de los factores que influyen en la regeneración de esta especie (Jacobs y Stephens, 1990). Hasta la fecha sólo existe un reporte de embriogénesis directa de *C. annuum* en medio sólido (Harini y Sita, 1993), así como de un protocolo de embriogénesis somática y regeneración de chile a partir de células embriogénicas en suspensión (Buyukalaca y Mavituna, 1996)..

ESPECIE	RCV	EXPLANTE	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>C. annuum</i>	AIA , BAP	Hipocótilos cotiledones	Callo, Organogénesis	Agrawal et al. (1989)
<i>C. annuum</i>	AIA	Hipocótilos	Organogénesis	Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno (1990)
<i>C. annuum</i>	AIA, BAP	Hipocótilo	Organogénesis	Valera-Montero y Ochoa-Alejo (1992)
<i>C. annuum</i>	2,4-D, TDZ (AgNO ₃).	Ápices, embriones cigóticos.	Embriogénesis somática	Binzel et al., (1996a)
<i>C. annuum</i>	2,4-D, BAP	Embriones cigóticos maduros	Embriogénesis Somática	Buyukalaca y Mavituna (1996)
<i>C. annuum</i>	2,4-D, centrofenoxina	Embriones cigóticos	Embriogénesis somática	Steinitz et al., (2003)
<i>C. annuum</i>	AIB	Hipocótilos	Organogénesis	Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo (1996)
<i>C. annuum</i>	TDZ	Hipocótilos, cotiledones y hoja	Organogénesis	Venkataiah et al., (2003)
<i>C. annuum</i>	BAP, (AgNO ₃), ácido benzoico	AIA, Meristemos y hojas	Organogénesis	Kumar et al., (2005)
<i>C. annuum</i>	TDZ	Nudos	Organogénesis	Ahmad et al., (2006)
<i>C. annuum</i>	TDZ, AIB	hipocótilos	Embriogénesis somática	Khan et al., (2006)

Cuadro 1.1. Reportes de regeneración de plantas *in vitro* de la especie *Capsicum annuum*.

Recientemente se han realizado los primeros reportes en otra especie de este género, *C. chinense* (Tabla 1.2), la cual aunque ha mostrado mayores tasas de regeneración y mayor reproducibilidad de los procesos, presentan diferentes inconvenientes aún para que estos procesos ocurran con la calidad requerida (López-Puc *et al.*, 2006). Sin embargo, el empleo de las técnicas biotecnológicas en el género *Capsicum* ha sido ampliamente reportado.

En lo que respecta a la regeneración *in vitro* de cultivares de *C. chinense*, se sabe que esta especie pertenece a un género recalcitrante, en el que la regeneración de plantas a partir de células, tejidos y órganos así como la transformación genética no se han logrado grandes avances (Ochoa-Alejo y Ramírez Malagón, 2001). Actualmente se cuenta con varios reportes sobre esta especie (Tabla 1.2). Santana-Buzzy *et al.*, (2005) reportaron la regeneración de plantas vía organogénesis. Este mismo grupo detectó una gran sensibilidad de esta especie al etileno presente en los recipientes de cultivo (Santana-Buzzy *et al.*, 2006) y propusieron un protocolo en el que se logra reducir los efectos de este gas-regulador. López-Puc *et al.*, (2006) y Zapata-Castillo *et al.*, (2007) reportaron la inducción de embriones somáticos de chile habanero de forma directa e indirecta, respectivamente. Mientras, Montalvo-Peniche *et al.*, (2007) establecieron un protocolo de lento crecimiento, para la conservación *in vitro* del germoplasma de esta especie.

ESPECIE	RCV	EXPLANTE	RESPUESTA	REFERENCIA
<i>C. chinense</i> Jacq.	TDZ	Nudos	Organogénesis	Santana-Buzzy et al., (2005)
<i>C. chinense</i> Jacq.	TDZ	Nudos	Organogénesis Desarrollo	Santana-Buzzy et al., (2006)
<i>C. chinense</i> Jacq.	2,4-D	Hipocótilos	Embriogénesis somática directa	López-Puc et al., (2006)
<i>C. chinense</i> Jacq.	2,4-D TDZ	Hipocótilos	Embriogénesis somática indirecta	Zapata-Castillo et al., (2007)
<i>C. chinense</i> Jacq.	-	Ápices	Conservación	Montalvo-Peniche et al., (2007)

Cuadro. 1.2. Reportes de regeneración de plantas *in vitro* de la especie *Capsicum chinense* Jacq.

1.2.7 PROTEÍNAS EN EMBRIONES CIGÓTICOS

1.2.7.1 PROTEÍNAS DE RESERVA

Las semillas contienen muchas proteínas que metabólicamente están inactivas y que funcionan como reservas, las cuales varían según la especie. También presentan proteínas que metabólicamente son activas, como las enzimas proteicas. En el trigo, por ejemplo, se han encontrado por lo menos cuatro tipos de proteínas: prolaminas, glutelinas, globulinas y albúminas, (Osborne, 1907) predominando las dos primeras. El total de proteínas activas sólo alcanza el 15% del total, siendo las principales las albúminas. En la avena (*Avena sativa*), el 80% del porcentaje de proteína total corresponde a la globulina, 15% a la prolamina y 5% a la glutelina; en el pepino (*Cucurbita pepo*) también predomina la globulina. En cambio en el arroz (*Oryza sativa*), 80%

corresponde a la glutelina, 10% a la globulina y 5% a la albúmina y a la prolamina. En el maíz (*Zea mays*) los valores son 31, 0, 14 y 48% respectivamente.

Estas proteínas generalmente se presentan en organelos bien definidos llamados cuerpos de proteínas o granos de aleurona. Estos cuerpos se han encontrado en numerosas semillas como oleaginosas y los cereales. En estos últimos se localizan en la mayoría de las células del endospermo, pero en especial se le llama capa de aleurona a estos cuerpos de proteínas que predominan en la capa que rodea al endospermo. En general tienen un alto contenido de nitrógeno y de prolina y una baja cantidad de lisina, triptófano y metionina. Además de los compuestos mencionados, las semillas contienen muchas otras sustancias. Contienen algunos minerales y la composición de éstos es similar a la del resto de la planta. Además del nitrógeno que está presente en las proteínas, las semillas contienen cierta cantidad de aminoácidos y de amidas (por ejemplo, glutamina y asparagina en las nueces). Otros compuestos con nitrógeno son los alcaloides, como la piperina en semillas de *Piper nigrum*, la ricinina en *Ricinus communis*, la cafeína en *Coffea spp.*, la teobromina y cafeína en *Theobroma*.

1.2.7.2 PROTEÍNAS LEA

En la fase de maduración de la semilla, el ácido abscísico (ABA) induce la síntesis de una serie de proteínas conocidas como proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundance*), las cuales están rigurosamente conservadas en una gran variedad de especies (Barceló *et al.*, 2001; Colorado *et al.*, 1995; Rock y Quatrano, 1995; Delseny *et al.*, 2001). Todas se caracterizan por ser solubles en agua, extremadamente hidrofílicas, tener escasos residuos hidrofóbicos y básicos y contener abundantes aminoácidos cargados y polares, en particular glicina y lisina. Por lo regular carecen de algunos aminoácidos como triptófano y muy a menudo de cisteína. Estas características les confieren una importante función: proteger a las células ante los daños producidos por la brusca deshidratación que sufren las semillas en las últimas fases de desarrollo (Dure *et al.*, 1989).

Dentro de las proteínas LEA podemos destacar las deshidrinas (DHN), también conocidas como proteínas RAB (Responsive to ABA) o LEA II. Estas proteínas se inducen por deshidratación, ya sea por calor, sequía o frío y se acumulan en grandes cantidades en semillas maduras, como por ejemplo las proteínas RAB21 o RAB16A-C de arroz (Mundy

and Chua, 1988; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1989) o la proteína RAB18 de *Arabidopsis* (Goshi *et al.*, 1995). En condiciones normales se ha observado una acumulación diferencial de las deshidrinas en diferentes tejidos. Sin embargo, en condiciones de estrés o tras la aplicación de ABA exógeno, se produce un aumento de las deshidrinas en todos los tejidos, lo que indica la importancia de las deshidrinas en las respuestas de las plantas frente a condiciones adversas (Nylander *et al.*, 2001).

1.2.8 ACUMULACIÓN DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS

Los embriones somáticos no acumulan la misma cantidad de proteínas que se observan en semillas *in vivo*. Se han detectado en embriones somáticos de alfalfa, 10% de las proteínas almacenadas que se encuentran en embriones cigóticos (Stuart *et al.*, 1988). Los embriones somáticos son menos vigorosos que las semillas *in vivo*. En consecuencia, si se incrementa la acumulación de proteínas, podría ser posible incrementar el vigor de embriones somáticos (Stuart *et al.*, 1998).

Griga *et al.*, (2007) reportaron que el contenido de proteínas totales de *Pisum sativum* se incrementó durante el desarrollo de los embriones somáticos. Ellos observaron que el contenido de proteínas varió en un rango de 10 a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$. Resultados similares han sido obtenidos al evaluar el contenido de proteínas en embriones somáticos de alfalfa (Lai *et al.*, 1992) y de soya (Stejskal, 1994). Flinn *et al.*, (1993) en un estudio realizado con abeto, reportaron que existía similitud en la regulación de la expresión de un gen que codifica proteínas de reserva durante los estados tempranos e intermedios de la embriogénesis somática y cigótica. Sin embargo, existieron diferencias en la expresión de genes en los estados posteriores durante la maduración, lo cual puede ser atribuido a la influencia de la disecación de los embriones cigóticos, la cual no ocurre en embriones somáticos.

En un estudio reciente, Lecona (2008) analizó las proteínas totales de embriones cigóticos y somáticos de chile habanero y observó que el contenido de proteínas en embriones cigóticos fue diez veces superior ($14.23 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) al registrado para embriones somáticos, además que el contenido de proteínas en embriones somáticos de *Capsicum chinense* va disminuyendo a medida que avanza el embrión somático hacia los estadios más avanzados de su desarrollo, siendo el ESs globular el que presentó el mayor contenido de

proteínas ($2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) y el ESs cotiledonar el de contenido más bajo ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), concluyendo que el bajo contenido y la poca expresión de proteínas que se encuentra en los embriones somáticos de *Capsicum chinense*, particularmente en el estadio cotiledonar, contrario a lo que se ha reportado para especies no recalcitrantes, pudiera estar contribuyendo a la baja capacidad de germinación y conversión en plántulas, de las embriones somáticos de esta especie.

La adición de glutamina, alanina, prolina y arginina en concentraciones de 30 mM en medio de regeneración de *M. sativa* incrementa la producción de embriones somáticos, su peso seco, la síntesis de proteínas almacenadas, al igual que el promedio de conversión a planta (Lai *et al.*, 1992). Morcillo *et al.* (1999) describieron que la adición de arginina y glutamina incrementó la acumulación de proteínas en embriones somáticos de palma de aceite; pero que la acumulación de proteínas depende del genotipo y aminoácido utilizado.

Nuutila *et al.*, (2000) describieron que los estados embriogénicos tempranos de embriones somáticos de cebada, requieren la presencia de glutamina u otro aminoácido, para que pueda ser transformado hasta proteínas.

HIPÓTESIS

Si la maduración de los embriones somáticos de chile habanero puede ser inducida con ABA y Asparagina, entonces los niveles endógenos de proteínas pudieran incrementarse.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la Asparagina y el ABA en el contenido de proteínas en embriones somáticos de chile habanero (*C. chinense*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el contenido y composición de proteínas totales presentes en embriones somáticos durante la histodiferenciación.
2. Estudiar el perfil proteico de los embriones somáticos de chile habanero, en diferentes estadios de desarrollo mediante el empleo de la técnica 2D-PAGE.
3. Evaluar el efecto de la Asparagina y del ácido abscísico (ABA) sobre el contenido y composición de las proteínas en embriones somáticos de chile habanero.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. and Chandra, N. (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Curr. Sci.* 52:645-46.
- Ahmad N., Siddique I. and Anis M. (2006). Improved plant regeneration in *Capsicum annuum* L. from nodal segments. *Biologia Plantarum.* 50 (4): 701-704.
- Ammirato, P.V. (1983). The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: suspension culture techniques and hormone requirements. *Biotechnology* 1: 68-74.
- 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.
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B. and Sánchez R. (2001). *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide, Madrid, España.
- 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.
- Bewley, J.D. (1997). Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996a). Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 535-540.
- Binzel, M.L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996b). *In vitro* regeneration in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) from “half- seed explants”. *Plant Growth Regul.* 20:287-293.
- Buchheim J. Colburn S. and Ranch J. (1989). Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.* 89: 768-773.
- Buyukalaca, S. and Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.

-
- Carraway D. and Merkle S. (1997). Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. *Can. J. For. Res.* 27:1805–1812.
- Choi M., Kim S. and Park Y. (2002). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Z. jujube* var. *inermis* and *Z. jujube* Miller. *Propagation of ornamental Plants* 2 (1): 3-8.
- Choi Y., Yang D.C., Yoon E. and Choi K. (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.
- Colorado P., Nicolás C., Nicolás G. and Rodríguez D. (1995). Convergent effects of stress and ABA on gene-expression during germination of chick-pea seeds. *J. Plant Physiol.* 146: 535-540.
- Delseny M., Bies-Etheve N., Carles C., Hull G., Vicient C., Raynal M., Grellet F. and Aspart L. (2001). Late embryogenesis abundant (*LEA*) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *J. Plant Physiol.* 158: 419-427.
- Dure L.S., Crouch M., Harada J., Ho T.H.D., Mundy J., Quatrano R., Thomas T. and Sung Z.R. (1989). Common aminoacid sequence domains among the *LEA* proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-485.
- Feher, A., Pasternak, T.P. and Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 74 (3): 201-228.
- Flinn, B.S., Roberts, D.R., Newton C.H., Cry, D.R. and Taylor, E.P. (1993). Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiologia Plantarum.* 89: 719-730.
- Goshi F., Bertauche N., Vartanian N. and Giraudat J. (1995). Abscisic acid-dependent and independent regulation of gene expression by progressive drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 246: 10-18.
- Griga M, Horacek, J. and Klenoticova H. (2007). Protein patterns associated with *Pisum sativum* somatic embryogenesis. *Biologia plantarum* 51 (2): 201-211.

- Harini, I. and Sita, G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 89: 107-112.
- Husain, S., Jain, A. and Kothari, S.L. (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep.* 19:64-68.
- Jacobs, J.L. and Stephens, C.T. (1990). Factor affecting the regeneration of pepper (*Capsicum annuum* L.). *HortScience* 25:20.
- 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.
- Jiménez V. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47:91–110.
- 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.
- Khan H., Siddique I. and Anis M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum.* 50 (4) 789-792.
- Kumar V., Gururaj H.B., Narasimha Prasad B.C., Giridhar P. and Ravishankar. (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annuum* L. *Scientia Horticulture.* 106: 237-246.
- Lai, F.M., Senaratna, T. and McKersie, B.D. (1992). Glutamine exchanges storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. Somatic embryos. *Plant Science.* 87:6977.
- Lecona G. Carlos A. (2008). Estudio de las proteínas en embriones cigóticos y embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 61 p.
- Lopez-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.
- McKersie, B.D. and Brown, D.C. (1996). Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. Seed Sci. Res. 6: 109-126.
- Merkle, S.A. (1990). Maturation of yellow poplar somatic embryos. In: Ahuja M. R. Ed, Proceedings of the IUFRO-NATO Advanced Research Workshop on Woody Plant Biotechnology. Plenum Press, New York.
- Montalvo-Peniche M.C., Iglesias-Andreu L., Mijangos-Cortes J.O., Nahuat-Dzib S.L., Barahona-Pérez F., Canto-Flick A. and Santana-Buzzy N. (2007). In vitro Germoplasm Conservation of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience 42 (5):1247-1252.
- Morcillo, F., Aberlenc-Bertossi, F., Noirot, M., Hamon, S. and Duval, Y. (1999). Differential effects of glutamine and arginine on 7S globulin accumulation during the maturation of oil palm somatic embryos (1999). Plant Cell Reports. 18: 868-872.
- Mundy J. and Chua N.H. (1988). Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. EMBO J. 7: 2279-2286.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Nakamura, T., Taniguchi, T. and Maeda, E. (1992). Studies on somatic embryogenesis of *coffea* by scanning electron microscope. Jpn. J. Crop Sci. 61: 476-486.
- 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.
- Nuutila, A.M., Hamalainen, J. and Mannonen, L. (2000). Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science. 151: 85-92.

- Nylander M., Svensson J., Palva E.T. and Welin B.V. (2001). Stress induced accumulation and tissue- specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana* Plant Mol. Biol. 45: 263-279.
- Ochoa-Alejo, N. and Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. Sci. Hort. 42:21-28.
- Ochoa-Alejo, N. and Ramírez-Malagon, R. (2001). *In vitro* chili pepper biotechnology. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37:701-729.
- Osborne, T. B. (1907). The proteins of the wheat kernel. Carnegie Institute. Whashington, whashington D. C., Publ: 84: 1-119.
- 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.
- Pérez-Molphe, E.M., Ramírez- Malagon R., Núñez-Palenius H.G. and Ochoa-Alejo N. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, pp: 9-11, 16-20, 27-35, 57-60, 81-84.
- Ramírez-Malagon, R. and Ochoa-Alejo, N. (1996). An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. Plant Cell Rep. 16:226-231.
- Rock C.D. and Quatrano R.S., (1995). The role of hormones during seed development En: "Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology" (Davies P.J. Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp: 671-697.
- 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.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre kontrolle an Gewebekulturen aus Karroten. Naturwissenschaften, 43: 344-345.

-
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventiveebryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53: 318-333.
- Rudús I., Kepczynská E. and Kepczynski J. (2006). Comparative efficacy of abscisic acid and methyl jasmonate for indirect somatic embryogenesis in *M. sativa* L. *Plant Growth Regul.* 48:1–11.
- Santana, N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.), Tesis de doctorado. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba.
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M., Zapata-Castillo P., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O., and Miranda-Ham M. 2005. Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis *Hortscience* 40(6): 829-1831.
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias-Andreu I., Montalvo-Peniche M.C., Lopez-Puc G. and Barahona-Pérez F. (2006). Improvement of In Vitro Culturing of *Capsicum chinense* Jacq. by Inhibition of Ethylene Effects. *Hortscience* 41 (2) 405-409.
- Skoog, F. and Miller C.O. (1957). Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. *Symposium of the Society of Experimental Biology* 11:118-140.
- Steinitz B., Küsek M., Tabib Y., Paran I. and Zelcer A. (2003). Pepper (*Capsicum annum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39:296-303.
- Stejskal, J. (1994). Comparative analysis of proteins and isozymes in somatic and zygotic embryos of soybean (*Glycine max* (L.) Merr). Ph D. Thesis, IEB Prague.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. and Maens, K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures growth from freely suspended cell. *Am. J. Bot.* 45: 705- 708.
- 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.

- Stuart, D.A., Nelse, J. and Nichol, J.W. (1988). Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 132: 134-139.
- 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.
- 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.
- Tisserat, B., Esan, B.B.T. and Murashige, T. (1979). Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hortic. Rev.* 1:1-78.
- Thorpe E. (1995). *In Vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academia Publishers. Netherlands.
- Tomaz M., Mendes B., Filho F., Demetrio C., Jansakul N. and Rodriguez A. (2001). Somatic Embryogenesis in *Citrus* ssp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 446-452.
- Valera-Montero L. and 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.
- Venkataiah P., Christopher T. and Subhash K. (2003) Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annuum* L. *J Plant Biotechnology.* 5:245-250.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Mundy J. and Chua N.H., (1989). Four tightly linked rab genes are differentially expressed in rice. *Plant Mol. Biol.* 14: 29-39.
- Zapata-Castillo P., Canto-Flick A., Lopez-Puc G., Solís-Ruiz A. Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2007). Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. *Hortscience* 42(2): 329-333.

CAPÍTULO II

CHANGES IN THE PROTEIN PROFILE OF HABANERO PEPPER (*Capsicum chinense* J.) SOMATIC EMBRYOS DURING DEVELOPMENT.

Carlos A. Lecona-Guzmán¹, Daniela Solís-Marroquín¹, Susana Aviles-Viñas¹, César De los Santos-Briones¹ and Nancy Santana-Buzzy^{1*}

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), A.C. Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C. P. 97200, Mérida, Yucatán, México.

*Corresponding Author: Email: buzzy@cicy.mx; phone +52 (999) 9428330; fax +52 (999) 9813900

■ ESTE CAPÍTULO HA SIDO ACEPTADO PARA SU PUBLICACION EN LA REVISTA AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

2.1 Abstract

Protein profile was studied during the development of *Capsicum chinense* somatic embryos. The total protein content and protein spectra (by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) of somatic embryos at different developmental stages (globular, heart-shaped, torpedo and cotyledonary stages) were analyzed. The protein profile of zygotic embryos included 9 exclusive bands with molecular weights of 4.0, 5.2, 8.1, 13.7, 20.9, 23.7, 41, 50, and 69.3 kDa; these bands were not observed in the protein profile of somatic embryos. Coincidentally, 5 of these bands possessed similar molecular weights to those reported for storage proteins in other plant species. Protein content showed a clear decreasing tendency with increasing somatic embryo development. The lowest protein content was detected in somatic embryos at the cotyledonary stage (0.436 µg/mg fresh weight), and the highest content was found in somatic embryos at the globular stage (2.98 µg/mg fresh weight). Total proteins 2DE analysis of mature cigotic embryo (prior to the desiccation) and cotyledonar somatic embryo, showed significant differences in the protein profile of both types of embryos. Cigotic embryo showed the proteins expression of isoelectric point between 4-7 and 7-10, and molecular weights between 25-36 KDa, which were not expressed in the cotyledonar somatic embryo. The low protein content during the development of the somatic embryos, particularly at the cotyledonary stage, is a factor that could be related to the *in vitro* behavior of *C. chinense*.

Key words: Recalcitrance, maturation, germination, conversion.

2.2 Introduction

Somatic embryogenesis, which is based on cellular totipotency, refers to the process in which somatic or non-sexual cells are induced to form bipolar embryos through a series of developmental steps similar to those occurring during *in vivo* embryogenesis. Since the early descriptions of the process in carrot (Steward *et al.*, 1958; Reinert, 1958), somatic embryo formation has been achieved for a variety of plant species, including angiosperms and gymnosperms (see Brown *et al.*, 1995; Dunstan *et al.*, 1995; KrishnaRaj and Vasil, 1995; Thorpe and Stasolla, 2001). However, some species are recalcitrant to *in vitro* conditions. Although *in vitro* recalcitrance is a major problem in plant biotechnology programs it is rarely considered in any detail (Benson, 2000). The factors that cause recalcitrance in plants are still unclear. Some evidences indicate that recalcitrance is closely related to genotype, *in vitro* manipulation, and the stress to which cells are subjected during *in vitro* culture (Stasolla *et al.* 2002; Benson, 2000). Recalcitrance can manifest in any stage of *in vitro* plant regeneration.

Capsicum is considered an *in vitro* recalcitrant genus because of the low efficiency and reproducibility of its protocols, the low rate of conversion to plantlets and the high frequency of deformed somatic embryos (Buyucalaka and Mavituna 1996; Binzel *et al.* 1996; López-Puc *et al.* 2006; Zapata-Castillo *et al.* 2007). Recent studies have reported a substantial increase in the efficiency of somatic embryos obtained, either directly or indirectly from explants, working with the *C. chinense* species (López-Puc *et al.* 2006; Zapata-Castillo *et al.* 2007). However, these regeneration systems are limited by a low germination rate and a high frequency of deformed embryos, which hinders to obtain complete plants.

In several plant species, including *Medicago truncatula* (Imin *et al.* 2004, 2005), *Picea glauca* (Lippert *et al.* 2005), *Cyclamen persicum* (Winkelman *et al.* 2006), and *Vitis vinifera* (Marsoni *et al.* 2008), proteomics has been used to study somatic embryogenesis. Proteins directly influence cellular biochemistry and provide a more accurate analysis of change during growth and development cellular (Chen and Harmon 2006). Storage proteins were the first compounds used as markers in comparing the developmental programs of somatic and zygotic embryogenesis (Hakman *et al.* 1990; Hakman 1993). Numerous reports exist on proteins associated with somatic embryogenesis in plants,

based on their similarity with their zygotic counterparts. Most knowledge so far has come from studies on alfalfa (Stuart *et al.* 1988; Krochko *et al.* 1992, 1994; Lai *et al.* 1992; Lecouteux *et al.* 1993; Lai and Mckersie 1994) and soybean (Christou and Yan 1989; Slawinska and Obendorf 1991; Komatsuda *et al.*, 1992; Dahmer *et al.*, 1992; Stejskal and Griga 1995; Chanprame *et al.*, 1998; Griga *et al.*, 2007), which represent traditional experimental models of SE. However, there is a lack of information on biochemical aspects involved in somatic embryogenesis of *Capsicum* genus. The objective of this study was to meet the changes in protein profiles in somatic embryo of *C. chinense* in different developmental stages.

2.3 Material and methods

Preparation of plant material. Seeds of Habanero pepper cv. Rux-02 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 (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 photoperiod of 16 h lights (40 – 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) at 25 ± 2 °C. The hypocotyls were extracted from the dissection of plantlets at 20-25 d of germination.

Somatic embryogenesis induction (SE). Under aseptic conditions, segments from *in vitro* plantlet hypocotyls were isolated by cutting with a razor blade. These isolated segments were used as explants. Induction of SE and somatic embryo production were performed as reported by López-Puc *et al.*, (2006). Excised hypocotyls were placed in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL MS medium supplemented with 3% sucrose, 9 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 29 μM thiamine-HCl, 42 μM cysteine-HCl, 55 μM myo-inositol, and 0.2% gelrite. Explants were maintained at 25 ± 2 °C in photoperiod (16 h light, 40–50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ / 8 h dark). A total of 5 explants were placed in each flask, and 5 replicas were used. All reagents for plant growth culture were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Isolation of embryo zygotic. Green and fully developed fruits of Habanero pepper cv. Rux-02 were harvested from plants grown under greenhouse conditions. The seeds for obtain zygotic embryos were taken immediately after collected the fruits, to prevent desiccation of the embryo. For the extraction of the seeds was carried out to longitudinal cutting to the fruit. The zygotic embryo contained in each seed was isolated using forceps and scalpel, and with the aid of a microscope esteroscopic (Nikon, MilesCo Scientific, USA).

Protein extraction for electrophoresis and quantitation. Somatic embryos were separated by stage of development (globular, heart-shaped, torpedo and cotyledonary stages). Three independent samples (replicates) of 100 mg each one from protein extraction were performed from each develop stage, including the samples of the control (zygotic embryos). Samples of somatic embryos and mature zygotic embryos were homogenized with 11 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 10 mM magnesium chloride, 1 mM ethylenediaminetetracetic acid, 5% 2-mercaptoethanol, 2% polyvinilpyrrolidone, and 10% glycerol and centrifuged at $16000 \times g$ for 10 min. Electrophoresis was carried out according to Laemmli (1970). Soluble proteins in supernatant were separated using a discontinuous sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; 5% stacking gel [pH 6.8], 15% running gel [pH 8.8]) at 4°C. Tris-glycine buffer (pH 8.3) containing 0.1% SDS was used as the electrode solution. Electrophoretic separations were performed at a constant current of 90 mA. After electrophoresis, the gels were silver stained. Soluble protein quantification was determined using the Bradford (1976) method by measuring the absorbance (A_{595}) by spectrophotometer (Genesys 5 UV-SENSE). All experiments were repeated twice and were conducted using a random design with at least 3 replicates.

Two-dimensional isoelectrofocusing (IEF)/SDS-PAGE. Samples of somatic embryos in the cotyledonary stage and mature zygotic embryos were quickly frozen with liquid nitrogen and homogenized in buffer A (7 M urea, 2 M thiourea, 4% NP-40, 1% DDT, 1% ampholytes [pH 3–10], 1 mM PMSF, 10 mM ethylenediaminetetracetic acid, 40 mM Tris-HCl, and 0.05% PVPP). Extracts were centrifuged at $15000 \times g$ for 15 min at 4°C. Supernatants were precipitated with cooled 10% TCA in acetone that contained 0.07% β -mercaptoethanol. Samples were incubated at -20°C for 2 h to complete precipitation. Precipitates were centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min, and pellets were washed 3 times with

acetone containing 0.07% β -mercaptoethanol. Subsequently, pellets were resuspended in buffer B (7 M urea, 2 M thiourea, 4% NP-40, 1% DTT, and 2% ampholytes [pH 3–10]). This resuspension was continually mixed and then centrifuged at $16000 \times g$ for 15 min at 4°C. Supernatants were recovered and stored at -80°C until use. Protein quantitation was carried out using the Bradford (1976) method, using bovine serum albumin as the standard. IEF was carried out with 20 μg of total protein extract using an immobilized linear 3–10 pH gradient (7 cm \times 3.3 mm, dry strip; Invitrogen, CA, USA). The strips were rehydrated for 24 h at room temperature with protein supernatant in buffer that contained 9.5 M urea, 2% NP-40, 1% DDT, 2% ampholytes, and 0.05% bromophenol blue. IEF was carried out using the ZOOM® IPGRunner system (Invitrogen) at 200 V for 20 min, 450 V for 20 min, 750 V for 20 min, and 1000 V for 60 min. Focused strips were equilibrated for 15 min in NuPAGE® LDS buffer (Invitrogen). Equilibrated strips were placed on top of vertical 15% polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at 4°C according to Laemmli (1970) for 8 h at 160 V. Gels were silver stained. Three independent protein extractions were performed from both samples (somatic embryos in the cotyledonary stage and mature zygotic embryos). Each extraction was analyzed by two gel replicates.

Data analysis. Results were analyzed using analysis of variance and means compared using Tukey's test ($P \leq 0.05$). SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used.

2.4 Results and discussion

Direct somatic embryogenesis was induced from hypocotyl segments cultured on MS medium supplemented with 9 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Somatic embryos in the globular stage became visible after 2 weeks of culture (Figure 1A). After 5 weeks, the transferred embryogenic mass to liquid medium showed an abundant proliferation of somatic embryos (Figure 1A-B), in which were distinguished all of developmental stages (Figure 1C-F). This process was highly efficient and reproducible, and corroborated as reported by López-Puc *et al.*, (2007).



Figure 1. Somatic embryogenesis and developmental stages in *Capsicum chinense*. Somatic embryos obtained directly from explants after A) 2 weeks of culture and B) 5 weeks of culture. Developmental stages correspond to C) globular, D) heart-shaped, E) torpedo, and F) cotyledonary; G) zygotic embryo isolated from *C. chinense*.

Total protein content of developing somatic embryos. Results of protein content show significant differences in any of the evaluated development stages (Figure 2). Contrary to that reported for other species, it was observed that the total protein content decreased as the somatic embryos of *C. chinense* were more advanced in their development. The lowest protein content in the somatic embryos was registered in the cotyledonary stage (0.436 $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW), whereas the highest protein content was observed in the globular stage (2.98 $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW). Protein content of cotyledonary somatic embryos was dramatically lower than the mature zygotic embryo (0.436 vs 14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ FW). Similar studies have been conducted on *Hyoscyamus niger* L. (Ebrahimzadeh *et al.*, 2007), *Pisum sativum* (Griga *et al.*, 2007), *Pinus taeda* (Brownfield *et al.*, 2007), *Vitis vinifera* (Marsoni *et al.*, 2008), *Cyclamen persicum* Mill. (Winkelmann *et al.*, 2006), *Arachis hypogaea* L. (Roja *et al.*, 2005), *Picea glauca* (Lippert *et al.*, 2005), *Hevea brasiliensis* (Lardet *et al.*, 1999), and

Cupressus sempervirens L. (Sallandrouze *et al.*, 1999). These reports have evidenced a clear tendency of increasing protein content with increasing somatic embryo development, although the range varied significantly by species (range = 2-120 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

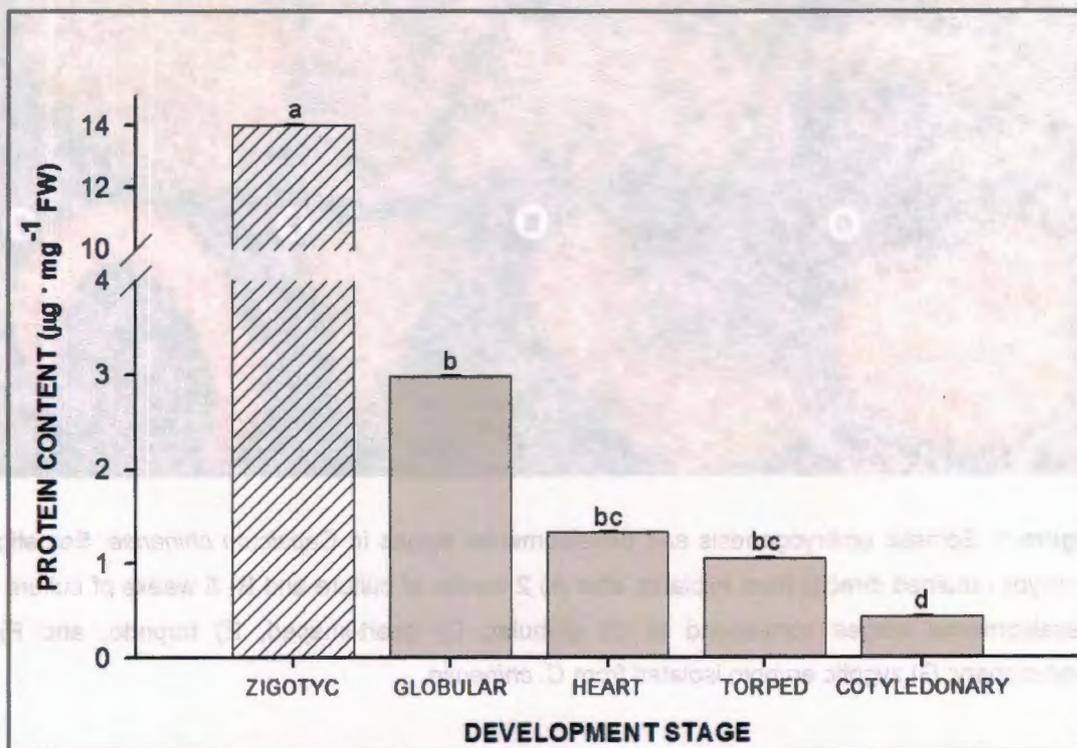


Figure 2. Total protein content of somatic embryos of *Capsicum chinense* at different developmental stages. Data are the means of at least 3 independent replicates. Error bars represent standard deviation. Different letters indicate statistically significant differences according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Composition of total proteins. SDS-PAGE revealed 9 distinctive bands in the zygotic embryos corresponding to 4.0, 5.2, 8.1, 13.7, 20.9, 23.7, 41, 50, and 69.3 kDa (Figure 3); 7 bands (whose molecular weights were 19.4, 20.2, 31.0, 38.3, 45.5, 53.6, and 73.2 kDa) were detected not only in the somatic embryos (at all developmental stages) but in the zygotic embryos, too. Three bands (4.5, 4.8, and 49.1 kDa) were observed in the somatic embryos at the globular stage but were not present in the most advanced developmental stages. Somatic embryos in the heart-shaped and torpedo stages showed great similarity

in terms of protein profile; cotyledonary embryos expressed 2 proteins of 20.5 and 51.8 kDa, which were specific to this developmental stage. Comparing protein profiles of seeds and somatic embryos from *Pinus taeda*, Brownfield *et al.*, (2007) detected in both biological structures 3 proteins whose molecular weights were 22.5, 37.5, and 47 kDa that corresponded to storage proteins. They also reported the presence of 2 proteins (14 and 14.5 kDa) in seeds that were likely related to the desiccation of zygotic embryos. In contrast, in a study that included seeds of 4 varieties of *C. annum* and 2 varieties of *C. frutescens*, Odeigan *et al.*, (1999), obtained 12 bands that could be distinguished in a range of molecular weight between 22 and 98 kDa; in a similar study, but working with seeds of 72 accessions of *Solanum melongena*, Karihaloo *et al.*, (2002) found 35 bands ranging from 14.5 to 52.5 kDa. Results evidenced a repetitive protein profile of 9 bands exclusive to zygotic embryos. Coincidentally, 5 of these bands possessed similar molecular weights to those reported for storage proteins in other species (Derbyshire *et al.*, 1976; Higgins, 1984, Shewry *et al.*, 1995; Griga *et al.*, 2007; Brownfield *et al.*, 2007; Vladova *et al.*, 2004).

Two-dimensional gel electrophoresis. Comparing the protein patterns of the somatic and zygotic embryos, the 2-dimensional analysis (Figure 4) showed proteins that ranged from 20 to 130 kDa and an isoelectric point (*pI*) from 3 to 10. However, in both types of embryos, the majority of proteins had a molecular weight between 33 and 120 kDa and a *pI* between 4 and 7. Specifically, a group of proteins was found in the zygotic embryos that was not expressed in the somatic embryos. These proteins had a molecular weight between 40 and 45 kDa and a *pI* range of 7–10. Based on their molecular weight and *pI*, these proteins could be storage proteins (likely corresponding to globulins); however, the protein sequences are required for identification. In addition, protein patterns were evidenced in other groups of proteins that were present in the zygotic embryos but not in the somatic embryos, and vice versa. Proteins of 45 and 50 kDa and *pI* 3 were observed only in the zygotic embryos, whereas proteins between 36 and 38.1 kDa and between *pI* 8.8 and 9.8 were expressed only in the somatic embryos. It is likely that the proteins were associated with embryo origin, even sexual or somatic origin, respectively. It was also observed an small group of proteins that was present in both types of embryos but their expression was much lower in the somatic embryos than in the zygotic embryos.

In a similar study, was reported the presence of 200 proteins with high similarity between zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. (Winkelmann *et al.*, 2006). These researchers identified a protein of approximately 27 kDa and 5–6 pI, similar to 11S globulin. They also observed proteins of 10–15 kDa and pI 4.5–5.5; they were highly expressed, but their expression decreased notably during germination. One protein was very similar to vicilin, suggesting that these proteins could belong to the 7S group of globulins. In contrast, Lippert *et al.*, (2005) reported the expression of 1250 proteins.

A maturation treatment with ABA revealed the higher expression of a protein of 45.2 kDa and pI 8.09 corresponding to vicilin, a storage protein. This finding contrasts notably with our results, because unlike in zygotic embryos, expression of storage proteins in somatic embryos decreases from a low level to none at all. Low protein expression could contribute to the inability of somatic embryos to germinate. The majority of proteins in dicotyledonous seeds correspond to globulins of the 7-8S and 11-14S groups (Derbyshire *et al.*, 1976; Higgins 1984). 7S globulins are from 150 to 180 kDa, with 3 subunits bound by weak interactions (Derbyshire *et al.*, 1976; Higgins 1984; Shewry *et al.*, 1995). In contrast, 11S globulins are hexamers (350–460 kDa) with intermediate subunits bound by disulphide bridges that create monomers of 40 and 20 kDa when denaturalized. Vladova *et al.*, (2004) found two 11S globulin subunits on 2 varieties of *C. annuum*, and Griga *et al.*, (2007) reported on the expression of storage protein-type globulins (legumin, vicilin, convicilin) as well as their subunits. The highest expression corresponded to convicilin and vicilin proteins at 47–50 kDa and 70–75 kDa, respectively.

Biochemical and molecular changes associated with SE have been studied in such species as rapeseed (Crouch 1982), carrot (Choi and Sung 1984; Dodeman and Ducreux 1996), ruffle (Chen and Luthe 1987), break wind (Stirn and Jacobsen 1987), cotton (Shoemaker *et al.*, 1987), trifolium (McGee *et al.*, 1989), *Dactylis glomerata* (Hahne *et al.*, 1988), coffee (Yuffa *et al.*, 1994), *Camellia japonica* (Pedroso *et al.*, 1995), soybean (Stejskal and Griga 1995), barley (Stirn *et al.*, 1995), sugarcane (Blanco *et al.*, 1997), and birch (Hvoslef-Eide and Corke 1997). However, there have been no reports related to biochemical changes during SE in *Capsicum*.

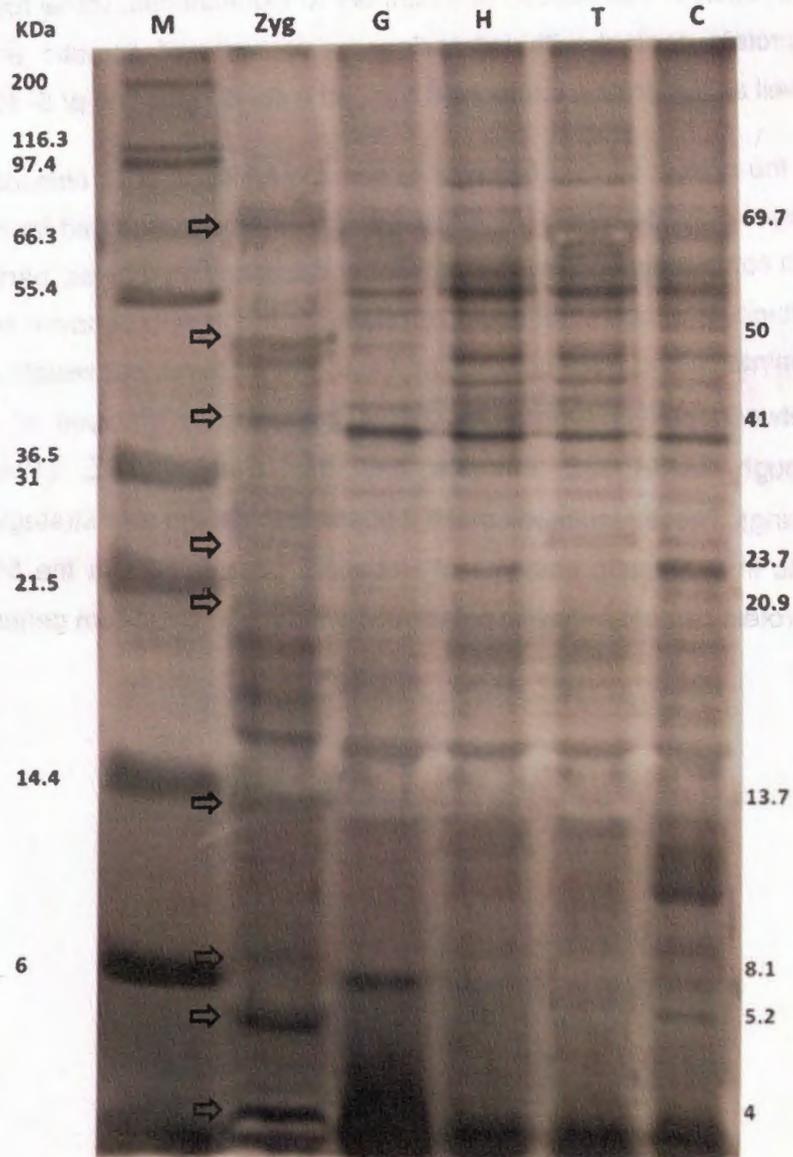


Figure 3. Protein pattern (12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) of somatic embryos from *Capsicum chinense* Jacq. M: molecular weight marker; Zyg: zygotic embryo; G: globular somatic embryo; H: heart-shaped somatic embryo; T: torpedo-shaped somatic embryo; C: cotyledonary somatic embryo.

This is the first report in this aspect, and contrary to expectations, these results reveal to decrease in protein content with increasing development of somatic embryos of *C. chinense*, as well as low protein expression (ranged = 45–50 kDa and pI 5–10).

In conclusion, the protein content behavior of somatic embryos of *C. chinense* throughout successive stages of its development, differs to what has been reported for other species. The low protein content during the development of the somatic embryos, particularly at the cotyledonary stage, is a factor that could be related to the *in vitro* behavior of *C. chinense* during the germination and plant conversion. On the other hand, our results show notable differences between protein profiles of zygotic and somatic embryos of *C. chinense*, observed through SDS-PAGE analysis and the analysis 2DE (Two-dimensional isoelectrofocusing). These results will make it possible to design new strategies to achieve complete plants from somatic embryos of Habanero pepper. This is the first attempt to elucidate the protein content behavior on somatic embryos in Capsicum genus.

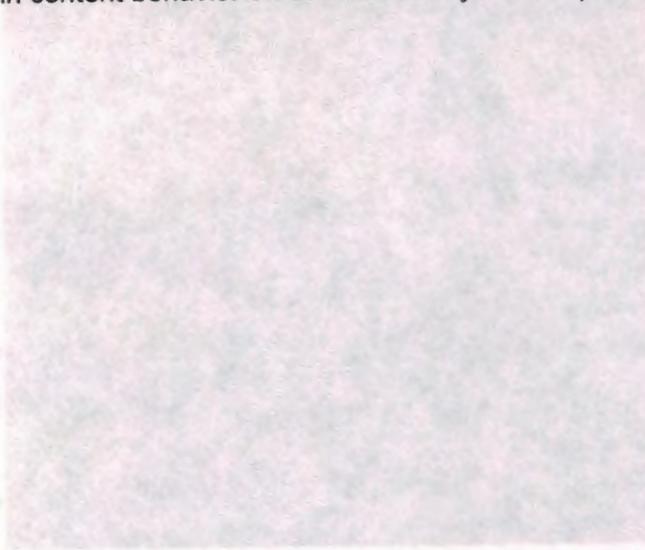


Figure 2. Protein pattern (12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) of somatic embryos from Capsicum chinense. Lane 1: cotyledonary stage embryo; Lane 2: globular somatic embryo; Lane 3: heart-shaped somatic embryo; Lane 4: torpedo-shaped somatic embryo; Lane 5: cotyledonary somatic embryo.

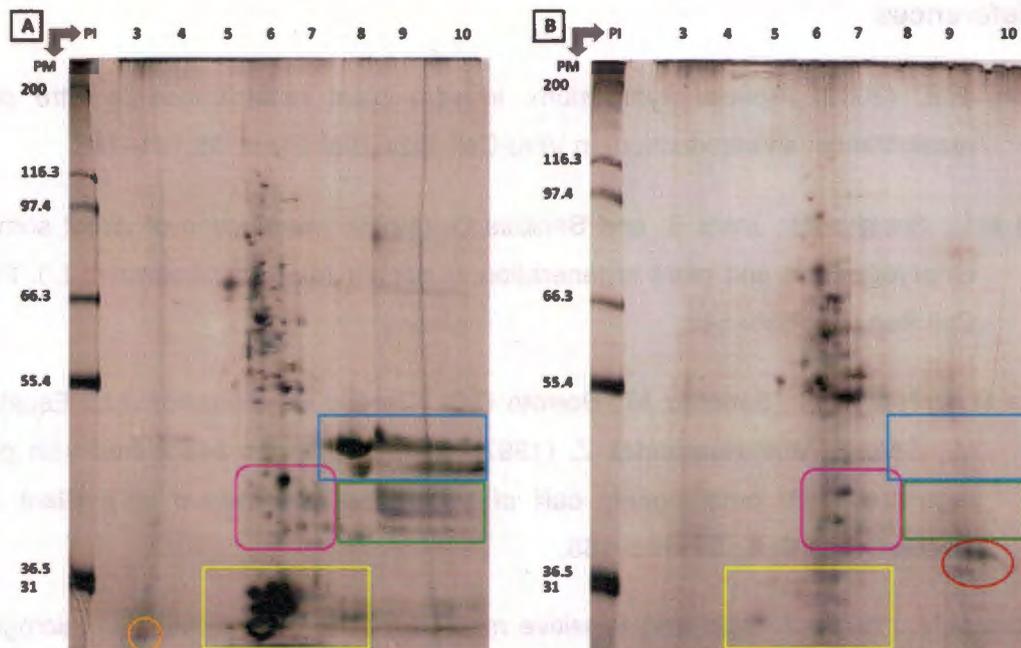


Figure 4. Two-dimensional isoelectrofocusing/sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (IEF/SDS-PAGE) of A) zygotic embryo and B) cotyledonary somatic embryo from *Capsicum chinense*. A total of 25 μ g protein was separated on the first dimension in a linear gradient (pI 3–10); the second dimension was by 15% SDS-PAGE; gels were silver stained.

2.5 References

- Benson, E.E. (2000). Special symposium: in vitro plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36:141–148.
- Binzel M.L., Sankhla N., Joshi S. and Sankhla D. (1996). Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.*, 15: 535–540.
- Blanco M.A., Nieves N., Sanchez M., Borroto C.G., Castillo R., Gonzalez J.L., Escalona M., Baez E. and Hernandez Z. (1997). Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 51: 153–158.
- 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.
- Brownfield D.L., Todd Ch.D., Stone S.L., Deyholos M.K. and Gifford D.J. (2007). Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 88:217–223.
- Buyukalaca S. and Mavituna F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46: 227–235.
- Chanprame S., Kuo T.M. and Widholm J.M. (1998). Soluble carbohydrate content of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] somatic and zygotic embryos during development. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 34:64–68.
- Chen L.J. and Luthe D.S. (1987). Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.*, 48: 181–188.
- Chen S.X. and Harmon A.C. (2006). Advances in plant proteomics. *Proteomics*, 6:5504–5516.

-
- Choi J.H. and Sung Z.R. (1984). Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryonic proteins. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 2: 19–25.
- Christou P. and Yang N.S. (1989). Developmental aspects of soybean (*Glycine max*) somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 64: 225–234.
- Crouch M.L. (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta*. 156: 520–524.
- Dahmer M.L., Hildebrand D.F. and Collins G.B. (1992). Comparative protein accumulation patterns in soybean somatic and zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 28: 106–114.
- Derbyshire E., Wright D. and Boulter D. (1976). Legumin and vicilina storage proteins in legume seeds. *Phytochemistry*. 15: 3–24.
- Dodeman V.L. and Ducreux G. (1996). Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. *Plant Sci.*, 120: 57–69.
- Ebrahimzadeh M., Ebrahimzadeh H., Ghorbanli M., Fahimi H. and Majd A. (2007). Qualitative and Quantitative Evaluation of Proteins During Different States of Somatic Embryogenesis from Leaf Explant in *Hyoscyamus niger* L. *Journal of Biological Sciences*, 7 (8): 1394–1399.
- Griga M, Horacek J. and Klenoticova H. (2007). Protein patterns associated with *Pisum sativum* somatic embryogenesis. *Biologia plantarum*, 51 (2): 201–211.
- Hahne G., Mayer J.E. and Lorz H. (1988). Embryogenic and callus specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Sci.*, 55: 267–279.
- Hakman I. (1993). Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 87: 148–159.

- Hakman I., Stabel P., Engström P. and Eriksson T. (1990). Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). *Physiologia Plantarum*, 80: 441–445.
- Higgins T. (1984). Synthesis and regulation of major proteins in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35:191–221.
- Hvoslef-Eide A.K. and Corke F.M.K. (1997). Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 51: 35–41.
- Imin N., De Jong J., Mathesius U., van Noorden G., Saeed N.A., Wang X.D., Rose R.J. and Rolfe B.G. (2004). Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics*, 4:1883–1896.
- Imin N., Nizamidin M., Daniher D., Nolan K.E., Rose R.J. and Rolfe B.G. (2005) Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. Explant cultures grown under 6-benzylaminopurine and 1-naphthaleneacetic acid treatments. *Plant Physiol*, 137:1250–1260.
- Karihaloo J.L., Manjeet K. and Sonika S. (2002). Seed protein diversity in *Solanum melongena* L. and its wild and weedy relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 533–539.
- Komatsuda T., Lee W. and Oka S. (1992). Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skwartz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 28: 103–113.
- Krochko J.E., Bantoch D.J., Greenwood J.S. and Bewley J.D. (1994). Seed storage proteins in developing somatic embryos of alfalfa: defects in accumulation compared to zygotic embryos. *J. Exp. Bot.*, 45: 699–708.
- Krochko J.E., Pramanik S.K. and Bewley J.D. (1992). Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.*, 99: 46–53.

- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lai F.-M. and McKersie B.D. (1994). Regulation of starch and protein accumulation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos. *Plant Sci.*, 100: 211–219.
- Lai F.M., Senaratna T. and McKersie B.D. (1992). Glutamine exchanges storage protein synthesis in *Medicago sativa* L. Somatic embryos. *Plant Science*, 87:69–77.
- Lardet L., Piombo G., Oriol F., Dechamp E. and Carron M.P. (1999). Relations between biochemical characteristics and conversion ability in *Hevea brasiliensis* zygotic and somatic embryos. *Can. J. Bot.*, 77: 1168–1177.
- Lecouteux C.G., Lai F.-M. and McKersie B.D. (1993). Maturation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) somatic embryos by abscisic acid, sucrose and chilling stress. *Plant Sci.*, 94: 207–213.
- Lippert D., Zhuang J., Ralph S., Ellis D.E., Gilbert M., Olafson R., Ritland K., Ellis B., Douglas C.J. and Bohlmann J. (2005). Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics*, 5:461–473.
- Lopez-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.
- Marsoni M., Bracale M., Espen L., Prinsi B., Negri A.S. and Vannini C. (2008). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *Plant Cell Rep.*, 27 (2):347–356.
- McGee J.D., Williams E.G., Collins G.B. and Hildebrand D.F. (1989). Somatic embryogenesis in *Trifolium*: Protein profiles associated with high- and low-frequency regeneration. *J. Plant Physiol.*, 135: 306–312.

- Odeigan P.G.C., Oboh B. and Aghalokpe I.O. (1999). The characterization of Nigerian varieties of pepper, *Capsicum annum* and *Capsicum frutescens* by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 46: 127–131.
- Pedroso M.C., Hilbert J.L., Vasseur J. and Pais M.S. (1995). Polypeptides associated with the induction of direct somatic embryogenesis in *Camellia japonica* leaves 1. Identification of embryo-specific polypeptides. *J. Exp. Bot.*, 46:1579–1584.
- Roja R.A., Reddy V., Prakash B.P. and Padmaja G. (2005). Changes in protein profiles associated with somatic embryogenesis in peanut. *Biologia Plantarum*, 49(3): 347–354.
- Sallandrouze A., Faurobert M., El Maataoui M. and Espagnac H. (1999). Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. *Electrophoresis*, 20:1109–1119.
- Shewry P., Napier J. and Tatham A. (1995). Seed storage proteins: structure and biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 945–956.
- Shoemaker R.C., Christofferson S.E. and Galbraith D.W. (1987). Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.*, 6:12–15.
- Slawinska J. and Obendorf R.L. (1991). Soybean somatic embryo maturation: composition, respiration and water relations. *Seed Sci. Res.*, 1: 251–262.
- Stasolla C., Kong L., Yeung E.C. and Thorpe T.A. (2002). Somatic embryogenesis in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. In *Vitro Cell. Dev. Biol.*, 38:93–105.
- Stejskal J. and Griga M. (1995). Comparative analysis of some isozymes and proteins in somatic and zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Plant Physiol.*, 146: 497–502.
- Stirn S. and Jacobsen H.J. (1987). Marker proteins for embryogenic differentiation patterns

in pea callus. *Plant Cell Rep.*, 6: 50–54.

Stirn S., Mordhorst A.P., Fuchs S. and Lorz H. (1995). Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regeneration capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell cultures. *Plant Sci.*, 106: 195–206.

Stuart D.A., Nelse J. and Nichol J.W. (1988). Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. *J. Plant Physiol.*, 132: 134–139.

Vladova R., Tsanev V. and Petcolicheva K. (2004). Seed storage proteins in *Salanaceae* and *Cucurbitaceae* species. *Biologia Plantarum*, 48 (4): 601–603.

Winkelmann T., Heintz D., Van Dorsselaer A., Serek M. and Braun H.P. 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, 224: 508–519.

Yuffa A.M., de Garcia E.G. and Nieto M.S. (1994). Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. *Plant Cell Rep.*, 13: 197–202.

Zapata-Castillo P., Canto-Flick A., Lopez-Puc G., Solís-Ruiz A. Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2007). Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. *Hortscience*, 42(2): 329–333.

Zimmerman J.L. 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411–1423.

CAPÍTULO III

EFECTO DEL ÁCIDO ABSCÍSICO EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO

3.1 INTRODUCCIÓN

En trabajos anteriores se ha demostrado que en *Capsicum chinense* es difícil que ocurra la germinación de los embriones somáticos y su conversión a planta (Lopez Puc *et al.*, 2006; Zapata Castillo *et al.*, 2007). Es en esta etapa donde 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 que los embriones somáticos presentan falta de maduración y falta de tolerancia a la desecación y la dormancia. Para lograr la conversión del embrión y mejorar la eficiencia de la regeneración a planta, se han evaluado diferentes estrategias, como la adición de agentes osmóticos, tales como: carbohidratos y azúcares alcohol.

El ácido abscísico (ABA) está involucrado en procesos fisiológicos importantes como el desarrollo de la semilla y la adaptación de las plantas al estrés ambiental (Walton 1980, Giraudat, *et al.*, 1994). El ABA se ha utilizado para incrementar la respuesta embriogénica en el cultivo de tejidos de diferentes especies monocotiledóneas (Rajasekaran *et al.*, 1987; Close y Ludeman 1987, Carman 1988; Brown *et al.*, 1989; Fernando y Gamage 2000), dicotiledóneas (Zdravkovic-Korac and Neskovic 1999) y angiospermas como las coníferas (von Arnold and Hakman 1988; Roberts 1991). También ha sido usado para promover y sincronizar la maduración de embriones somáticos (Roberts *et al.*, 1990; Label and Lelu 1994; Torres *et al.*, 2001). El ABA en el medio de cultivo puede promover el desarrollo normal de embriones somáticos (Ammirato 1987), previene la germinación precoz de embriones somáticos (Ammirato 1987), y promueve la acumulación de

proteínas de reserva (Wurtele *et al.*, 1993; Etienne *et al.*, 1993).

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de ABA (3.78 μM , 18.9 μM y 37.8 μM) en el contenido y composición de las proteínas en embriones somáticos de *Capsicum chinense*. Se encontraron cambios en el contenido de proteínas para todos los estadios de desarrollo analizados y para los tres tratamientos de ABA evaluados. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el tratamiento con ABA a una concentración de 37.8 μM , ya que el contenido y composición de proteínas fue mayor.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL

Para este estudio, se seleccionaron semillas del cultivar Uxmal-02 (Rux) proveniente del banco de germoplasma de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Esta variedad de fruto de color rojo fue seleccionada por ser una de las más conocidas y demandadas, tanto local como nacionalmente.

3.2.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas se desinfectaron en una solución de etanol al 70% por 5 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex: 6% de cloro activo) diluido al 30 % (v/v) durante 15 minutos. Después de esto, las semillas se enjuagaron tres veces más con agua destilada estéril. Todo el procedimiento se realizó en agitación (Santana *et al.*, 2005).

Las semillas fueron germinadas *in vitro*, con el fin de establecer un stock de plantas asépticas para la toma de explantes. El medio utilizado para la germinación de semillas fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 1.156 μM de ácido giberélico (AG₃), 3% de sacarosa, 0.2% de gelrite, y un pH de 5.7, las semillas se incubaron en cuarto oscuro a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 días. Una vez germinadas, las

plántulas fueron transferidas a un cuarto de fotoperíodo (16 horas luz/8 oscuridad) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 días.

3.2.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES)

3.2.3.1. INDUCCIÓN

Para la inducción de la embriogénesis, se tomaron hipocotilos de plántulas de 25 días en condiciones asépticas. El explante se colocó en medio MS, suplementado con $9.05 \mu\text{M}$ de Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), 3% de Sacarosa, $29.6 \mu\text{M}$ de tiamina-HCl, $42.3 \mu\text{M}$ de Cisteína-HCl, $555 \mu\text{M}$ de mio-inositol, 0.2% gelrite (López-Puc. *et al.*, (2006). Se colocaron cinco explantes por frasco, con cinco réplicas y se mantuvieron a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, bajo condiciones de fotoperíodo (16 horas luz/8 oscuridad) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.3.2. HISTODIFERENCIACION

Posterior a los 30 días de inducción, los explantes obtenidos fueron trasferidos a medio líquido, como fue reportado por Avilés (2008), el cual está constituido de la siguiente manera: sales MS, 2,4-D ($4.5 \mu\text{M}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), y el pH de 5.8. y fue suplementado con diferentes concentraciones de ácido abscísico (0, $3.78 \mu\text{M}$, $18.9 \mu\text{M}$, $37.8 \mu\text{M}$) . Los explantes se incubaron a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con luz continua (24 hrs. luz) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Por un periodo de 7 días con agitación (100 rpm), una vez transcurrido este tiempo los embriones somáticos fueron transferidos a medio MS nuevo libre se ABA con cambio de medio cada 14 días.

3.2.4. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

3.2.4.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS

El contenido de proteínas solubles se determinó de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar, con la ayuda de un espectrofotómetro Genesys 5 UV-VIS.

3.2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS

Para la realización de la electroforesis se utilizaron como muestras embriones cigóticos y mezclas de embriones somáticos de cada tratamiento con ABA. Las muestras se prepararon homogenizando en frío de forma individual embriones en cada uno de los estadios de desarrollo en 300 μ L de solución amortiguadora de extracción 0.011M Tris-Glicina pH 7.5. Los extractos proteicos se pasaron para su análisis por una fase de desnaturalización por calentamiento en baño María a 100 °C. En todos los casos los extractos obtenidos se centrifugaron a 13000 rpm. durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf previamente rotulado y conservado a -80°C hasta su uso.

Los estudios de la variación en la composición de proteínas totales se realizó mediante el método electroforético en sistema disociante (SDS-PAGE; Electroforesis en Geles de Poliacrilamida, empleando dodecil sulfato de sodio) siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Se emplearon geles de poliacrilamida al 15 y 5% de concentración para los geles de separación y compactación, respectivamente. Se empleó el equipo de electroforesis (SE 600 series electrophoresis unit I, Hoefer) de 14 x 16 cm con un espesor de 1.5 mm, y para su ensamblaje se siguieran las instrucciones del fabricante. En los electrodos se utilizó en todos los casos solución amortiguadora Tris-Glicina pH 8.3 (Iglesias, 1986). En el caso de las separaciones proteicas se empleó un kit de estándares de pesos moleculares (200,000-21,500 d). Los extractos proteicos fueron separados a 160 volts durante ocho horas a 4°C de temperatura, para este fin se empleó una fuente de poder marca Consort modelo E844.

Finalizado el tiempo de corrida, los geles se tiñeron con 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 se retiró y los geles se enjuagaron con agua destilada dos veces por 20 s. Posteriormente se llevó a cabo 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 oscureció, se cambió por otra porción de solución reveladora fresca. Después de que se adquirió la intensidad de tinción deseada, el revelado se detuvo retirando la solución reveladora y se adicionó ácido acético al 12% y metanol al 50%. Los geles teñidos se almacenaron en ácido acético al 7% a 4°C. Todo este proceso se realizó en un equipo de agitación Shaker 25 a 30 rpm.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.3.1. EFECTO DEL ABA EN LA FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

La figura 3.1 muestra la formación de embriones somáticos a los 45 días de cultivo. Como se puede apreciar, todos los tratamientos con ABA respondieron a la formación de embriones somáticos, mostrando una mayor sincronización de los estadios de desarrollo de los ESs, sin embargo, la aparición de embriones somáticos fue más tardada en comparación con el tratamiento testigo, ya que embriones somáticos en estadios más avanzados fueron observados después de 75 días de cultivo (Fig. 3.2).

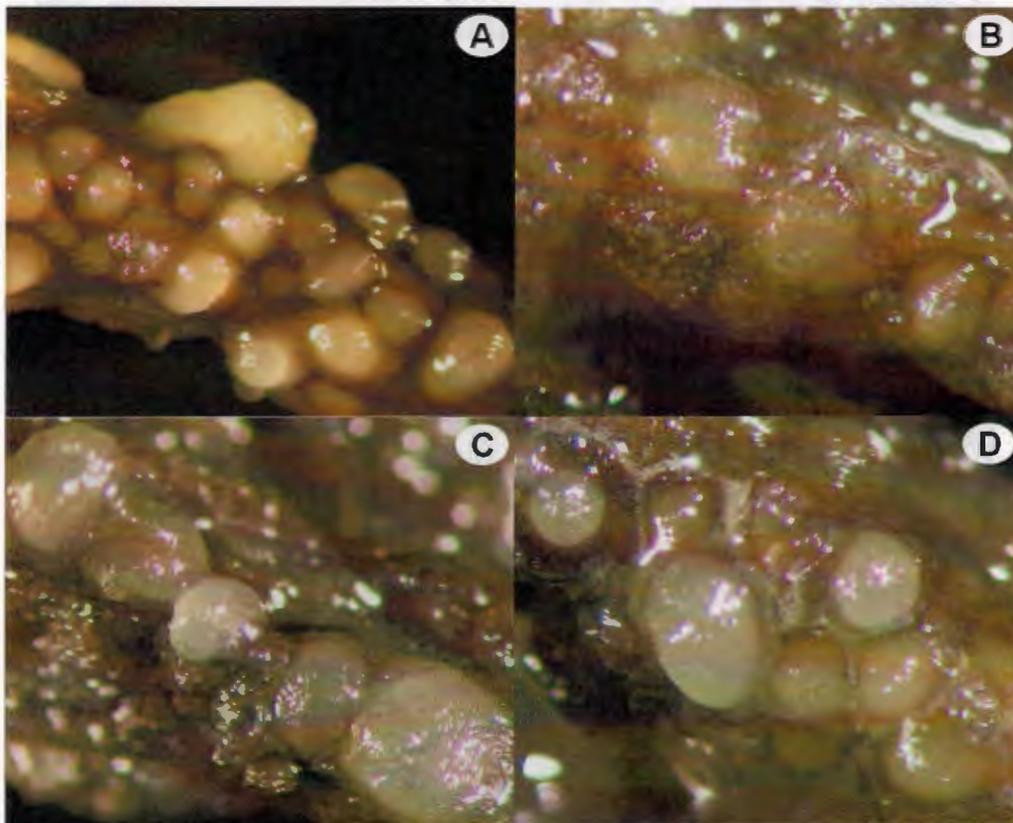


Figura 3.1. Embriones somáticos en estadio globular después de 45 días de cultivo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ABA. A) Tratamiento control Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D; B) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 3.78 μM ABA, C) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 18.9 μM ABA. D) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 37.8 μM ABA.

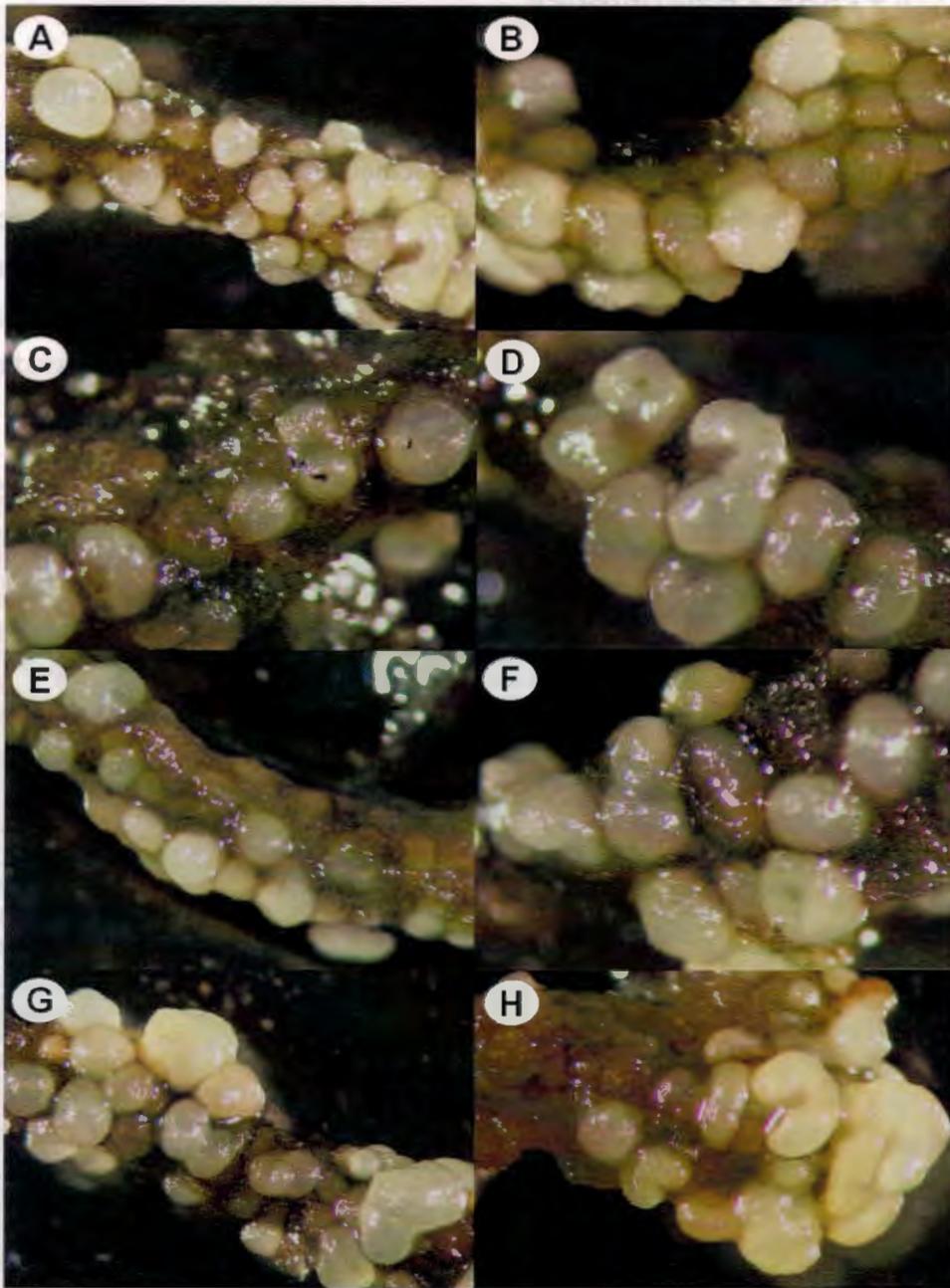


Figura 3.2. Embriones somáticos en estadio corazón y torpedo a 75 días de cultivo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ABA. A-B) tratamiento control, C-D) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 3.78 μM ABA, E-F) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 18.9 μM ABA, G-H) Medio MS suplementado con 4.09 μM de 2,4-D + 37.8 μM ABA.

A los 85 días de cultivo se pudo obtener embriones somáticos en los diferentes estadios de desarrollo, los cuales fueron separados y clasificados para el estudio del contenido y composición del perfil proteico. (Fig. 3.3).

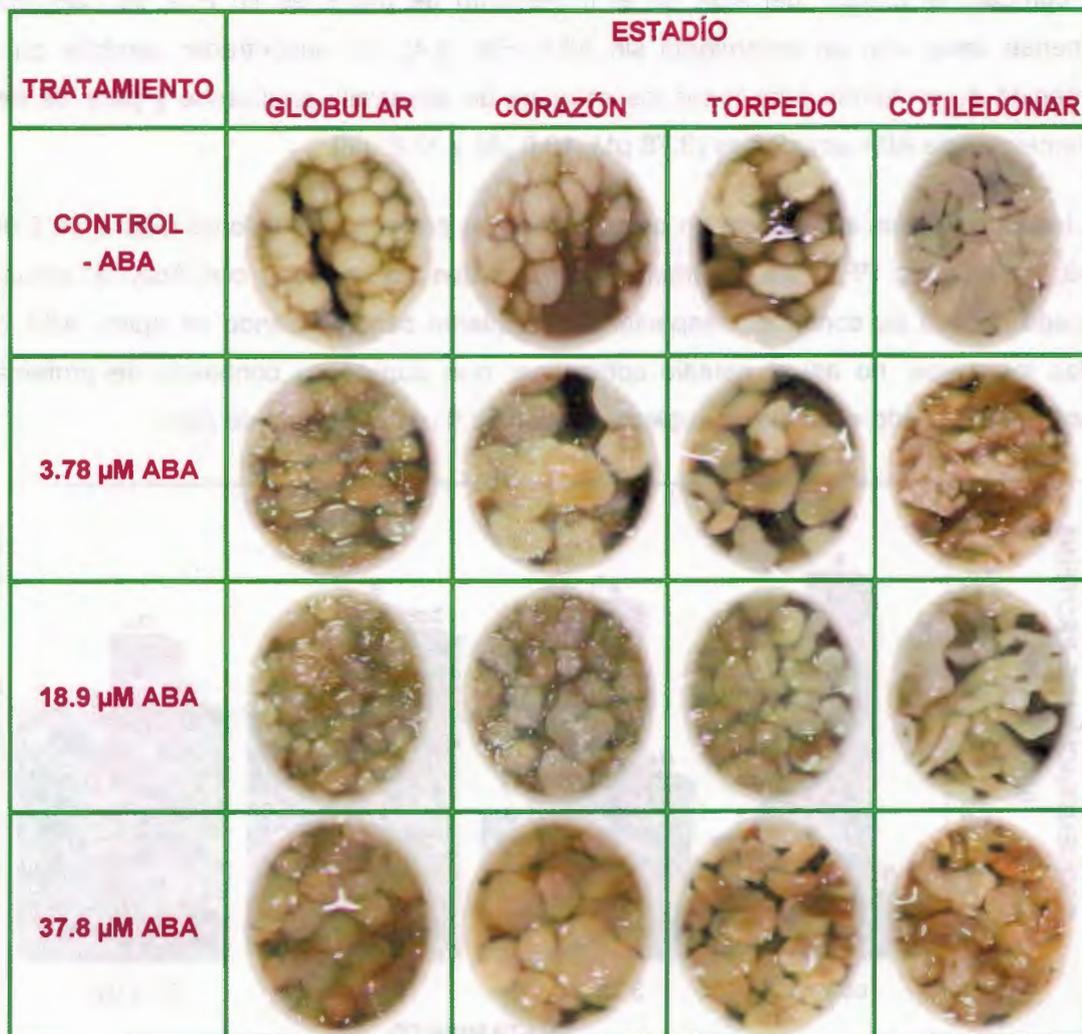


Figura 3.3. Estadios de desarrollo de embriones somáticos a 85 días de cultivo. Medio MS suplementado 4.05 μM de 2,4-D y diferentes concentraciones de ABA.

3.3.2 EFECTO DEL ABA EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

Se comparó el efecto del ABA en el incremento de proteínas en ESs de *Capsicum chinense* Jacq. con un tratamiento sin ABA (Fig. 3.4). Se encontraron cambios en el contenido de proteínas para todos los estadios de desarrollo analizados y para los tres tratamientos de ABA estudiados (3.78 μ M, 18.9 μ M y 37.8 μ M).

En todos los casos el embrión en estadio corazón presentó los valores más altos 9.64, 9.49, 8.63 μ g/mg PF, respectivamente para los tres tratamientos con ABA. El estadio torpedo duplicó su contenido respecto al tratamiento control cuando se aplicó ABA en todos los casos; no así el estadio cotiledonar que duplicó su contenido de proteínas únicamente cuando el medio se suplementó con 18.9 μ M y 37.8 μ M de ABA.

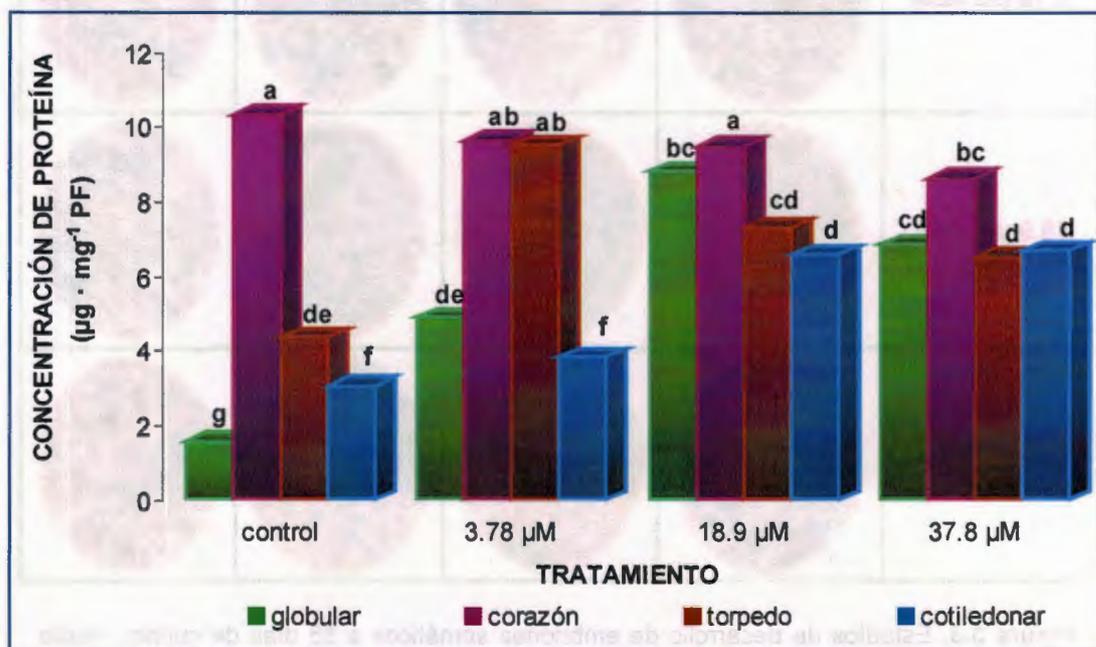


Figura 3.4. Efecto del ABA en el contenido de proteínas en diferentes estadios de desarrollo de ESs de *Capsicum chinense* Jacq. Cada valor es el promedio de 5 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes difieren según dócima de Tukey ($p \leq 0.05$).

Los resultados muestran una similitud con lo reportado por Preeti-Sharma *et al.*, 2004 el cual analizó el contenido de proteína en ESs de *Camellia sinensis* cuando el medio de cultivo fue suplementado con 18.9 μM de ABA encontrando que los ESs incrementaron su contenido en un rango de 18 a 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PF, siendo el ESs corazón el que presentó el mayor contenido de proteína (20 $\mu\text{g}/\text{mg}$).

El contenido de proteínas incrementa en todos los estadios de desarrollo de los ESs en respuesta a los tratamientos con ABA, esto probablemente se deba a que el ABA promueve la acumulación de proteínas de reserva (Cailloux *et al.*, 1996; Liao and Amerson, 1995; Wurtele *et al.*, 1993; Etienne *et al.*, 1993). Por otro lado, además de regular la síntesis y deposición de proteínas de reserva, el ABA regula la expresión de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Barceló *et al.*, 2001; Delseny *et al.*, 2001; Dodeman *et al.*, 1997; Colorado *et al.*, 1995; Rock and Quatrano, 1995).

Aunque el contenido de proteínas se incrementa en todos los estadios de desarrollo de los ESs en respuesta a los tratamientos con ABA, aún siguen siendo bajos en comparación al contenido que presenta el embrión cigótico maduro.

3.3.3 EFECTO DEL ABA EN EL PERFIL DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

Este análisis reveló la presencia de 30 bandas con pesos moleculares que van de 3.4 a 116.3 KDa; mismas que mostraron buena resolución y reproducibilidad en el perfil de bandas obtenidas (Fig. 3.5). Se observa que los ESs del tratamiento control se registraron 25 bandas mientras que en los ESs tratados con las diferentes concentraciones de ABA mostraron 22, 24 y 30 bandas para los tratamientos con 3.78 μM , 18.9 μM y 37.8 μM de ABA respectivamente, de estas bandas cuatro fueron distintivas con pesos moleculares de 19, 49.9, 58.2 y 84.3 KDa que no estuvieron presentes en el tratamiento control. Por otro lado en las mezclas de ESs tratados con 18.9 y 37.8 μM de ABA se observó una banda de 42.9 KDa. Se observó, que las diferentes concentraciones de ABA utilizadas en los tratamientos incrementaron la expresión de proteínas en la mezcla de ESs respecto al tratamiento control, siendo el tratamiento con 37.8 μM el que presentó mayor expresión y número de bandas.

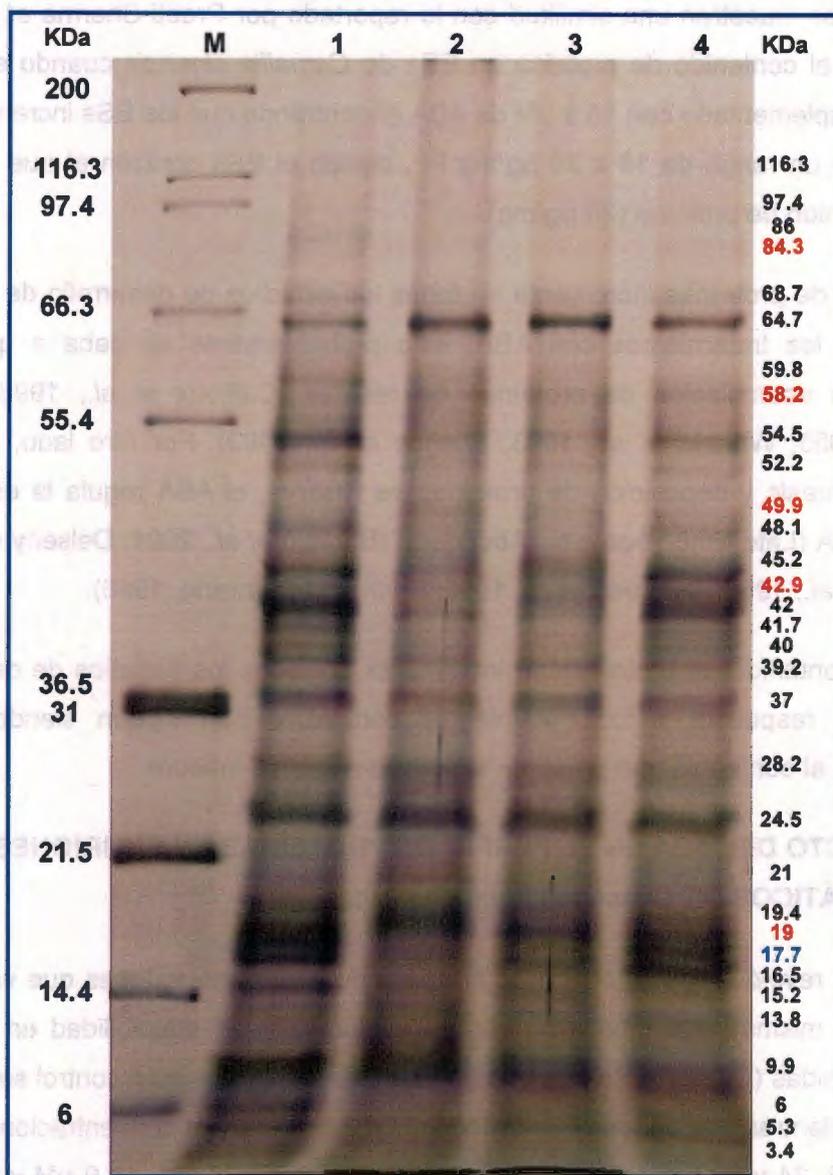


Figura 3.5. Efecto de ABA en el Perfil de proteínas en mezcla embriones somáticos de *Capsicum chinense* Jacq. SDS-PAGE al 15%. Carril 1, control, Mezcla de ESs - ABA; 2, Mezcla de ESs tratados con 3.78 µM ABA; 3, Mezcla de ESs tratados con 18.9 µM ABA; 4, Mezcla de ESs tratados con 37.8 µM ABA. M. Marcador de peso molecular.

3.4 CONCLUSIONES

Todos los tratamientos con ABA mostraron respuesta en la formación de embriones somáticos, encontrándose una mayor sincronía del proceso. Los ESs tratados con 37.8 μM de ABA mostraron una mejor calidad en todos los estadios de desarrollos evaluados. El ABA incrementó el contenido de proteínas en los diferentes estadios de desarrollo de los ESs. Siendo el estadio corazón el que presento mayor contenido de proteínas en todos los casos, así mismo se duplicó el contenido de proteínas en los estadios torpedo y cotiledonar.

Al analizar el perfil proteico de las mezclas de ESs tratados con ABA se observó un incremento en la expresión de las proteínas para todos los tratamientos en comparación con el tratamiento control. La expresión de proteínas se incrementaba conforme la dosis de ABA aumentaba. Se expresaron cuatro bandas con pesos moleculares de 19, 49.9, 58.2 y 84.3 KDa que solo estuvieron presentes en los tratamientos con ABA. Únicamente los tratamientos con 18.9 y 37.8 μM de ABA presentaron la expresión de una proteína con peso molecular de 42.9 KDa, Además que una banda de 17.7 KDa se expresó únicamente en el tratamiento con 37.8 μM de ABA.

Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó el tratamiento con ABA a una concentración de 37.8 μM , ya que el contenido y composición de proteínas fue mayor así como la calidad de los ESs obtenidos.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Ammirato, P.V. (1987). Organizational events during somatic embryogenesis in: Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboer DD (eds). Plant Tissue and Cell. Alan R. Liss, Inc., Berlin Heidelberg pp 57-81.
- Avilés-Viñas Susana A. (2008). Papel del etileno durante la embriogénesis somática de chile habanero *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría.
- Barceló J., Nicolás G., Sabater B. and Sánchez R. (2001). Fisiología Vegetal. Ed. Pirámide, Madrid, España.
- 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.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996). Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 15: 535-540.
- 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.
- Brown C, Brooks FJ., Pearson D., Mathias RJ. (1989). Control of embryogenesis and organogenesis in immature wheat embryo callus using increased medium osmolarity and abscisic acid. J Plant Physiol 133:727-733.
- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linissier L and Coudret A. (1996). Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. Plant Sci. Limerick.120(2): 185–196.
- Carman JG (1988) Improved somatic embryogenesis in wheat by partial simulation of the in-ovulo oxygen, growth-regulator and desiccation environments. Planta 175:417-424.

-
- Carraway D. and Merkle S. (1997). Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. *Can. J. For. Res.* 27:1805–1812.
- Choi M., Kim S. and Park Y. (2002). Somatic embryogenesis from mature zygotic embryos of *Z. jujube* var. *inermis* and *Z. jujube* Miller. *Propagation of ornamental Plants* 2 (1): 3-8.
- Close KR., Ludeman LA. (1987). The effect of auxin-like plant growth regulators and osmotic regulation on induction of somatic embryogenesis from elite maize inbreds. *Plant Sci* 52: 81-89.
- Colorado P., Nicolás C., Nicolás G. and Rodríguez D. (1995). Convergent effects of stress and ABA on gene-expression during germination of chick-pea seeds. *J. Plant Physiol.* 146: 535-540.
- Delseny M., Bies-Etheve N., Carles C., Hull G., Vicient C., Raynal M., Grellet F. and Aspart L. (2001). Late embryogenesis abundant (*LEA*) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *J. Plant Physiol.* 158: 419-427.
- Dodeman VL, Ducreux G. and Kreis M. (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48: 1493–1509.
- Etienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E and Carron MP. (1993). Relation between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) *Plant Sci.* 88: 91–96.
- Fernando SC., Gamage CKA (2000). Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.) *Plant Sci* 151: 193-198.
- Giraudat J., Parcy F., Bertauche N., Gosti F., Leung J., Morris PC., Bouvier-Durand M., Vartanian N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signaling. *Plant Mol Biol* 36: 1557-1577.

- Iglesias, L. (1986). Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glicine max* (L.) Merrill) Tesis de grado de Doctor en Ciencias. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 233p.
- 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.
- 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.
- Label P., Lelu MA. (1994). Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet conversion frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix x leptoeuropaea*). *Plant Growth Regul.* 15:175-182.
- Laemmli Uk. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Liao YK. and Amerson HV. (1995). Slash pine (*Pinus elliotii* Engelm.) somatic embryogenesis II. Maturation of somatic embryos and plant regeneration. *New Forests* 10(2): 165–182.
- Lopez-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.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- 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.

-
- 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.
- Preeti Sharma, Subedar Pandey, Amita Bhattacharya, P.K. Nagar and Paramvir Singh Ahuja. (2004). ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Journal of Plant Physiology* 161:1269–1276.
- Rajasekaran K., Hein MB., Vasil IK. (1987) Endogenous abscisic acid and indole-3 acetic acid and somatic embryogenesis in cultured leaf of *Pennisetum Schum.* *Plant Physiol* 84:47-51.
- Roberts DR., Flinn BS., Webb DT., Sutton BCS. (1990). Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plant* 78: 355-360.
- Roberts DR. (1991). Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plant* 83: 247-254.
- Rock C.D. and Quatrano R.S., (1995). The role of hormones during seed development: "Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology" (Davies P.J. Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp: 671-697.
- 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.
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M., Zapata-Castillo P., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O., and Miranda-Ham M. 2005. Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis *Hortscience* 40(6): 829-1831.

- 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.
- 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.
- Tomaz M., Mendes B., Filho F., Demetrio C., Jansakul N. and Rodriguez A. (2001). Somatic Embryogenesis in *Citrus* ssp.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 446-452.
- Torres AC., Ze NM., Cantliffe DJ: (2001) Abscisic acid and osmotic induction of synchronous somatic embryo development of sweet potato. *In Vitro Cell Dev Biol* 37: 262-267.
- Von Arnold S, Hakman I. (1988). Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *J. Plant Physiol* 132:164-169.
- Walton DC. (1980). Biochemistry and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol.* 31: 453-489.
- Wurtele ES, Wang H., Durgerian S., Nikolau BJ., Ulrich TH. (1993). Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.* 102:303-312.
- Zdravkovic-Korac S, Neskovic M. (1999). Induction and development of somatic embryos from spinach (*Spinacia oleracea*) leaf segments. *Plant Cell Tiss Org Cult* 55:109-114.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA ASPARAGINA EN EL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO

4.1 INTRODUCCIÓN

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 (1902), y significa que las células vegetales tienen los mecanismos genéticos y fisiológicos necesarios para regenerar plantas completas. La morfogénesis permite la regeneración de plantas a partir de células, tejidos y cultivos de órganos, y es un proceso fundamental en la aplicación de la biotecnología vegetal para la propagación y la mejora genética. Sin embargo, la regeneración de plantas de Chile es muy limitada debido a la recalcitrancia de este género a la manipulación *in vitro* (Franck-Duchenne *et al.*, 1998; Ochoa-Alejo and Ramirez-Malagón, 2001; Steinitz *et al.*, 1999). La recalcitrancia es la incapacidad de las células vegetales, tejidos y órganos para responder a la manipulación en el cultivo de tejidos (Benson *et al.*, 2000) Puede ocurrir en cualquiera de las etapas durante el régimen de cultivo y poco se conoce acerca de los factores causales. El Chile es cultivo de gran importancia agronómica, pero carece de un sistema eficiente y reproducible de regeneración de plantas *in vitro*, a pesar de que otros miembros de las Solanáceas (papa, tomate, tabaco y petunia), se utilizan con frecuencia como sistemas modelo de regeneración *in vitro*. Numerosas investigaciones se han venido realizando sobre esta problemática a fin de lograr un sistema de regeneración adecuado para el género *Capsicum* (Morrison *et al.*, 1986; Fári, 1986; Ezura, 1997; Ochoa-Alejo and Ramírez-Malagón, 2001; Kothari *et al.*, 2010).

En Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), especie del género *Capsicum* también afectada por esta incapacidad ante el cultivo *in vitro*, se han realizado reportes que muestran importantes avances en este sentido. Se han establecido sistemas de regeneración vía organogénesis (Bello-Bello *et al.*, 2010) y embriogénesis somática, tanto directa como indirecta (López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007) en los que se ha logrado superar notablemente la eficiencia y la reproducibilidad de estos sistemas. Sin

embargo, persisten deficiencias que imposibilitan la conversión de los embriones somáticos en plantas, y de las cuales aún se desconoce su naturaleza. Se ha reportado que el etileno provoca un efecto negativo sobre los brotes de chile habanero durante su desarrollo (Santana-Buzzy *et al* (2005); Santana-Buzzy *et al.*, (2006). Otros estudios se están realizando a fin de encontrar una respuesta a las incógnitas que existen respecto a la recalcitrancia de esta especie y probablemente del género. Algunos de los estudios que se están abordando son: Las proteínas endógenas en los embriones somáticos; las poliaminas, tanto endógenas como adicionadas al medio de cultivo; los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) exógenos, particularmente el 2,4-D; algunos genes asociados con el desarrollo y particularmente, con la formación del meristemo apical.

El panorama de las proteínas endógenas en la embriogénesis somática de chile habanero tampoco ha sido muy alentador, al relacionarlo con la baja capacidad de germinación de los embriones somáticos de esta especie. En estudios previos realizados por Lecona-Guzmán y Santana-Buzzy (2008), donde se analizó el comportamiento de las proteínas endógenas a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de chile habanero, se evidenció que, contrario a lo reportado para embriones somáticos de otras especies, el contenido de proteínas de los embriones somáticos de chile habanero disminuye con el avance de su desarrollo.

La adición de aminoácidos, como Asparagina ha sido una de las estrategias que se han utilizado para incrementar el contenido de proteínas y mejorar el desarrollo de los embriones somáticos, en diferentes especies vegetales (Chia and Saunders, 1999; Witjaksono and Litz, 1999). La adición al medio de cultivo de estos compuestos ha aumentado la frecuencia de formación de embriones somáticos por explantes, así como del número de embriones germinados y convertidos en plantas.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la Asparagina sobre el contenido y composición de las proteínas en embriones somáticos de chile habanero.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

Para este estudio, se seleccionaron semillas del cultivar Uxmal-02 (Rux) proveniente del banco de germoplasma de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Esta variedad de fruto de color rojo fue seleccionada por ser una de las más conocidas y demandadas, tanto local como nacionalmente.

4.2.2 DESINFECCIÓN Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Las semillas se desinfectaron en una solución de etanol al 70% por 5 minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex: 6% de cloro activo) diluido al 30 % (v/v) durante 15 minutos, después de esto, las semillas se enjuagaron tres veces más con agua destilada estéril. Todo el procedimiento se realizó en agitación (Santana *et al.*, 2005).

Las semillas fueron germinadas *in vitro*, con el fin de establecer un stock de plantas asépticas para la toma de explantes. El medio utilizado para la germinación de semillas fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 1.156 μM de ácido giberélico (AG_3), 3% de sacarosa, 0.2% de gelrite, y un pH de 5.7, las semillas se incubaron en cuarto oscuro a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 días. Una vez germinadas, las plántulas fueron transferidas a un cuarto de fotoperíodo (16 horas luz/8 oscuridad) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 15 días.

4.2.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES)

4.2.3.1 INDUCCIÓN

Para la inducción de la embriogénesis, se tomaron hipocotilos de plántulas de 25 días en condiciones asépticas. El explante se colocó en medio MS, suplementado con 9.05 μM de Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), 3% de Sacarosa, 29.6 μM de tiamina-HCl, 42.3 μM de Cisteína-HCl, 555 μM de mio-inositol, 0.2% gelrite (López-Puc *et al.*, (2006). Se

colocaron cinco explantes por frasco, con cinco réplicas y se mantuvieron a 25 ± 2 °C, bajo condiciones de fotoperíodo (16 horas luz/8 oscuridad) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.2.3.2. HISTODIFERENCIACIÓN

Posterior a los 30 días de inducción, los explantes obtenidos fueron trasladados a medio líquido como fue reportado por Avilés (2008), el cual está constituido de la siguiente manera: sales MS, 2,4-D ($4.5\mu\text{M}$), sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), y el pH de 5.8. y fue suplementado con diferentes concentraciones de Asparagina (0, 0.38 mM, 7.6 mM, 15.2 mM). Los explantes se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C, con luz continua (24 hrs. luz) a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Por un periodo de 7 días con agitación (100rpm), una vez transcurrido este tiempo, los embriones somáticos fueron transferidos a medio MS nuevo libre de Asparagina con cambio de medio cada 14 días.

4.2.4 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

4.2.4.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS

El contenido de proteínas solubles se determinó de acuerdo con el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Con la ayuda de un espectrofotómetro Genesys 5 UV-VIS.

4.2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS

Para la realización de la electroforesis se utilizó como muestras embriones cigóticos y mezclas de embriones somáticos en diferentes momentos de su desarrollo. Las muestras se prepararon homogenizando en frío de forma individual embriones en cada uno de los estadios de desarrollo en $300 \mu\text{L}$ de solución amortiguadora de extracción 0.011M Tris-Glicina pH 7.5. Los extractos proteicos para su análisis se pasaron por una fase de desnaturalización por calentamiento en baño María a 100 °C. En todos los casos los extractos obtenidos se centrifugaron a 13000 rpm. durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf previamente rotulado y conservado a -80 °C hasta su uso.

Los estudios de la variación en la composición de proteínas totales se realizó mediante el método electroforético en sistema disociante (SDS-PAGE; Electroforesis en Geles de Poliacrilamida, empleando dodecil sulfato de sodio) siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Se emplearon geles de poliacrilamida al 15 y 5% de concentración para los geles de separación y compactación, respectivamente. Se empleó el equipo de electroforesis (SE 600 series electrophoresis unit I, Hoefer) de 14 x 16 cm con un espesor de 1.5 mm, y para su ensamblaje se siguieran las instrucciones del fabricante. En los electrodos se utilizó en todos los casos solución amortiguadora Tris-Glicina pH 8.3 (Iglesias, 1986). En el caso de las separaciones proteicas se empleara un kit de estándares de pesos moleculares (200,000-21,500 d). Los extractos proteicos fueron separados a 160 volts durante 8 horas a 4°C de temperatura, para este fin se empleó una fuente de poder marca Consort modelo E844.

Finalizado el tiempo de corrida, los geles se tñeron con 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 se retiró y los geles se enjuagaron con agua destilada dos veces por 20 s. posteriormente se llevó a cabo 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 oscureció se cambió por otra porción de solución reveladora fresca. Después de que se adquirió la intensidad de tinción deseada, el revelado se detuvo retirando la solución reveladora y se adicionó ácido acético al 12% y metanol al 50%. Los geles teñidos se almacenaron en ácido acético al 7% a 4°C. Todo este proceso se realizó en un equipo de agitación Shaker 25 a 30 rpm.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.3.1 EFECTO DE LA ASPARAGINA SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CHILE HABANERO

En la figura 4.1 se muestra la formación de embriones somáticos en los segmentos de hipocotilo a los 45 días de cultivo. Como se puede apreciar, en todos los tratamientos con Asn, los explantes respondieron a la inducción de la embriogénesis somática, observándose mucho más temprana aparición de los primeros embriones somáticos cuando en el medio estuvo presente dicho aminoácido (Asn), a diferencia del tratamiento

control. De manera general, el desarrollo de los embriones fue notablemente mejorado en todos los tratamientos con Asn y aunque todos los tratamientos difirieron del control, en los tratamientos con 4.09 μM de 2,4-D y 3.8 mM Asn se observó el mejor desarrollo de los embriones (Fig. 4.1 B).

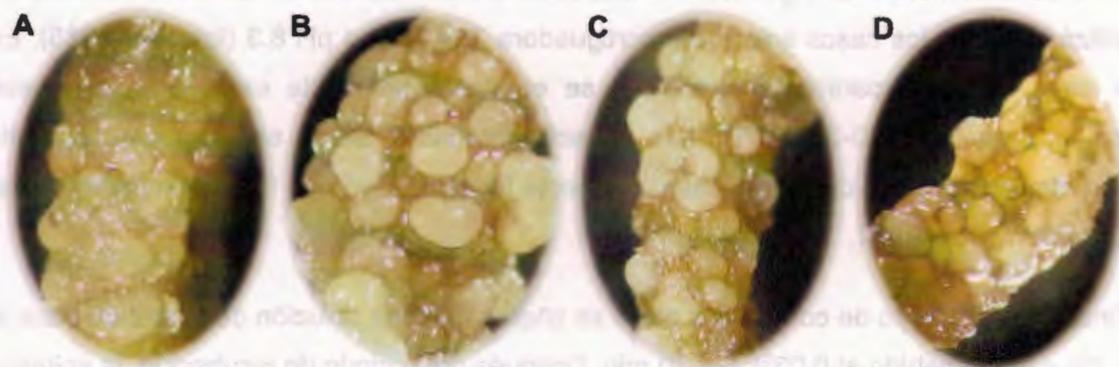


Figura 4.1 Embriones somáticos en estadio globular después de 45 días de cultivo en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de Asn: A) 4.09 μM de 2,4-D (control); B) 4.09 μM de 2,4-D + 3.8 mM Asn; C) 4.09 μM de 2,4-D + 7.6 mM Asn; D) 4.09 μM de 2,4-D + 15.2 mM Asn.

El efecto de la Asn en el medio de cultivo se evidenció a través de la eficiencia del proceso y la velocidad de desarrollo de los embriones somáticos, comparado con el tratamiento control. En la Figura 4.2 se puede apreciar que a los 65 días de cultivo se observaban embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo (globular, corazón y torpedo), observándose la mejor respuesta en el tratamiento con 3.8mM de Asn. Es bueno señalar que la coloración de los embriones también fue diferente cuando fueron tratados con Asn, evidenciando una mejoría en la calidad de éstos en presencia del aminoácido. Contrario a esto, se pudo observar que la exposición de los embriones a 15.2mM de Asn provocó un retraso o inhibición en el desarrollo de embriones somáticos, aunque la respuesta en este tratamiento también superó al tratamiento control, particularmente en la velocidad de desarrollo de los embriones. Sin embargo, a los 80 días de cultivo se observaron embriones somáticos en estadio cotiledonar (Fig.4.3) para todos los tratamientos con Asn.

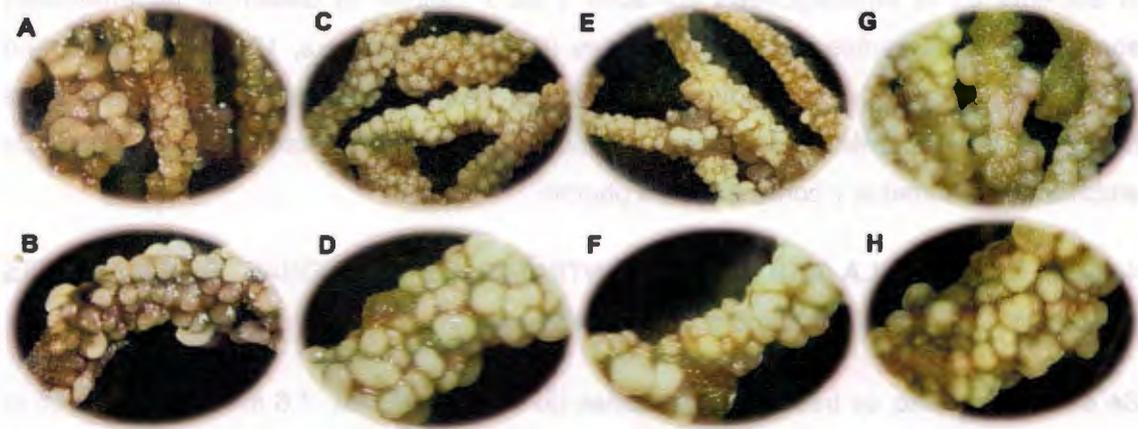


Figura 4.2 Embriones somáticos después de 65 días de cultivo A-B) Control; C-D) ESs tratados con 3.8 mM de Asn; E-F) ESs tratados con 7.6 mM de Asn; G-H) ESs tratados con 15.2 mM de Asn.



Figura 4.3 Estadios de desarrollo de embriones somáticos a 80 días de cultivo. Medio MS suplementado 4.05 μM de 2,4-D y diferentes concentraciones de Asn A-B) ESs tratados con 3.8 mM de Asn; C-D) ESs tratados con 7.6 mM de Asn; E-F) ESs tratados con 15.2 mM de Asn.

Algunos aminoácidos, como asparagina y glutamina han sido utilizados para incrementar la eficiente de la embriogénesis somática y para mejorar el desarrollo de embriones somáticos, en diferentes especies vegetales (Chia and Saunders, 1999; Witjaksono and Litz, 1999). La adición al medio de cultivo de estos compuestos ha aumentado la frecuencia de formación de embriones somáticos por explantes, así como del número de embriones germinados y convertidos en plantas.

4.3.2 EFECTO DE LA ASN EN EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

Se evaluó el efecto de tres concentraciones de Asn (0.38 mM, 7.6 mM, 15.2 mM) en el contenido de proteínas en embriones somáticos de *Capsicum chinense*. La adición de Asn en el medio de cultivo incrementó el contenido de proteínas en la mezcla de embriones somáticos tratados con este aminoácido respecto al control que registró un contenido de 2.92 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ PF, siendo el tratamiento con 7.6 mM de Asn el de mayor contenido (21.53 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ PF), seguido de los tratamientos con 3.8 y 17.2 mM de Asn los cuales registraron un contenido similar (19.42 y 19.94 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ PF, respectivamente) como se observa en la Fig. 4.4.

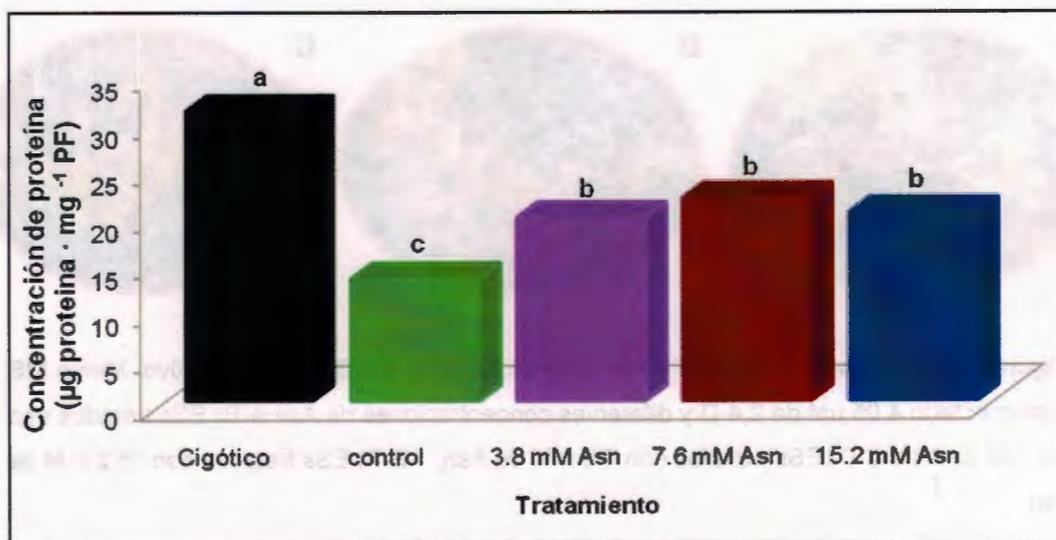


Figura 4.4 Efecto de la Asn en el contenido de proteínas en mezclas de ESs en diferentes estadios de desarrollo de *Capsicum chinense* Jacq. Cada valor es el promedio de 5 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes difieren según dócima de Tukey ($p \leq 0.05$).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Schmidt *et al.*, (2005) quienes encontraron que en embriones somáticos de soya el contenido de proteínas se incrementó (125 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ PF) cuando en el medio de cultivo fue adicionada Asn (7.5 mM).

En embriones somáticos de chile habanero se observó un incremento del contenido de proteínas, sin que difirieran significativamente los tratamientos entre sí, pero sí del tratamiento control, con un incremento 1.6 veces superior. Aunque comparado con el contenido de proteínas del embrión cigótico (30.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}$ PF), el contenido endógeno de proteínas de los embriones somáticos, sigue siendo bajos. Este incremento en el contenido de proteínas pudiera atribuirse a que los aminoácidos son responsables de funciones especiales en el metabolismo primario y secundario en plantas, y son además, precursores en la síntesis de proteínas ya las células los utilizan como fuente de nitrógeno (Coruzzi and Last 2000).

4.3.3 EFECTO DE LA ASN EN EL PERFIL DE PROTEÍNAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Capsicum chinense* Jacq.

Los resultados obtenidos del análisis de la composición de proteínas totales, mediante la técnica de SDS-PAGE en mezcla de ESs tratados con Asn y el tratamiento control a los 15 días de cultivo en medio líquido se muestran en la Fig. 4.5.

Se identificó el peso molecular de las bandas de acuerdo a la movilidad relativa que presentaron. En el análisis del gel se observó la presencia de péptidos en un rango de pesos moleculares de 6.4 a 132 KDa. Se analizaron mezclas de embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo de los diferentes tratamientos con Asn y tratamiento control así como del embrión cigótico. En el perfil electroforético del embrión cigótico se visualizaron un total de 43 bandas de las cuales 11 bandas con pesos moleculares de 74.9, 68.6, 60, 40, 20.9, 18.7, 11.4 y 9.8 KDa respectivamente (Fig. 4.5. Flechas rojas) no se encontraron en los tratamientos con Asn así como en el tratamiento control.

La adición de Asn al medio de cultivo ocasionó la expresión de siete péptidos que antes no se encontraban en los embriones somáticos y que se encuentran en el perfil del embrión cigótico (Fig. 4.5. Flechas Azules) aunque no se pueda asegurar que se traten de los mismos péptidos; los pesos moleculares de esos péptidos son de 64, 44.3, 39.2, 23.4,

20.6, 19.2, 14.6 KDa respectivamente. De igual forma se encontraron péptidos que únicamente se expresaron en los tratamiento con Asn (Fig. 4.5 asteriscos verdes) estas bandas fueron de pesos moleculares de 18.4 y 15.5 KDa.

Cuando los embriones fueron tratados con 0.38 mM de Asn se observó la expresión de dos péptidos con pesos moleculares de 21.2 y 13.5 KDa. En embriones somáticos tratados con 7.6 mM de Asn se visualizó un péptido con peso molecular de 27.4 KDa. Los embriones tratados con 15.2 mM de Asn expresaron dos péptidos con pesos moleculares de 25 y 21.2 KDa. (Fig. 4.5 asteriscos rosas).

Estos resultados son similares a lo reportado por Schmidt *et al.*, (2005) quienes en un análisis del perfil de proteínas mediante SDS-PAGE, reportaron que al comparar el perfil proteico de embriones somáticos de soya tratados con 7.5 mM de Asn con el de semilla de la misma especie, encontraron gran similitud entre ambos perfiles. Así mismo, este grupo reportó la presencia de péptidos con pesos moleculares de 12 y 20 kDa. los cuales se expresaron cuando los embriones somáticos fueron tratados con Asn (7.5 mM).

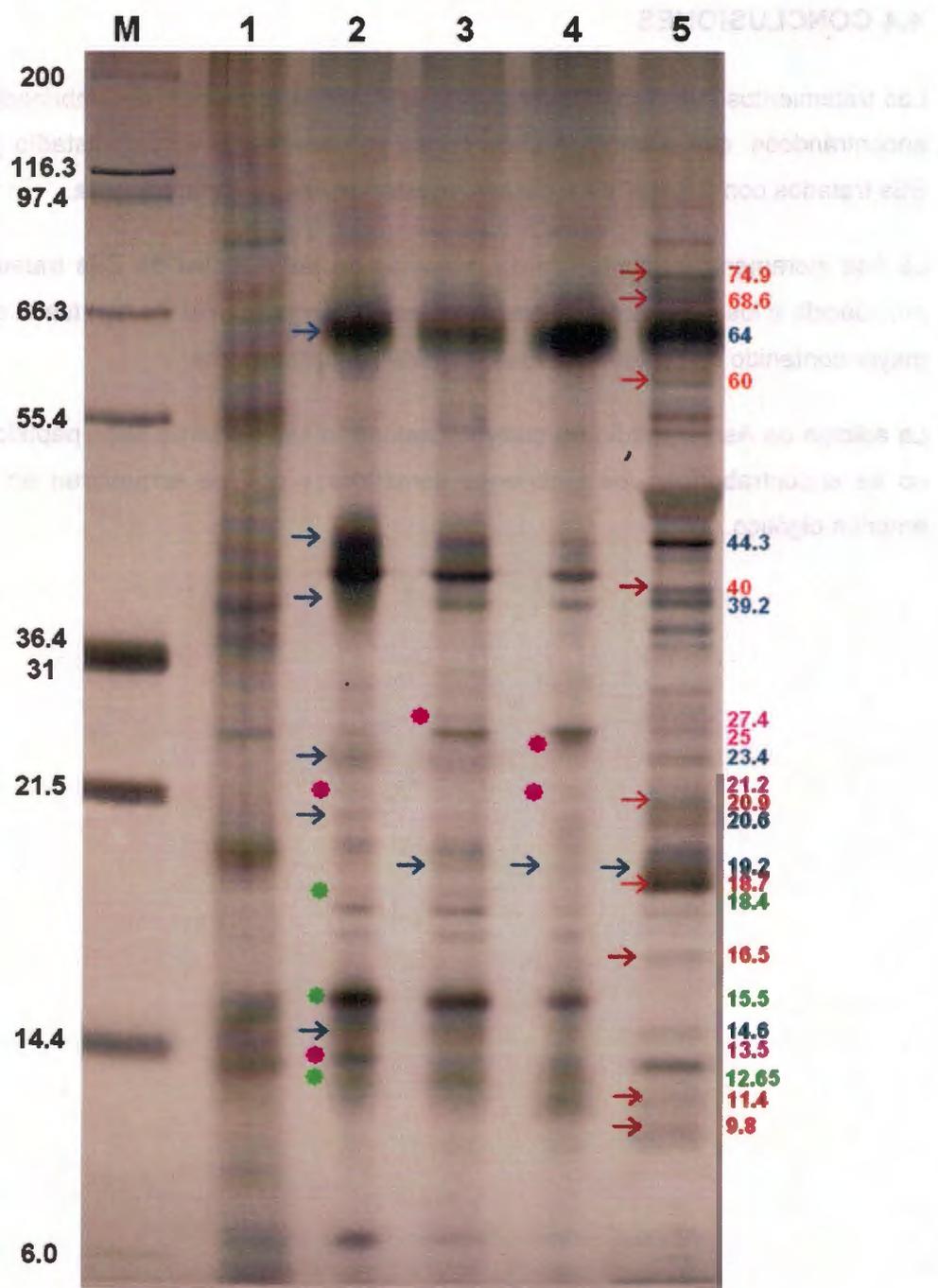


Figura 4.5 SDS-PAGE al 15% de embriones somáticos a los 15 días de cultivo en medio líquido. Carril 1, Mezcla de ESs tratados sin Asn; 2, Mezcla de ESs tratados con 3.8 mM Asn; 3, Mezcla de ESs tratados con 7.6 mM Asn; 4, Mezcla de ESs tratados con 15.2 mM Asn. M. Marcador de peso molecular.

4.4 CONCLUSIONES

Los tratamientos con Asn mostraron respuesta en la formación de embriones somáticos, encontrándose que a los 45 días de cultivo se encontraron ESs en estadio globular. Los ESs tratados con 3.8 mM y 7.6 de Asn mostraron una mejor morfología.

La Asn incrementó el contenido de proteínas en las mezclas de ESs tratados con este aminoácido a los 80 días de cultivo. El tratamiento con 7.6 mM de Asn fue el que presento mayor contenido de proteínas que el resto de los tratamientos.

La adición de Asn al medio de cultivo ocasiono la expresión de siete péptidos que antes no se encontraban en los embriones somáticos y que se encuentran en el perfil del embrión cigótico.

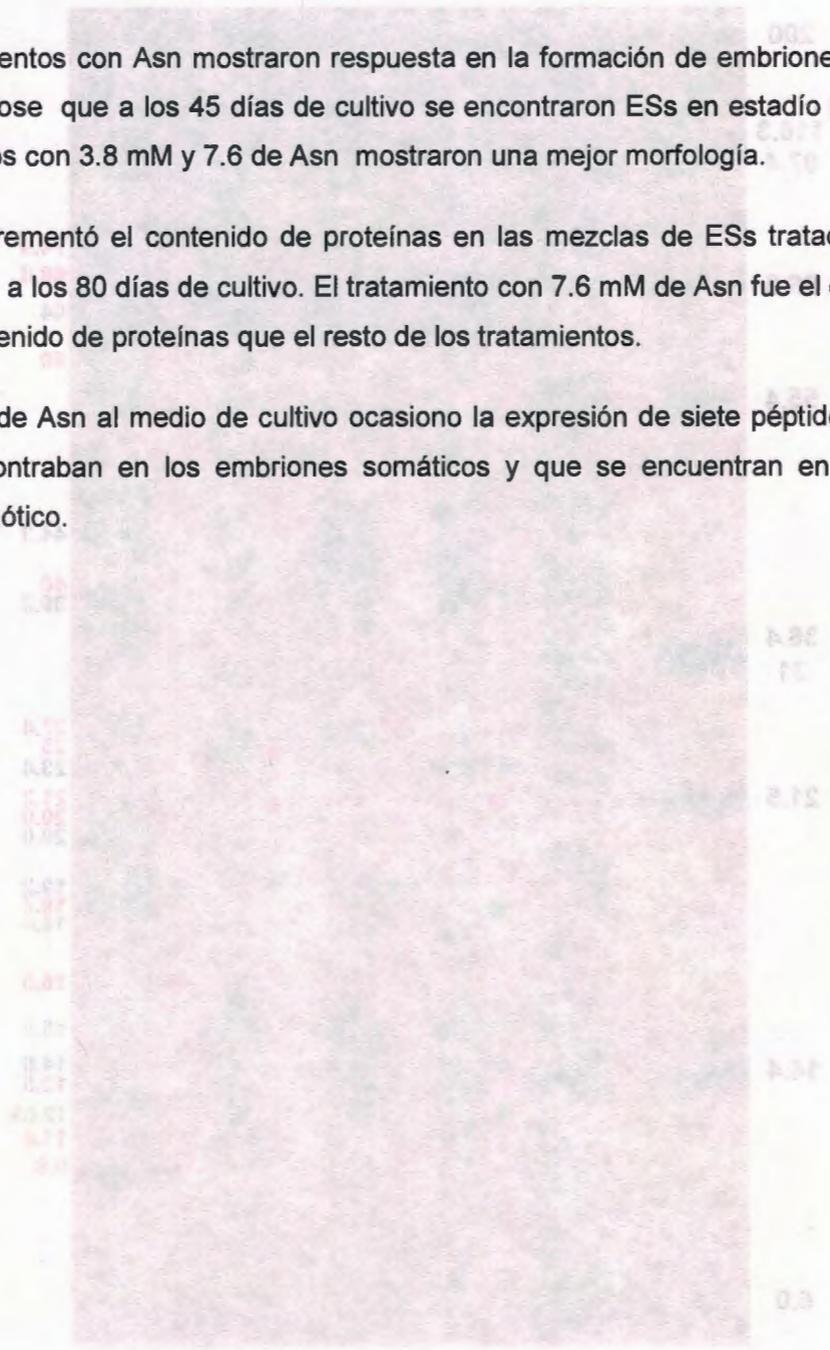


Figura 4.8 SDS-PAGE al 15% de embriones somáticos a los 45 días de cultivo en medio líquido. Control: Mezcla de ESs tratada sin Asn; B: Mezcla de ESs tratada con 3.8 mM Asn; C: Mezcla de ESs tratada con 7.6 mM Asn; D: Mezcla de ESs tratada con 15.2 mM Asn. M: Marcador de peso molecular.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Avilés-Viñas Susana A. (2008). Papel del etileno durante la embriogénesis somática de chile habanero *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría.
- Bello-Bello Jericó J., Canto-Flick Adriana, Balam-Uc Eduardo, Gómez-Uc Eunice, Robert Manuel L., Iglesias-Andreu Lourdes G. and Santana-Buzzy Nancy. (2010). Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. Hortscience 45(7):1093–1098.
- Benson, E.E. (2000). Special symposium: in vitro plant recalcitrance *in vitro* plant recalcitrance: an introduction. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 36:141–148.
- 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.
- Chia JT, Saunders JW. (1999). Evaluation of sole nitrogen sources for shoot and leaf disc culture of sugarbeet. Plant Cell Tissue Organ Cult. 59: 47-56.
- Coruzzi G. and Last R. (2000). Amino acids. In: Bicochemistry, Buchanan B.B., Gruissem W. and Jones R.L. (eds), Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 358–410.
- Iglesias, L. (1986). Estudio de la variabilidad morfoagronómica y bioquímica en soya (*Glicine max* (L.) Merrill) Tesis de grado de Doctor en Ciencias. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 233p.
- Laemmli Uk. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.
- Lecona G. Carlos A. (2008). Estudio de las proteínas en embriones cigóticos y embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 61 p.

- Lopez-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.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.
- Ochoa-Alejo, N. and Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. Sci. Hort. 42:21-28.
- 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., Miranda-Ham, M.L. (2005). Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. HortScience. 40(6): 1829-1831.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Iglesias Andreu, L.G., Montalvo Peniche, M.C., López Puc, G., Barahona-Pérez, F. (2006).Improvement of In Vitro Culturing of *Capsicum chinense* Jacq. by Inhibition of Ethylene Effects. HortScience . Vol. 41(2),: 405-409.
- Schmidt MA., Tucker DM., Cahoon EB., Parrott WA. (2005). Towards normalization of soybean somatic embryo maturation. Plant Cell Rep 24: 383–391.
- Witjaksono, Litz RE. (1999). Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. Plant Cell Tissue Organ Cult. 58: 141-148.
- Zapata-Castillo P., Canto-Flick A., Lopez-Puc G., Solís-Ruiz A. Barahona-Pérez F. and Santana-Buzzy N. (2007). Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) From Cell Suspensions. Hortscience, 42(2): 329–333.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL

En Chile habanero se ha logrado inducir el proceso de la embriogénesis somática a través de un protocolo que, a pesar de la elevada frecuencia de embriones formados, el desarrollo de estos se ve afectado por el elevado índice de embriones deformados, así como por la baja frecuencia de germinación y conversión en plántulas de los embriones formados (López-Puc *et al.*, 2006). En este trabajo se analizaron las proteínas totales de embriones cigóticos y somáticos de Chile habanero. El contenido de proteínas mostró una clara tendencia a disminuir a medida que el embrión somático avanza en su desarrollo. Los cambios bioquímicos y moleculares asociados a la embriogénesis somática han sido estudiados en diferentes especies como semilla de Canola (Crouch 1982), Zanahoria (Choi and Sung 1984, Dodeman and Ducreux 1996), Arroz (Chen and Luthe 1987), Gusantes (Stirn and Jacobsen 1987), Algodón (Shoemaker *et al.*, 1987), *Trifolium* (McGee *et al.*, 1989), *Dactylis glomerata* (Hahne *et al.*, 1988), Café (Yuffa *et al.*, 1994), *Camellia japonica* (Pedroso 1995), Soya (Stejskal and Griga 1995), Cebada (Stirn *et al.*, 1995), Caña de Azúcar (Blanco *et al.*, 1997) y *Betula pendula* Roth (Hvoslef-Eide and Corke 1997). Sin embargo no existe ningún reporte de los cambios bioquímicos que ocurren durante el proceso de embriogénesis somática en *Capsicum*, nuestros resultados revelaron contrario a lo que se ha reportado para otras especies una disminución en el contenido de proteínas en estadios de desarrollo avanzados de los embriones somáticos de *Capsicum chinense*. El perfil proteico reveló 9 bandas exclusivas para embrión cigótico con pesos moleculares de 4.0, 5.2, 8.1, 13.7, 20.9, 23.7, 41, 50 y 69.3 KDa, respectivamente, estas bandas no se expresaron en el perfil proteico de los embriones somáticos de esta especie. Coincidentemente, 5 de estas bandas poseen pesos moleculares similares a los reportados para proteínas de reserva en otras especies.

En el análisis 2DE, se observó la expresión de un grupo de proteínas en embriones cigóticos que no se expresan en embriones somáticos cotiledonares, en un rango de pI entre 3-5 y 7-10 las cuales pudieran ser del tipo de reserva (Winkelmann *et al.*, 2006) e incluso del tipo LEA, ya que se ha reportado que este tipo de proteínas son extremadamente hidrofílicas, tienen escasos residuos hidrofóbicos y básicos, y además

contienen abundantes aminoácidos cargados y polares, en particular glicina y lisina (Colorado *et al.*, 1995; Rock and Quatrano, 1995; Delseny *et al.*, 2001) además que en algunas especies como *G. max*, *A. thaliana*, *D. carota*, *Z. mays* y *O. sativa*, se ha reportado que estas proteínas tienen un rango de punto isoeléctrico de 5.51-6.74 y en algunos casos como en *V. radiata* estas proteínas tienen pI de 8.86 y en *P. patens* pI de 4.80 (Rajesh y Manickam, 2006).

Al evaluar el efecto del ABA en el contenido de proteínas se observó que este se incrementa en todos los estadios de desarrollo de los ESs en respuesta a los tratamientos con esta fitohormona, así también se encontraron cambios en el contenido de proteínas para todos los estadios de desarrollo analizados y para los tres tratamientos de ABA estudiados (3.78 μM , 18.9 μM y 37.8 μM). Este resultado probablemente se deba a que el ABA promueve la acumulación de proteínas de reserva (Cailloux *et al.*, 1996; Liao and Amerson, 1995; Wurtele *et al.*, 1993; Etienne *et al.*, 1993). Por otro lado, además de regular la síntesis y deposición de proteínas de reserva, el ABA regula la expresión de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Barceló *et al.*, 2001; Delseny *et al.*, 2001; Dodeman *et al.*, 1997; Colorado *et al.*, 1995; Rock and Quatrano, 1995).

La adición de Asn al medio de cultivo ocasiono un incremento en el contenido de proteínas y la expresión de siete péptidos que antes no se encontraban en los embriones somáticos y que se encuentran en el perfil del embrión cigótico; los pesos moleculares de esos péptidos son de 64, 44.3, 39.2, 23.4, 20.6, 19.2, 14.6 kDa respectivamente. Estos resultados son similares a lo reportado por Schmidt *et al.*, (2005) quienes en un análisis del perfil de proteínas mediante SDS-PAGE, reportaron que al comparar el perfil proteico de embriones somáticos de soya tratados con 7.5 mM de Asn con el de semilla de la misma especie, encontraron gran similitud entre ambos perfiles. Así mismo, este grupo reportó la presencia de péptidos con pesos moleculares de 12 y 20 kDa. los cuales se expresaron cuando los embriones somáticos fueron tratados con Asn (7.5 mM). Este incremento en el contenido y expresión de proteínas pudiera atribuirse a que los aminoácidos son responsables de funciones especiales en el metabolismo primario y secundario en plantas, y son además, precursores en la síntesis de proteínas ya las células los utilizan como fuente de nitrógeno (Coruzzi and Last 2000).

BIBLIOGRAFÍA

- Barceló J., Nicolás G., Sabater B. and Sánchez R. (2001). *Fisiología Vegetal*. Ed. Pirámide, Madrid, España
- Blanco M.A., Nieves N., Sanchez M., Borroto C.G., Castillo R., Gonzalez J.L., Escalona M., Baez E. and Hernandez Z. (1997). Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 51: 153–158.
- Cailloux F, Julien-Guerrier J, Linissier L and Coudret A. (1996). Long-term somatic embryogenesis and maturation of somatic embryos in *Hevea brasiliensis*. *Plant Sci. Limerick*.120(2): 185–196.
- Chen L.J. and Luthe D.S. (1987). Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.*, 48: 181–188.
- Choi J.H. and Sung Z.R. (1984). Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryonic proteins. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 2: 19–25.
- Crouch M.L. (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta*. 156: 520–524.
- Colorado P., Nicolás C., Nicolás G. and Rodríguez D. (1995). Convergent effects of stress and ABA on gene-expression during germination of chick-pea seeds. *J. Plant Physiol.* 146: 535-540.
- Coruzzi G. and Last R. (2000). Amino acids. In: *Biochemistry*, Buchanan B.B., Gruissem W. and Jones R.L. (eds), *Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp. 358–410.
- Delseny M., Bies-Etheve N., Carles C., Hull G., Vicient C., Raynal M., Grellet F. and Aspart L. (2001). Late embryogenesis abundant (*LEA*) protein gene regulation during *Arabidopsis* seed maturation. *J. Plant Physiol.* 158: 419-427.

- Dodeman V.L. and Ducreux G. (1996). Total protein pattern expression during induction and development of carrot somatic embryos. *Plant Sci.*, 120: 57–69.
- Etienne H, Sotta B, Montoro P, Miginiac E and Carron MP. (1993). Relation between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) *Plant Sci.* 88: 91–96.
- Hahne G., Mayer J.E. and Lorz H. (1988). Embryogenic and callus specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Sci.*, 55: 267–279.
- Hvoslef-Eide A.K. and Corke F.M.K. (1997). Embryogenesis specific protein changes in birch suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 51: 35–41.
- Lopez-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.
- McGee J.D., Williams E.G., Collins G.B. and Hildebrand D.F. (1989). Somatic embryogenesis in *Trifolium*: Protein profiles associated with high- and low-frequency regeneration. *J. Plant Physiol.*, 135: 306–312.
- Pedroso M.C., Hilbert J.L., Vasseur J. and Pais M.S. (1995). Polypeptides associated with the induction of direct somatic embryogenesis in *Camellia japonica* leaves 1. Identification of embryo-specific polypeptides. *J. Exp. Bot.*, 46:1579–1584.
- Rajesh S and A. Manickam. 2006. Prediction of functions for two LEA proteins from mung bean. *Biomedical Informatics Publishing Group, Singapore Bioinformatics.*, 1(4): 133-138.
- Rock C.D. and Quatrano R.S., (1995). The role of hormones during seed development: "Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology" (Davies PJ. Ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp: 671-697.

- Shoemaker RC, Christofferson SE and Galbraith DW. (1987). Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.*, 6:12–15.
- Stejskal J. and Griga M. (1995). Comparative analysis of some isozymes and proteins in somatic and zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Plant Physiol.*, 146: 497–502.
- Stirn S. and Jacobsen H.J. (1987). Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.*, 6: 50–54.
- Stirn S., Mordhorst A.P., Fuchs S. and Lorz H. (1995). Molecular and biochemical markers for embryogenic potential and regeneration capacity of barley (*Hordeum vulgare* L.) cell cultures. *Plant Sci.*, 106: 195–206.
- Winkelmann T., Heintz D., Van Dorsselaer A., Serek M. and Braun H.P. 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology. *Planta*, 224: 508–519.
- Wurtele ES, Wang H., Durgerian S., Nikolau BJ., Ulrich TH. (1993). Characterization of a gene that is expressed early in somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.* 102:303-312.
- Yuffa A.M., de Garcia E.G. and Nieto M.S. (1994). Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. *Plant Cell Rep.*, 13: 197–202.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIÓN GENERAL

El comportamiento en el contenido y el perfil de proteínas de los embriones somáticos de *C. chinense* a lo largo de las sucesivas etapas de su desarrollo, es diferente a lo que se ha reportado en otras especies. El bajo contenido en proteínas durante el desarrollo de los embriones somáticos, especialmente en la etapa cotiledonar, es un factor que podría estar relacionado con el comportamiento *in vitro* de *C. chinense* durante la germinación y conversión en planta. Los resultados muestran notables diferencias entre los perfiles de proteínas del embrión cigótico y somáticos de *C. chinense*, observada a través de los análisis de SDS-PAGE y 2DE.

Todos los tratamientos con ABA mostraron respuesta en la formación de embriones somáticos, encontrándose una mayor sincronía del proceso. Los ESs tratados con 37.8 μM de ABA mostraron una mejor calidad en todos los estadios de desarrollos evaluados. El ABA incrementó el contenido de proteínas en los diferentes estadios de desarrollo de los ESs, siendo el estadio corazón el que presento mayor contenido de proteínas en todos los casos, así mismo se duplicó el contenido de proteínas en los estadios torpedo y cotiledonar.

Al analizar el perfil proteico de los ESs tratados con ABA se observó un incremento en la expresión de las proteínas para todos los tratamientos en comparación con el tratamiento control. La expresión de proteínas se incrementaba conforme la dosis de ABA aumentaba. Se expresaron cuatro bandas con pesos moleculares de 19, 49.9, 58.2 y 84.3 KDa que solo estuvieron presentes en los tratamientos con ABA. Únicamente los tratamientos con 18.9 y 37.8 μM de ABA presentaron la expresión de una proteína con peso molecular de 42.9 KDa, Además que una banda de 17.7 KDa se expresó únicamente en el tratamiento con 37.8 μM de ABA.

Los tratamientos con Asn mostraron respuesta en la formación de embriones somáticos, encontrándose a los 45 días de cultivo ESs en estadio globular. Los ESs tratados con 3.8 mM y 7.6 de Asn mostraron una mejor morfología. La Asn incrementó el contenido de proteínas en los ESs tratados con este aminoácido a los 80 días de cultivo. El tratamiento

con 7.6 mM de Asn fue el que presento mayor contenido de proteínas que el resto de los tratamientos. La adición de Asn al medio de cultivo ocasiono la expresión de siete péptidos que antes no se encontraban en los embriones somáticos y que se encuentran en el perfil del embrión cigótico.

Estos resultados permiten inferir que, las proteínas que están presentes en el perfil proteico del embrión cigótico, y ausentes en el perfil proteico del embrión somático particularmente en el estadio cotiledonar, pudieran tener alguna relación con la maduración del embrión y en consecuencia, con la incapacidad de estos embriones somáticos para germinar y convertirse en plantas.