



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LAS POLIAMINAS DURANTE EL
PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE
CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tesis que presenta
CARLOS FERNANDO REGLA MÁRQUEZ

En opción al título de
MAESTRO EN CIENCIAS
(Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México, Febrero 2011





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Estudio de las poliaminas durante el proceso de embriogénesis 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 Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

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 dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México, Febrero 2011



Carlos Fernando Regla Márquez

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Ileana Echevarría Machado, Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dr. José Luís Casas Martínez por sus comentarios y críticas para el enriquecimiento de este trabajo.

A los miembros de mi comité evaluador: Dra. María C. Montalvo Peniche y Dr. Manuel Martínez Estévez.

A mis compañeros del laboratorio: Emily Elizabeth Marín Collí, Susana Avilés Viñas, Daniela Solís Marroquín, Stephanie López Erosa, Carlos Alberto Lecona Guzmán, Raúl Enrique Valle Gough y Dr. Jericó Jabín Bello Bello por su amistad y en especial a la Dra. Eunice Gómez Uc por su ayuda en los detalles finales a mi documento.

A Dios por su amor, protección y por darme una familia que siempre esta a mi lado.

A mis padres Higinio Regla Vázquez y María Teresa Márquez Amezcua, a mis hermanos, Higinio y María Teresa así como a mi cuñado Eduardo Páez que siempre me han brindado su amor, apoyo y ejemplo

A la familia Ramírez Castañeda que me cobijaron en su casa por este largo tiempo, Marcos, María Luisa, Sofía y Frida.

ÍNDICE	Pag.
LISTADO DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
Resumen	1
Abstract	3
CAPITULO I	5
1.1 INTRODUCCIÓN	5
1.2 ANTECEDENTES	6
1.2.1 <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	6
1.2.2 Morfogénesis <i>in vitro</i>	7
1.2.2.1 Embriogénesis Somática	8
1.2.3 Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Capsicum spp.</i>	9
1.2.4 Poliaminas	11
1.2.4.1 Biosíntesis de las poliaminas	12
1.2.4.2 Inhibidores de biosíntesis	14
1.2.4.3 Catabolismo	15
1.2.4.4 Localización en la célula	15
1.2.4.5 Efectos de las poliaminas	15
1.2.4.6 Poliaminas en la embriogénesis somática	16
1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
1.3.1 Hipótesis	19
1.3.2 Objetivo general	19
1.3.3 Objetivos específicos	19
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	20
1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN DE LAS POLIAMINAS (PAS) ENDÓGENAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS Y EN EMBRIONES CIGÓTICOS DE CHILE HABANERO: CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN	27
2.1 INTRODUCCIÓN	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.2.1 Condiciones generales	28

2.2.2 Obtención de material vegetal	28
2.2.3 Inducción de embriogénesis somática	29
2.2.4 Cuantificación de poliaminas en embriones somáticos y cigóticos	29
2.2.5 Extracción y cuantificación de poliaminas	29
2.2.6 Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	30
2.3 RESULTADOS	31
2.3.1 Inducción de la embriogénesis somática de chile habanero	31
2.4 DISCUSIÓN	35
2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPITULO III. COMPORTAMIENTO DE LAS PAS ENDÓGENAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO CULTIVADOS EN RECIPIENTES CON VENTILACIÓN Y SIN VENTILACIÓN	41
3.1 INTRODUCCIÓN	41
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.2.1 Condiciones generales	41
3.2.2 Obtención de material vegetal	42
3.2.3 Inducción de embriogénesis somática	42
3.2.4 Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	42
3.2.5 Caracterización del contenido de poliaminas y etileno en los recipientes de cultivo	42
3.2.6 Cuantificación de etileno	43
3.3 RESULTADOS	45
3.3.1 Contenido de etileno	45
3.3.2 Contenido de poliaminas totales en embriones somáticos cultivados en recipientes sin ventilación y con ventilación:	46
3.4 DISCUSIÓN	51
3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPITULO IV	57
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	57
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	58
4.3 PERSPECTIVAS	58
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTADO DE ABREVIATURAS

Cad	Cadaverina
CV	Con ventilación
EC	Embrión cigótico
ES	Embrión somático
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
PA	Poliamina
Put	Putrescina
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
SV	Sin ventilación

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1.1 Biosíntesis de las PAs comunes (Sinska y Jankiewicz, 2003)	13
Figura 1.2 Biosíntesis de las poliaminas en plantas y su posible regulación por etileno. (1) Activación; SAM precursor compartido que puede inhibir la síntesis de PAs; Cad-cadaverina; LDC-lisina descarboxilasa; ODC-ornitina descarboxilasa; ADC- arginina descarboxilasa; Put- putrescina; Spd- espermidina; Spm-espermina (Kuznetsov <i>et al.</i> , 2002)	14
Figura 1.3 Diagrama de flujo de la estrategia experimental a seguir para la cuantificación de PAs y etileno en embriones cigóticos (EC; testigo), explante inicial (hipocotilo) y embriones somáticos en el protocolo de Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007) en recipientes sin ventilación (SV) y con ventilación (CV).	20
Figura 2.1 Estándares de PAs con sus diferentes tiempos de retención. Estándares a 0.5 mM, Fluorescencia Ex=340, Em=510	31
Figura 2.2 a) Hipocotilo de <i>C. chinense</i> con embriones somáticos. Estadios de la embriogénesis somática en <i>C. chinense</i> G: globular C: corazón T: torpedo Cot: cotiledonar.	32
Figura 2.3 Poliaminas unidas encontradas en embriones somáticos de <i>C. chinense</i> , Fluorescencia Ex=340, Em=510.	32
Figura 2.4 Contenido de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) en embriones somáticos (ES) y en embriones cigóticos (EC) de chile habanero.	33
Figura 2.5 Contenido de: PUT) putrescina, CAD) cadaverina, SPD) espermidina y SPM) espermina, libres, unidas y conjugadas, respectivamente, en embriones somáticos (ES) y en embriones cigóticos (EC) de chile habanero.	34
Figura 3.1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental a seguir para la cuantificación de PAs y etileno en embriones, hipocotilos y embriones somáticos en el protocolo de Avilés-Viñas (2007) en recipientes con ventilación (CV) y sin ventilar (SV).	43

Figura 3.2 Concentración de etileno ($nL \cdot L^{-1}$) durante la inducción de 45
embriogénesis somática en diferentes etapas del cultivo a los 0, 15 y 30 días en
medio semisólido (0, S15 y S30); 14, 28 y 42 días en medio líquido (L14, L28 y
L42); medición después de las resiembras (R1, R2 y R3). En recipientes de
cultivo sin ventilación (SV) y con ventilación (CV).

Figura 3.3 Contenido de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y 46
espermina (Spm), en recipientes sin ventilación (SV) y recipientes con
ventilación (CV) en embriones somáticos (ES) de chile habanero, a los 28 y a los
42 días de cultivo en medio líquido.

Figura 3.4 Contenido de putrescina (Put) libres, unidas y conjugadas, en 47
embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación
(SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en
medio líquido.

Figura 3.5 Contenido de cadaverina (Cad) libres, unidas y conjugadas, en 48
embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación
(SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en
medio líquido.

Figura 3.6 Contenido de espermidina (Spd) libres, unidas y conjugadas, en 49
embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación
(SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en
medio líquido.

Figura 3.7 Contenido de espermina (Spm) libres, unidas y conjugadas, en 50
embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación
(SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en
medio líquido.

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1.1 Regeneración de plantas <i>in vitro</i> de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. RCV: regulador de crecimiento vegetal.	11
Cuadro 1.2 Proporción de Put/Spd en explantes que dieron mejor respuesta	18

RESUMEN

Se realizaron estudios descriptivos y comparativos sobre el contenido de poliaminas (PAs) endógenas en embriones de chile habanero. En una primera etapa del trabajo se determinaron y compararon las PAs presentes en embriones somáticos (ES) y embriones cigóticos (EC) de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Posteriormente, se estudió el comportamiento de las PAs endógenas en ES de esta especie, cultivados en recipientes sin ventilación (SV) y con ventilación (CV), con monitoreo del contenido de etileno en dichos recipientes durante el proceso. Como resultado del análisis, tanto en ES como en EC fueron detectadas las PAs comunes, putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm), así como una PA poco común en plantas: la cadaverina (Cad). En ES fue cuantificada mayor cantidad de PAs que en los EC. En EC solo fueron detectadas putrescina (Put) y Cad, mientras que en los ES se encontraron las tres PAs comunes, además de Cadaverina. La Cadaverina presente en plantas, ha sido asociada a la respuesta a condiciones de estrés, por lo que se estudió el comportamiento de las PAs en presencia de etileno (recipientes sin ventilación). Como resultado, en los recipientes sin ventilación donde fue detectado este gas regulador, a los 28 días de cultivo en medio líquido no se alcanzó a detectar espermina (Spm), mientras que la PA más abundante fue Cad, tanto en recipiente CV como en recipiente SV, aunque fue más abundante en los embriones cultivados en recipientes SV. A los 42 días de cultivo, se detectaron todas las PAs, siendo Put la más abundante. La mayor cantidad de PAs fue cuantificada en los recipientes CV, siendo Spd y Spm casi el doble que en recipientes SV. En conclusión podemos mencionar que las PAs en chile habanero, al parecer, están muy asociadas con el desarrollo de los ES así como con las condiciones bajo las cuales son mantenidos durante este proceso (CV y SV), mientras que la Cad puede ser una PA característica de la especie ya que está presente tanto en EC como en ES, y que la presencia del etileno provoca un incremento en su contenido particularmente en los estadios tempranos del desarrollo (a los 28 días). Estos resultados son los primeros reportados sobre las PAs presentes en esta especie.

ABSTRACT

Descriptive and comparative studies about endogenous polyamines (PAs) content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) were done. In the first phase of the work, the presence of PAs in the somatic embryos (SE) and zygotic embryos (ZE) were determined and compared. After that, it was studied the endogenous behavior of the PAs in SE cultivated with (VV) and without ventilation (UV), and the ethylene was monitored in the vessels during the culture time. The common PAs, putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm), were present in both classes of embryos as well as the less common PA in plants: Cadaverine (Cad). A higher PAs content was measured in SE than in ZE. Putrescine (Put) and Cad were present in ZE, and the three common PAs plus Cadaverine were present in SE. In plants, the presence of Cadaverine has been associated to the stress response, so the PAs behavior was studied in presence of ethylene (i.e. non ventilated vessels). No ventilated vessels, where the ethylene was present, not Spermine (Spm) was detected in the liquid culture medium at the day 28, but Cad was the polyamine present in higher quantities in both VV and UV, being higher in embryos cultivated in UV vessels. At day 42 of culture, all PAs were detected, but Put was higher. The highest concentration of PAs was in VV vessels, but Spd and Spm doubled in concentration in UV vessels. One conclusion is that PAs in habanero pepper seems to be associated to the SE development along the process of in vitro culture in VV and UV vessels, Cad could be a PA characteristic of the specie as it was present in both SE and ZE, and the ethylene presence promotes the increment of Cad particularly in the early stages of the development (28 days). These are the first results reported on PAs present in this specie.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum*, de la familia Solanaceae, consta de 25 especies. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área comprendida entre Bolivia y Perú (Pickersgill, 1989).

Al menos, cinco de sus especies de *Capsicum* son las más cultivadas en diferentes regiones: *C. chinense* Jacq., *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. annuum* (Pozo *et al.*, 1991).

Aunque el chile habanero (*C. chinense*) es originario de Sudamérica, en México es muy conocido, y es mayormente cultivado en las regiones de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco, aunque se ha ido extendiendo a otras regiones del país. Es una planta autógama (80 a 90%) y su fruto se caracteriza por su alto grado de pungencia, pudiendo llegar a ser muy elevada en algunos tipos de chile habanero, por lo que son muy apreciados en muchas regiones del mundo. El nivel de pungencia se lo confiere el contenido de capsaicina (Pozo *et al.*, 1991).

Capsicum annuum es la primera especie del género en la que se obtuvo respuesta en la inducción de diferentes procesos morfogénicos *in vitro* (Agrawal y Chandra 1983; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996; Husain *et al.*, 1999). En estos trabajos la reproducibilidad y eficacia de los procesos siguen siendo bajas (Binzel *et al.*, 1996). La mayoría de los reportes sobre esta especie son de organogénesis y se han reportado pocos trabajos de embriogénesis somática (Harini y Lakshmi-Sita, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996, Khan *et al.*, 2006).

Pocos trabajos se han reportado sobre la morfogénesis de *C. chinense*. Santana-Buzzy *et al.* (2005) publicaron el primer trabajo de regeneración vía organogénesis, obteniendo pocos brotes por explante y encontrando que la especie es muy sensible a los efectos del etileno. Posteriormente, Santana-Buzzy *et al.* (2006) lograron mejorar la calidad de las plantas por medio de la inhibición de los efectos del etileno. También, se han realizado trabajos buscando mejorar la calidad de los ES y reducir la frecuencia de embriones deformados. En este sentido, se ha venido trabajando para determinar el papel de diferentes factores, particularmente las PAs. Las PAs son aminas alifáticas que se encuentran en todas las plantas, y están involucradas en procesos de

crecimiento y desarrollo vegetal. Sin embargo, aún se conoce muy poco sobre el metabolismo de las PAs en la embriogénesis somática.

El objetivo de este estudio es caracterizar las variaciones en el contenido y la composición de las PAs en ES de *C. chinense*, comparado con las del EC de la especie.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 *Capsicum chinense* Jacq.

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

encuentra en la placenta de las semillas. A continuación se presenta la clasificación taxonómica del chile habanero:

Reino	Plantae	
Division	Angiosperma	
Clase	Dicotiledónea	
Orden	Tubiflorales	
Familia	Solanaceae	
Género	<i>Capsicum</i>	
Especie	<i>Capsicum chinense</i> Jacquin	(Tun-Dzul, 2001)

La especie *Capsicum chinense* Jacq. es originaria de América, se cultiva en Belice, en algunas islas del Caribe y se produce principalmente en la Península de Yucatán (Trujillo, 2005). *C. chinense* es de gran importancia para la agricultura del estado de Yucatán, ya que genera un gran número de salarios y valor agregado en su producción primaria. La producción de *C. chinense* de Yucatán se comercializa en el mercado local, regional (Campeche y Quintana Roo), nacional (D.F., Guadalajara y Monterrey) e internacional, en América (Estados Unidos y Canadá), Europa (España e Inglaterra) y en Asia (Japón) (Pérez, 2006). En el periodo 2001-2007 la producción en el estado de Yucatán fue de 2,642.59 toneladas, representando el 65.74% de la producción nacional (SIAP, 2008).

1.2.2 Morfogénesis *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales es la ciencia de cultivar células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre en un medio artificial (George, 2008). Una de las mayores ventajas del cultivo de tejidos es la posibilidad de regenerar plantas completas a partir de pequeños fragmentos de tejidos. Esto se aplica en campos como la propagación masiva de plantas de alto valor y un paso obligado para técnicas más sofisticadas. Existen tres vías para la regeneración de plantas *in vitro*: brotación y proliferación de yemas, organogénesis y embriogénesis somática. La primera vía consiste en la formación de plantas individuales o brotes múltiples a partir de yemas axilares y apicales, las cuales contienen los meristemos ya formados (estructuras multicelulares), mientras que la organogénesis y embriogénesis somática pueden ser inducidos de cualquier parte de la planta, preferiblemente a partir de tejidos meristemáticos. Ambos procesos pueden ocurrir directa e indirectamente, este último lleva implícito la formación de un callo que se forma a través de un proceso de dediferenciación y su posterior rediferenciación de los tejidos. Los órganos o los

embriones pueden originarse de una o de varias células (Zapata-Castillo *et al.*, 2007). La morfogénesis *in vitro* depende de diferentes factores, como son: genotipo, tipo de explante, edad y etapa de desarrollo del explante, estado fisiológico de la planta donadora del explante y el ambiente externo el cual incluye la composición del medio y las condiciones físicas del cultivo (luz, temperatura). La interacción entre todos estos factores llevan a la inducción y expresión de un modo específico de diferenciación celular y desarrollo (Gaj, 2004).

1.2.2.1 Embriogénesis somática

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

Los embriones somáticos (ES) se asemejan morfológicamente a los EC, son bipolares y tienen órganos embriogénicos típicos: radícula, hipocotilo y cotiledones (Von Arnold, 2002). Los ES, como los EC, tienen la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual, por lo que la planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial (Pérez, *et al.*, 1999). Los ES se pueden desarrollar indirectamente, a través de un tejido calloso o directamente del tejido del explante. Los ES desarrollados vía directa son formados de células del explante competentes las cuales, contrario a la indirecta, son capaces de experimentar embriogénesis sin desdiferenciación, es decir sin la formación de callo. Se le llama embriogénesis somática secundaria a la formación de embriones adventicios a lo largo de suspensor del propio ES, o embriones madres, y esta multiplicación a partir de los embriones formados es la responsables de la alta eficiencia de este sistema de regeneración *in vitro*. Se le conoce además como embriogénesis proliferativa. Solo unas pocas células somáticas son sensibles a los factores de inducción de la embriogénesis y capaces de sufrir embriogénesis somática y reciben el nombre de células competentes, células embriogénicas determinadas o células proembriogénicas (Gaj, 2004). Las condiciones para la inducción de la embriogénesis somática en diferentes especies y cultivares son usualmente descubiertas por prueba y error por medio del análisis de los efectos de diferentes condiciones de cultivo como son: balance de reguladores del crecimiento, condiciones osmóticas, cambio de pH, concentración de aminoácidos y sales, golpe de calor y tratamiento con varias sustancias químicas. Los principales inductores de la

embriogénesis somática son las auxinas. También existen reportes de embriogénesis en respuesta a la presencia de otros reguladores de crecimiento como son las citocininas e incluso en la ausencia de reguladores (Namasivayam, 2007).

La embriogénesis somática consta de las siguientes etapas:

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

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

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

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

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

1.2.3 Regeneración *in vitro* de *Capsicum spp.*

Aunque muchos miembros de la familia Solanaceae fácilmente desarrollan morfogénesis (Kumar *et al.*, 2005), por ejemplo *Nicotiana tabacum*, se han hecho muchos esfuerzos para la regeneración de plantas a partir de diferentes explantes para el género *Capsicum* pero muchas de estas investigaciones no reportan

resultados satisfactorios (Ahmad *et al.*, 2006) y muchos de los protocolos son específicos para un cultivar y tejido (Venkataiah *et al.*, 2003).

La primera especie en la que se obtuvo respuesta durante la inducción de diferentes procesos morfogénicos *in vitro* utilizando diferentes cultivares fue *Capsicum annum* (Agrawal y Chandra 1983; Arroyo y Revilla, 1991; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996; Husain *et al.*, 1999) aunque la reproducibilidad y eficiencia de los procesos siguen siendo bajas (Binzel *et al.*, 1996). La mayoría de los reportes sobre esta especie son de organogénesis y se ha reportado pocos trabajos de embriogénesis somática (Harini y Sita, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Khan *et al.*, 2006).

Otra especie que en la que se han obtenido reportes es *Capsicum chinense* (Cuadro 1.1), obteniendo mayores tasas de regeneración y mayor reproducibilidad de los procesos de morfogénesis *in vitro*, aunque sigue presentando deficiencias relacionadas al género como lo son el alto índice de embriones deformados y el bajo índice de conversión (López-Puc *et al.*, 2006; Aviles-Viñas, 2007). Santana-Buzzy *et al.* (2005) reportaron la regeneración de plantas vía organogénesis. Santana-Buzzy *et al.* (2006) detectó una gran sensibilidad de esta especie al etileno presente en los recipientes de cultivo y propusieron un protocolo en el que se logra reducir sus efectos. López-Puc *et al.* (2006) encontraron que *C. chinense* es capaz de formar ES, contrario a lo encontrado en otras especies del género, obteniéndolos de diferentes explantes, siendo los hipocotilos los que dieron mejores resultados. Sin embargo, muchos de los embriones en las etapas de torpedo y cotiledonar mostraron malformaciones y la germinación y conversión a planta no fue satisfactoria. Zapata-Castillo *et al.* (2007) establecieron un protocolo para la embriogénesis somática de *C. chinense* en suspensión celular que fue más eficiente pero tuvo los mismos problemas. Sanatombi y Sharma (2008) reportaron para *C. chinense* cultivar Umorok, nativo de la India, un protocolo de micropropagación por inducción de brotes múltiples en meristemo apical y su posterior multiplicación induciendo brotes de las yemas axilares de las plantas regeneradas por medio de la decapitación.

Cuadro 1.1 Regeneración de plantas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq. RCV: regulador de crecimiento vegetal.

RCV	EXPLANTE	RESPUESTA	REFERENCIA
TDZ	Nudos	Organogénesis	Santana-Buzzy <i>et al.</i> , 2005
TDZ	Nudos	Organogénesis Desarrollo	Santana-Buzzy <i>et al.</i> , 2006
2,4-D	Hipocotilos	Embriogénesis somática directa	López-Puc <i>et al.</i> , 2006
2,4-D, TDZ	Hipocotilos	Embriogénesis somática indirecta	Zapata-Castillo <i>et al.</i> , 2007
Z, BAP, Kin	Yemas axilares	Organogénesis	Sanatombi y Sharma, 2008

Se han realizado trabajos para ver cuáles son los factores que afectan la formación y germinación de ES de *C. chinense*. Aviles-Viñas (2007) caracterizó el papel del etileno en la embriogénesis somática de *C. chinense*, encontrando que contrario a su efecto en la formación de brotes y desarrollo en plantas, favoreció notablemente la inducción de la embriogénesis somática, mientras que en recipientes con ventilación los ES mostraron un rápido deterioro sin avance en su desarrollo. Con este trabajo ella logró desarrollar un protocolo eficiente en medio líquido, con una alta frecuencia de formación de embriones, con un alto grado de sincronía y una baja frecuencia de embriones deformados, pero continuó el problema de germinación de embriones. Lecona-Guzmán (2008) estudió las proteínas en EC y ES de chile habanero y encontró diferencias significativas en el contenido de proteínas en los diferentes estadios de desarrollo de los ES, observándose que el embrión en estadio globular presentó el mayor contenido y en el estadio cotiledonar presentó el contenido más bajo. Al analizar las proteínas se encontró evidencias de la expresión de algunas proteínas en EC las cuales no se expresan en el ES cotiledonar.

1.2.4 Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son aminos alifáticas de bajo peso molecular las cuales tienen naturaleza policatiónica a pH fisiológico, están presentes en todos los organismos vivos y están involucradas en múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo. Aunque

se han realizado numerosos estudios para caracterizar su función, el papel exacto de las PAs *in vivo* está aún por determinar. Las más comunes son:

Putrescina	diamina	Put	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Espermidina	triamina	Spd	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Espermina	tetraamina	Spm	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

En las plantas superiores se ha encontrado que son necesarias el crecimiento (Moshkov *et al.*, 2008).

Bajo la denominación de poco comunes se agrupan diversas PAs cuya distribución en la naturaleza está bastante más limitada que las PAs comunes: 1,3 diaminopropano, cadaverina (Cad), nor espermidina, homo espermidina, caldopentamina y caldohexamina. La Cad se ha encontrado principalmente en las fabáceas (Gamarnik y Frydman, 1991). La función de estos compuestos es escasamente conocida, aunque se les ha atribuido papeles de protección tanto en bacterias como en plantas adaptadas a ambientes extremos.

Las PAs se pueden encontrar de forma libre (solubles) o conjugada; en la forma conjugada las podemos encontrar conjugadas a moléculas pequeñas como lo es el ácido ferúlico e hidroxicinámico (PAs solubles en ácido) o unidas a moléculas grandes como lo son los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (PAs no solubles en ácido). Puede ocurrir interconversión entre las PAs libres y conjugadas, se piensa que esto mantienen los niveles apropiados de PAs libres durante los procesos de desarrollo (Li y Burritt, 2003).

Las PAs han sido tomadas en cuenta como una nueva clase de reguladores de crecimiento vegetal, mensajero secundario hormonal y como una de las reservas de carbono y nitrógeno por lo menos en tejidos cultivados (Kakkar *et al.*, 2000).

1.2.4.1 Biosíntesis de las poliaminas

Las PAs son sintetizadas de amino ácidos a través de descarboxilaciones. Los amino ácidos básicos arginina y ornitina proveen la mayor parte del esqueleto de carbono mientras que la metionina contribuye con los grupos aminopropil para que Put forme Spd y Spd forme Spm (figura 1.1). La Put puede ser formada de ornitina por la ornitina descarboxilasa (ODC) o indirectamente a través de una serie de intermediarios (Kakkar *et al.*, 2000).

Las vías, las cuales son operativas pueden variar de una especie a otra, y de acuerdo a si la morfogénesis, o el crecimiento, se está llevando a cabo. Se piensa que la ODC está principalmente activa durante la división celular y la arginina descarboxilasa (ADC) durante el alargamiento celular. Interesantemente, *Arabidopsis thaliana* carece de ODC (Moshkov *et al.*, 2008).

La biosíntesis de la Spd se lleva a cabo por la acción de la enzima Spm sintasa y en ella se realiza la transferencia del grupo aminopropil terminal de la molécula de S-adenosilmetionina descarboxilada a la molécula de Put. De manera análoga sucede para la biosíntesis de la Spm con la acción de la Spm sintasa la cual transfiere el grupo aminopropil del S-adenosilmetionina descarboxilada a la Spd.

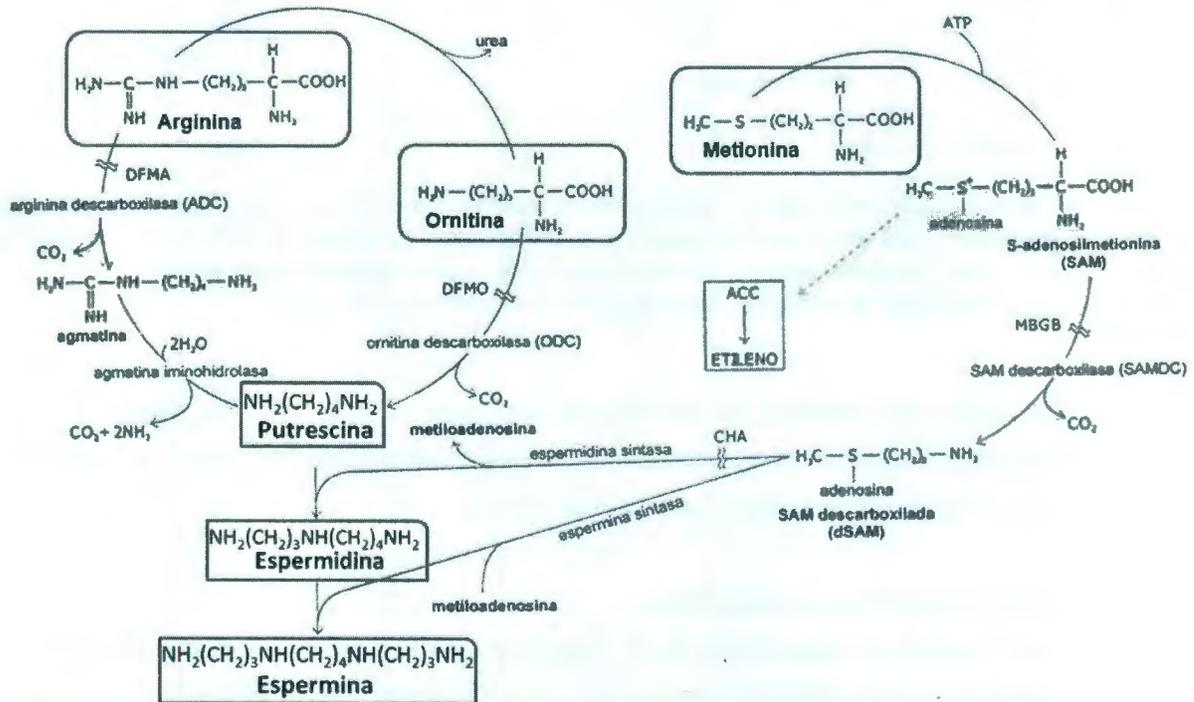


Figura 1.1 Biosíntesis de las PA's comunes (Sinska y Jankiewicz, 2003).

La Cad se origina de la descarboxilación de la lisina a través de la acción de la lisina descarboxilasa.

Es importante resaltar que las PA's se relacionan en cuanto a su biosíntesis con el etileno por medio de S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 1.2). El uso común de SAM hace sospechar que la metabolización de dicho compuesto puede representar un punto clave en la regulación de ambas rutas metabólicas. Con lo que se refiere a la

Cad y el etileno Shevyakova *et al.* (2004) demostraron que el etileno estimula la fosforilación de la LDC y con esto el aumento de Cad.

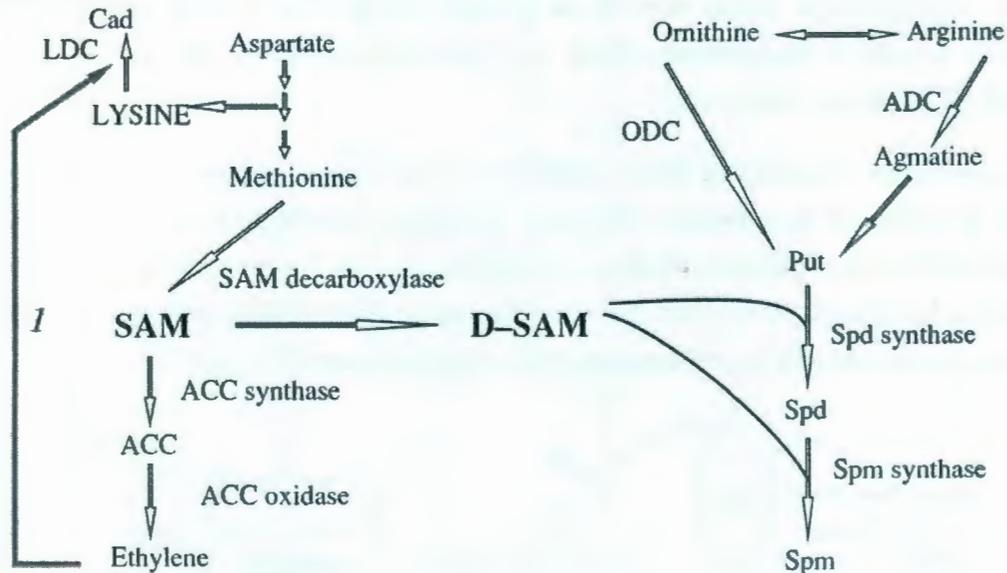


Figura 1.2 Biosíntesis de las poliaminas en plantas y su posible regulación por etileno. (1) Activación; SAM precursor compartido que puede inhibir la síntesis de PAs; Cad- cadaverina; LDC- lisina descarboxilasa; ODC- ornitina descarboxilasa; ADC- arginina descarboxilasa; Put- putrescina; Spd- espermidina; Spm- espermina (Kuznetsov *et al.*, 2002).

Los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de PAs han sido aislados de una variedad de especies de plantas. En la planta modelo *Arabidopsis* todos los genes de las vías están identificados (Kusano *et al.*, 2007).

1.2.4.2 Inhibidores de biosíntesis

Los primeros estudios sobre el rol de las PAs en varios procesos de crecimiento y desarrollo fueron altamente correlativos, puesto que los títulos de las PAs *in vitro* no pueden ser fácilmente manipulados. Se han desarrollado inhibidores irreversibles de las enzimas del metabolismo de las PAs permitiendo examinar la biosíntesis de las PAs y respuestas particulares de crecimiento o desarrollo. Por ejemplo α -difluorometilarginina (DFMA) y α -difluorometilornitina (DFMO) (Figura 1.1), inhibidores irreversibles de ADC y ODC respectivamente, se ha demostrado que inhiben específicamente estas descarboxilaciones en varias plantas. Esta habilidad de llevar a cabo la inhibición selectiva de ADC y ODC con estos inhibidores nos ha proveído de valiosos conocimientos con respecto al control metabólico de la síntesis de Put durante el desarrollo de la planta, o en respuesta a estrés o inducción hormonal de la

actividad de descarboxilación. La incorporación de Put a PAs puede ser bloqueada por metilglioxal-*bis*-guanilhidrazona (MGBG), un inhibidor de SAM descarboxilasa, mientras que la Spd sintasa es inhibida por dicitohexilamonio sulfato (DCHA) (Bais y Ravishankar, 2002).

1.2.4.3 Catabolismo

Las PAs producidas en las plantas pueden ser descompuestas por las oxidasas adecuadas. La Put es oxidada por la diamina oxidasa hasta el amino aldehído, el cual por la ciclización produce pirrolina. Con una reacción análoga la Spm bajo la influencia de la poliamina oxidasa se transforma en diaminopropano y pirrolina, y la Spm en diaminopropano y 1,3-aminopropil pirrolina (Sinska y Jankiewicz, 2003).

1.2.4.4 Localización en la célula

Las PAs son fácilmente absorbidas por las raíces y transportadas con la corriente de la transpiración de los vasos. En menor escala también son transportadas en el floema. El transporte de las PAs dentro de la célula es un proceso activo estimulado fuertemente por la auxina. Las PAs libres están localizadas en la célula en los cloroplastos, mitocondrias, pared celular y vacuolas. Las enzimas que participan en la biosíntesis de PAs, ADC y ODC ocurren principalmente en el núcleo, mitocondrias y cloroplastos, mientras que la SAM descarboxilasa es una enzima citoplasmática (Sinska y Jankiewicz, 2003).

1.4.4.5 Efectos de las poliaminas

A pH fisiológico Put, Spd y Spm están protonadas y poseen dos, tres y cuatro cargas positivas respectivamente. La distribución de las cargas en las moléculas de Spm hace que se una fuertemente a los grupos fosfato en cada banda del ADN de doble hélice, abarcando el surco mayor y menor y estabilizando la hélice por la unión de sus dos bandas. Las PAs también estabilizan otras estructuras de doble hélice como los tallos y loops en ARNr y ARNm, y estabilizan la conformación del ARNt a través de unirse a sitios específicos. Estas interacciones pueden ser las bases de sus efectos sobre el ADN, ARN y síntesis de proteínas (Tiburcio *et al.*, 1993), por lo tanto PAs pueden regular la replicación de ADN, transcripción, traducción, división celular diferenciación y otros procesos morfogénicos. Estas uniones también pueden evitar la degradación por enzimas y desnaturalización termal e inducida por rayos X (Kakkar *et al.*, 2000). Además las PAs se ligan a la cabeza de los fosfolípidos cargados negativamente u

otros sitios aniónicos de la membrana, alterando la estabilidad y permeabilidad de la membrana, modulando indirectamente la actividad de las enzimas asociadas a membrana (Tiburcio *et al.*, 1993). Las PAs libres pueden compensar los cationes potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) lo que puede promover la actividad de muchas enzimas las cuales dependen de la presencia de los cationes. Parte de su función podría ser actuar como amortiguador para minimizar fluctuaciones en el pH celular, creando las condiciones óptimas para la actividad de las enzimas, se ha reportado que activan algunas enzimas estimulando su fosforilación. Algunos efectos de la acción de las PAs sobre las enzimas pueden resultar de sus propiedades como captadores de radicales libres especialmente del tipo superóxidos los cuales degradan las membranas citoplasmáticas. (Moshkov *et al.*, 2008; Sinska y Jankiewicz, 2003). Muchos tipos de condiciones de estrés producen cambios metabólicos característicos durante los cuales Put se acumula en grandes concentraciones en los tejidos de plantas, mientras que las otras PAs se mantienen esencialmente sin cambio.

Con lo que se refiere a la interacción de las PAs con otros reguladores de crecimiento, se puede decir que de forma general las principales hormonas de desarrollo, como giberelinas, auxinas y citocininas que promueven el crecimiento, estimulan también la producción de PAs. La interacción de las PAs con etileno demuestra que frecuentemente ocurre la acción antagonista entre estos compuestos. Se ha sugerido que el efecto de las PAs en este fenómeno puede basarse en la inhibición de la producción del etileno por la competencia por el precursor común, S-adenosilmetionina (SAM). (Bais y Ravishankar, 2002; Moshkov *et al.*, 2008), por lo que podemos decir que el papel de las PAs se divide en estructura de las células y bio reguladores de procesos metabólicos, no es raro que en cada estimulación de crecimiento resulte en un aumento de la síntesis de PAs.

1.4.4.6 Poliaminas en la embriogénesis somática

Las PAs están involucradas en varios procesos de crecimiento y desarrollo vegetal incluyendo la embriogénesis somática (ES), mientras que los mecanismos de acción de las PAs sobre estos procesos de desarrollo todavía son desconocidos (Shoeb *et al.*, 2001). Montague *et al.*, (1979) fueron los primeros en demostrar que había un aumento significativo en la actividad de ADC y en los reserva de Put cuando los cultivos fueron pasados del medio para inducción de callo a el medio de ES. Feirer *et al.* (1984) encontraron que la inhibición de ADC por medio de DFMA bloquea la

transición de crecimiento desorganizado a ES y la adición de Put con DFMA restauró el potencial embriogénico. Sin embargo, DFMA no bloqueó el crecimiento de las células de zanahoria en medio de callo. Por lo que los requerimientos de Put parecen ser únicos para la transición a crecimiento embriogénico. Li y Burrit (2003) examinaron los niveles de PAs en explantes de *Dactylis glomerata* con alta y baja capacidad de producción de ES, los de alta capacidad tenían cuatro veces más cantidad de PAs que los de baja, además los de alta capacidad tenían una proporción de Put/Spd más baja que aquellos de baja capacidad embriogénica. Silveira *et al.*, 2004 investigaron los niveles de PAs en cultivos embriogénicos en suspensión de *Pinus taeda* la cual se ha considerado recalcitrante a la ES en escala comercial, relacionaron los niveles altos de Put con un bajo crecimiento celular. Steiner *et al.* (2007) detectaron un incremento en los niveles endógenos de las PAs totales (libres y conjugadas) en cultivos embriogénicos de *Araucaria angustifolia* a los que se les colocó Put y Spd, la PA endógena más abundante fue Put seguido por la Spd y Spm. Cuando añadieron Put a concentraciones altas (1mM) promovió el incremento de Put, mientras que concentraciones menores disminuyeron los niveles de Spd y Spm. Las PAs añadidas al medio al medio aumentaron el crecimiento de los cultivos embriogénicos, las que más lo estimularon fue Put y Spd, pero no se observó una relación directa entre la concentración y la respuesta. Paul *et al.* (2009) al añadir PAs al medio embriogénico de *Momordica charantia* resultó en un incremento en el peso del tejido fresco y el número de ES. Entre las PAs añadidas se encontró que Put a una concentración de 1 mM fue la más efectiva, seguida de Spm y Spd que fueron más efectivas a 0.1 μ M.

La influencia de PAs exógenas y sus inhibidores biosintéticos sobre las principales PAs durante la morfogénesis *in vitro* fue demostrada y demostrando que las PAs exógenas o sus inhibidores fueron útiles aumentando la regeneración de plantas vía embriogénesis somática (Shoeb *et al.*, 2001). También se ha observado que no es la presencia de altos niveles de PAs, sino de niveles adecuados de PAs y proporción de Put/Spd, los importantes para la embriogénesis somática (Cuadro 1.2) (Sharma *et al.*, 1995). Para la mayoría de las especies estudiadas solo están disponibles datos preliminares sobre el metabolismo de las PAs en relación a la embriogénesis somática y no emergen patrones comunes de estos reportes (Minocha y Minocha, 1995).

Cuadro 1.2 Proporción de Put/Spd en explantes que dieron mejor respuesta

Especie	Explante	Put/Spd	Referencia
<i>Dactylis glomerata</i>	Base de la hoja	Alta	Li y Burritt, 2003
<i>Solanum melongena</i>	Discos de hoja	Alta	Yadav y Rajam, 1998
<i>Daucus carota</i>	Líneas celulares	Alta	Bastola y Minocha, 1995
<i>Oryza sativa</i>	Base de la hoja	Baja	Shoeb <i>et al.</i> , 2001
<i>Medicago sativa</i>	Callo	Baja	Huang <i>et al.</i> , 2001

1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.3.1 Hipótesis

Si las PAs son compuestos involucrados en el crecimiento y desarrollo en las plantas, entonces su contenido y composición durante la embriogénesis somática de chile habanero puede variar en dependencia del momento y de las condiciones de cultivo.

1.3.2 Objetivo general

Caracterizar las variaciones en el contenido y la composición de las PAs en el proceso de embriogénesis somática de *Capsicum chinense*.

1.3.3 Objetivos específicos

Determinar el contenido y composición de las PAs (Put, Spd, Spm) en ES y EC de *Capsicum chinense*.

Determinar el contenido de etileno durante el proceso de embriogénesis somática de *Capsicum chinense* en recipientes ventilados y sin ventilar.

Determinar el contenido y composición de las PAs (Put, Spd, Spm) durante el proceso de embriogénesis somática de *Capsicum chinense* en recipientes ventilados y sin ventilar.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Estrategia experimental a seguir para la cuantificación de PAs en ES y EC de *C. chinense* y la cuantificación de PAs y etileno en ES en dos condiciones de cultivo:

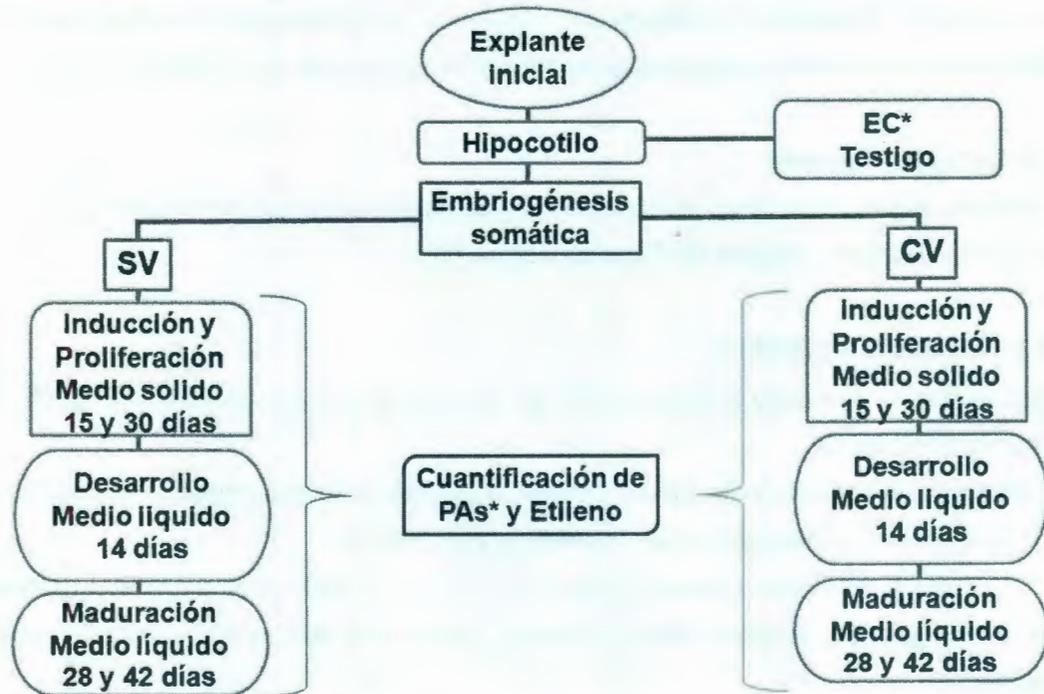


Figura 1.3 Diagrama de flujo de la estrategia experimental a seguir para la cuantificación de PAs y etileno en embriones cigóticos (EC; testigo), explante inicial (hipocotilo) y embriones somáticos en el protocolo de Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007) en recipientes sin ventilación (SV) y con ventilación (CV).

1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal S. y N. Chandra (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Curr. Sci.*, 52, 645-46.
- Ahmad N., I. Siddique y M. Anis (2006). Improved plant regeneration in *Capsicum annuum* L. from nodal segments. *Biologia Plantarum*, 50, 701-704.
- Arroyo R. y M.A. Revilla (1991). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep.*, 10, 414-416.
- Aviles-Viñas S.A. y N. Santana-Buzzy (2007). Papel del etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 65 p
- Bais H.P. y G.A. Ravishankar (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell and Organ Culture*, 69, 1-34.
- Bastola D.R., S. C. Minocha (1995). Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*, 109, 63-71.
- Binzel M.L., N. Sankhla, S. Joshi y D. Sankhla (1996). *In vitro* regeneration in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) from "half- seed explants". *Plant Growth Regul.* 20, 287-293.
- Buyukalaca S. y F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, 227-235.
- Feirer R., G. Mignon y J. Litvay (1984). Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science*, 223,1433-1435.
- Gaj M.D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43, 27-47.

- Gamarnik A. y R. Frydman (1991). Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiology*, 97, 778-785.
- George E. (2008). Plant tissue culture procedure – background. En: *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition*, George E., Hall M y De Klerk G (eds). Springer. pp. 1-28.
- Harini I. y G. Lakshmi-Sita (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89, 107–112.
- Huang X.L., X.J. Li, Y. Li y L.Z. Huang (2001). The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.*, 113, 424-429.
- Husain S, A. Jain y S.L. Kothari (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L.. *Plant Cell Rep.*, 19, 64-68.
- Jacobs J.L. y C.T. Stephens (1990). Factor affecting the regeneration of pepper (*Capsicum annuum* L.). *HortScience*, 25, 120.
- Jiménez V.M. (2005). Involment of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47, 91-110.
- Kakkar P.K., P.K. Nagar, P.S. Ahuja y V.K. Rai (2000). Polyamines and plant morphogenesis. *Biologia Plantarum*, 43(1),1-11.
- Khan H., I. Siddique, M. Anis (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annum*. *Biologia Plantarum*, 50(4), 789-792.
- Kumar V., H.B. Gururaj, B.C. Narasimha, P. Giridhar y G. Ravishankar (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of *Capsicum annum* L. *Scientia Horticulturae*, 106, 237-246.

- Kusano T., K. Yamaguchi, T. Berberich y Y. Takahashi (2007). Advances en polyamine research in 2007. *J. Plant. Res.*, 120, 345-350.
- Kuznetsov V., V. Rakitin, N. Sadomon, D. Dam, L. Stetsenko y N. Shevyakova (2002). Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants?. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(1), 120-130.
- Lecona C.A. y N. Santana-Buzzy (2008). Estudio de las proteínas en embriones cigóticos y embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 61p.
- Li Z. y D.J. Burritt (2003). Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regulation*, 40, 65-74.
- López-Puc G., A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, P. Zapata-Castillo, M.C. Montalvo-Peniche, F. Barahona-Pérez y N. Santana-Buzzy (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645-1650.
- Minocha S.C. y R. Minocha (1995). Role of polyamines in somatic embryogenesis. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds*, Vol. 30, Bajaj, T.P.S. (ed), Springer Verlag, Berlin, Germany pp. 55-72.
- Montague M.J., T.A. Armstrong y E.G. Jaworski (1979). Polyamines metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. II. Changes in arginina descarboxylase activity. *Plant Physiol.*, 63, 341-345.
- Moshkov I.E., G.V. Novikova, M.A. Hall y E.F. George (2008). Plant growth regulators III: gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds. En: *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition*, George E., Hall M. y De Klerk G. (eds). Springer. pp. 227-281.
- Namasivayam P. (2007). Acquisition of embriogenic competence during somatic

embryogenesis. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.*, 90, 1-8.

Ochoa-Alejo N. y L. Ireta-Moreno (1990). Cultivar differences in shoot forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Sci. Hort.*, 42, 21-28.

Paul A. y K. Mitter y S. Raychaudhuri (2009). Effect of polyamines on *in vitro* somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L.. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 97, 303-311.

Pérez E., R. Ramírez, H.G. Núñez y N. Ochoa (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.

Pérez L. y R. Zapata (2006). El mercado del chile habanero. pp. 386-390 en Ávila G., G. Orozco y O. Pozo (comp.) 2006. Tercera Convención Mundial de Chile, Memorias. México.

Pickersgill B., (1989). Genetic resources of *Capsicum* for tropical regions. En: *Tomato and Pepper Production in the Tropics Asian Vegetable Research and Development Center*, Green S.K. (ed). Taipei pp. 1-9.

Pozo O, S. Montes, E. Redondo (1991). Chile (*Capsicum* spp.) pp. 217-238. En: *Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México*. Ortega R, Palomino G, Castillo F, González VA, Livera M (eds.) Sociedad Mexicana de Filogenética, A.C. Chapingo, México.

Sanatombi K. y G.J. Sharma (2008). *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq.. *Biologia Plantarum*, 52(3), 517-520.

Santana-Buzzy N, A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M.C. Montalvo-Peniche, P.Y. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldívar-Collí, O. Gutiérrez-Alonso y M.L. Miranda-Ham (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum annuum* Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40(6), 1829-1831.

Santana-Buzzy N., A. Canto-Flick, L.G. Iglesias-Andreu, M.C. Montalvo-Peniche, G. López-Puc y F. Barahona-Pérez (2006). Improvement of *in vitro* culturing of

- habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience*, 41(2), 405-409.
- Sharma P. y M.V. Rajam (1995). Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different hypocotyl segments of eggplant. *J. Plant Physiol.*, 146, 658-664.
- Shevyakova N., M. Shorina, V. Rakitin, L. Stetsenko y V. Kuznetsov (2004). Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Doklady Biological Sciences*, 395, 127-129.
- Shoeb F., J.S. Yadav, S. Bajaj y M.V. Rajam (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of *Indica* rice. *Plant Sci.*, 160, 1229-1235.
- SIAP (2008). Cierre de producción agrícola por estado, Producción anual. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: www.siap.sagarpa.gob.mx. 07/12/2008.
- Silveira V., E. Iochest, W. Handro y M.P. Guerra (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76, 50-60.
- Sinska I. y L.S Jankiewicz (2003). Las poliaminas y aminos aromáticas. En: *Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas, Volumen 1 Propiedades y acción*. Jankiewicz L.S. (ed). Universidad Autónoma Chapingo. pp. 295-315.
- Steiner N., C. Santa-Catarina, V. Silveira, E.I.S.Floh y M.P. Guerra (2007). Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.*, 89, 55-62.
- Szasz A., G. Nervo y M. Fari (1995). Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes and efficient

- plant regeneration using thidiazuron. *Plant Physiol.*, 82, 369-374.
- Tiburcio A.F., J.L. Campos, X. Figueras y R.T. Bestford (1993). Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Regul*, 12, 331-340.
- Trujillo J. (2005). Descripción varietal del chile habanero. pp. 13-20 en Torres H. y Franco C. (comp.) 2005. Seminario de Chile Habanero, Memoria. Fundación Produce Yucatán A.C. INIFAP. México Von Arnold, 2008.
- Tun-Dzul J. (2001). Chile Habanero y Tecnología de producción, SAGARPA-INIFAB.:5-16p.
- Venkataiah P., T. Christopher y K. Subhash (2003). Thidiazuron induced high frequency adventitious shoot formation and plant regeneration in *Capsicum annum* L.. *Journal of Plant Biotechnology*, 5(4), 245-250.
- Von Arnold S., I. Sabala, P. Bezhkov y L. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.
- Yadav J.S. y M.V. Rajam (1998). Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.*, 116, 617-625.
- Zapata-Castillo P.Y., A. Canto-Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz, F. Barahona-Pérez y N. Santana-Buzzy (2007). Somatic embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspension. *HortScience*, 42(2), 329-333.

CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN DE LAS POLIAMINAS ENDÓGENAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS Y EN EMBRIONES CIGÓTICOS DE CHILE HABANERO.

2.1 INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* es considerado recalcitrante a la morfogénesis *in vitro*. La primera especie del género *Capsicum* en la que se reportó la morfogénesis *in vitro* fue *Capsicum annuum* (Agrawal y Chandra, 1983; Arroyo y Revilla, 1991; Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno, 1990; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996; Husain *et al.*, 1999) aunque la reproducibilidad y la eficiencia de los procesos siguen siendo bajas (Binzel *et al.*, 1996). La mayoría de los reportes son referidos a la organogénesis, mientras que pocos trabajos han sido realizados sobre la embriogénesis somática (Harini y Sita, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Khan *et al.*, 2006). Otra especie en la que se han obtenido resultados relacionados con la regeneración *in vitro*, es *Capsicum chinense* (Santana-Buzzy *et al.*, 2005; Santana-Buzzy *et al.*, 2006; López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007; Sanatombi y Sharma, 2008), obteniéndose en esta especie mayores tasas de regeneración y mayor reproducibilidad de los procesos de morfogénesis *in vitro*, aunque sigue presentando deficiencias, relacionadas con la recalcitrancia del género: alto índice de embriones deformados y bajo índice de conversión (López-Puc *et al.*, 2006; Aviles-Viñas, 2007). Se están realizando estudios que permitan identificar los factores que provocan este comportamiento, no sólo de la especie *C. chinense*, sino del género (Aviles-Viñas, 2007; Lecona-Guzmán, 2008).

Las poliaminas (PAs) son aminas alifáticas que se encuentran en todas las plantas. Están involucradas en varios procesos de crecimiento y desarrollo vegetal incluyendo la embriogénesis somática (ES), mientras que los mecanismos de acción de las PAs sobre estos procesos de desarrollo todavía son desconocidos (Shoeb *et al.*, 2001). La influencia de PAs exógenas y sus inhibidores biosintéticos sobre las principales PAs durante la morfogénesis *in vitro* fue demostrada y indicando que las PAs exógenas o sus inhibidores fueron útiles aumentando la regeneración de plantas vía embriogénesis somática (Shoeb *et al.*, 2001). También, se ha observado que no es la presencia de altos niveles de PAs, sino los niveles adecuados de PAs y la proporción de Put/Spd los parámetros más relevantes de estos compuestos, en relación con el proceso de embriogénesis somática en las plantas (Li y Burritt, 2003; Yadav y Rajam, 1998; Bastola y Minocha, 1995; Shoeb *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001; Sharma *et al.*,

1995). En la mayoría de las especies estudiadas, solo están disponibles datos preliminares sobre el metabolismo de las PAs en relación a la embriogénesis somática y no se han identificado patrones comunes de estos reportes (Minocha y Minocha, 1995).

El objetivo de este estudio fue caracterizar las variaciones en el contenido y la composición de las PAs en ES de *C. chinense*, comparado con las del EC de la especie.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Condiciones generales

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

2.2.2 Obtención de material vegetal

Se utilizaron semillas del cultivar NSBm, procedente del banco de germoplasma de *C. chinense* Jacq. del Centro de Investigación Científica de Yucatán. El establecimiento y germinación *in vitro* se realizó según el protocolo de Santana *et. al.* (2005). Se esterilizaron las semillas superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% por 5 min y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Después se sumergieron en cloro comercial al 30% durante 15 min y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Para la germinación se colocaron 10 semillas por frasco de alimento infantil con medio semisólido adicionado con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y 1.5 µM de GA₃ con un pH de 5.8. Se incubaron en la oscuridad por 15 días y posteriormente se transfirieron a condiciones de 24 h por 15 días a una temperatura de 25 ± 2°C. La temperatura fue de 25 ± 2°C durante todo el proceso. Los EC fueron extraídos remojando las semillas por 12 h y cortando las semillas por la mitad con un bisturí, retirando el embrión del endospermo.

2.2.3 Inducción de embriogénesis somática

Se realizó la inducción de la embriogénesis somática según el protocolo descrito por Aviles-Viñas (2007). Se tomaron segmentos de hipocotilos de las plántulas de *C. chinense* germinadas *in vitro*. Se colocaron en medio con sales MS, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) (9.05 μM), sacarosa (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), gelrite (2.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Los explantes se incubaron a una temperatura de 25 ± 2 °C, en condiciones de luz continua, a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los hipocotilos de 30 días de inducción, se colocaron en medio líquido con sales MS, 2, 4-D (4.5 μM), sacarosa (30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Se incubaron en condiciones de luz continua a una temperatura de 25 ± 2 °C, a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en agitación de 100 rpm y se cambió el medio cada 14 días por 42 días. Se tomaron muestras de ES en los últimos estadios (torpedo y cotiledonar), se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a una temperatura de -70 °C.

2.2.4 Cuantificación de poliaminas en embriones somáticos y cigóticos

Se tomaron 0.2 g de EC y ES de 42 días en medio líquido y se cuantificó el contenido de PAs por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

2.2.5 Extracción y cuantificación de poliaminas

Extracción:

Se pulverizaron 0.2 g de tejido de peso fresco en un mortero colocando nitrógeno líquido. Se añadió 1 mL de ácido perclórico al 5% (p/v) (PCA), se incubaron por 1 h a 4°C en total oscuridad. Se centrifugaron a 14,000*g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante contenía las PAs libres y conjugadas. La pastilla, en la cual se encuentran las PAs unidas, se resuspendió en 1 mL con NaOH 1N, se agitó en el vortex durante 30 s hasta homogenizar, se centrifugó a 14,000*g durante 30 min a 4°C y se tomó el sobrenadante que contenía las PAs unidas, se tomaron 250 μL y se hidrolizaron (Tiburcio *et al.*, 1986).

Hidrólisis:

Se tomaron 250 μL (PAs conjugadas y unidas) se mezclaron con 250 μL de HCl 12N, se colocaron en ampollitas de vidrio y se sellaron, la hidrólisis se realizó a 110 °C por 18 h. Posteriormente se centrifugaron a 14,000*g durante 10 min para eliminar el material carbonizado; el sobrenadante se recolectó en tubos eppendorf y se secaron a

110 °C por 5.5 h en un calentador en seco. Se suspendió el residuo en 250 µL de PCA al 5% (Tiburcio *et al*, 1986).

Dansilación:

Se tomaron alícuotas de 250 µL de cada extracto de PAs (libres, unidas y conjugadas) y se les agregó 100 µL de Na₂CO₃ saturado, 100 µL de cloruro de dansilo (10 mg·mL⁻¹ acetona), se agitaron en el vortex durante 1 min y se incubaron a 60 °C durante 1 h en oscuridad. Se añadieron 50 µL de L-prolina (100 mg·mL⁻¹ H₂O) para remover el exceso del cloruro de dansilo y se incubaron a 60 °C por 30 min en condiciones de oscuridad. Las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 45 min para remover la acetona. Las dansilpoliaminas se extrajeron con 400 µL de Benceno, y se centrifugaron a 14,000*g durante 1 min para separar las fases. Se recuperó la fase orgánica (400 µL aproximadamente) que contenía las PAs, el extracto se evaporó a temperatura ambiente durante 12 h. Finalmente, se resuspendió el residuo en 500 µL de metanol grado HPLC (Minocha *et al.*, 1990 y 1994).

2.2.6 Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 series, con una columna C-18 de 250 mm x 4.6 mm 5 µ, flujo 2 mL/min (acetonitrilo: H₂O 72/28 v/v) durante 30 min y un post-tiempo de 1 min, la temperatura de la columna fue de 50 °C, con un detector de UV-Visible a una longitud de onda de 220 y 337 nm y un detector de fluorescencia con una fase de excitación de 340 nm y una fase de emisión de 510 nm, inyectando 20µL de muestra. Se corrieron tres repeticiones de estándares de PAs (diaminopropano: Dap; putrescina: Put; cadaverina: Cad; espermidina: Spd; espermina: Spm) a diferentes molaridades (0.05, 0.075, 0.1, 0.5, 1, 2 mM) para identificar su tiempo de retención y realizar una curva de calibración (Walter y Geuns, 1986).

2.3 RESULTADOS

Se realizaron los análisis previos para establecer los tiempos de retención de las diferentes PAs y se realizaron las corridas de los estándares. Como resultado, se identificaron en el cromatograma los siguientes tiempos de retención para cada uno de los estándares analizados: Dap 3.6 min; Put 3.9 min; Cad 4.3 min; Spd 26.2 min (Figura 2.1).

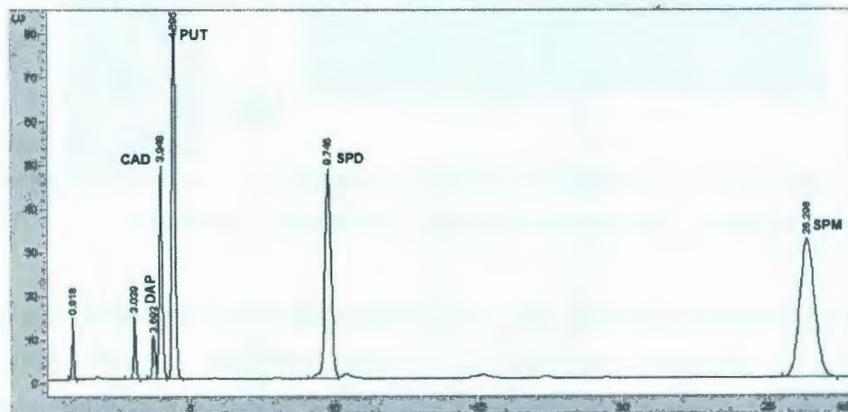


Figura 2.1 Estándares de PAs con sus diferentes tiempos de retención. Estándares a 0.5 mM, Fluorescencia Ex=340, Em=510.

2.3.1 Inducción de la embriogénesis somática de chile habanero

Como resultado de la aplicación del protocolo establecido por Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007) se observó que, según lo esperado, se formaron los ES directamente del hipocotilo, en medio líquido. La frecuencia de formación de los embriones se pudo apreciar altamente eficiente, observándose aproximadamente 100 ES por explante a los 42 días de inducido el proceso, pudiendo distinguirse los diferentes estadios de desarrollo de los embriones (globular, acorazonado torpedo y cotiledonar temprano), en un mismo explante (Fig. 2.2).

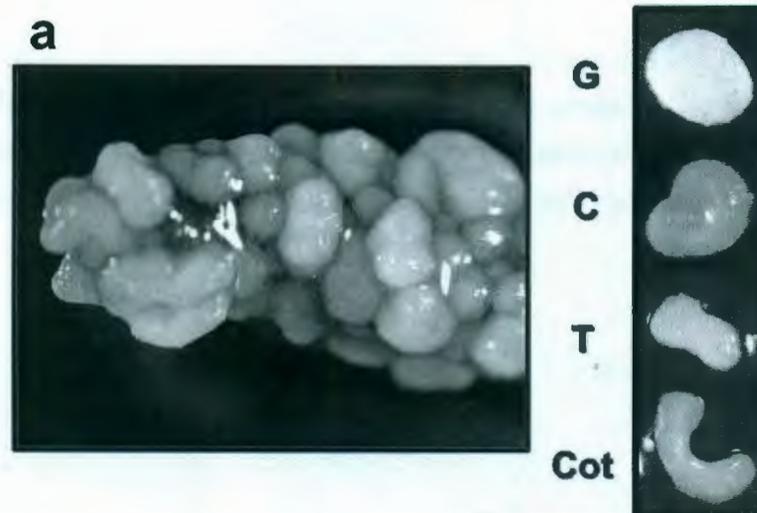


Figura 2.2 a) Hipocotilo de *C. chinense* con embriones somáticos. Estadios de la embriogénesis somática en *C. chinense*, G: globular C: corazón T: torpedo Cot: cotiledonar.

El análisis del contenido de PAs, así como los tipos de PAs presentes en los ES y EC, muestra que los tiempos de retención de los estándares para cada PA, coincidió con los tiempos de retención registrados para las correspondientes PAs analizadas. Estos resultados se muestran en el cromatograma que aparece en la Figura 2.3. Esto permite inferir que el protocolo para medir e identificar las PAs en chile habanero es confiable.

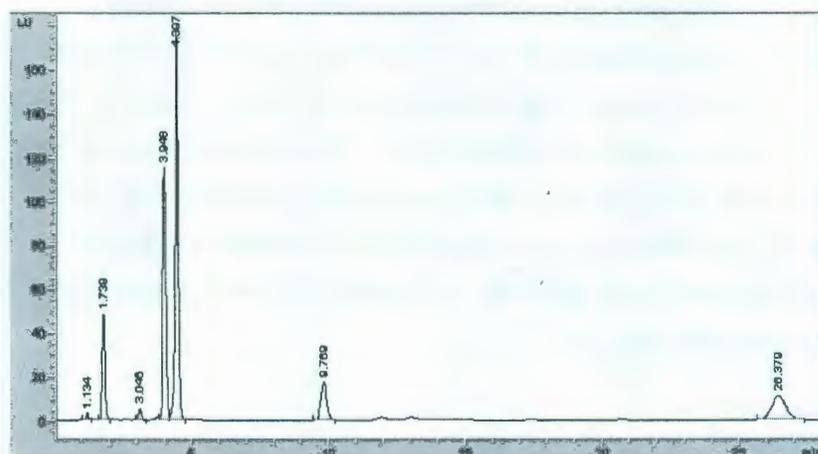


Figura 2.3 Poliaminas unidas encontradas en embriones somáticos de *C. chinense*, Fluorescencia Ex=340, Em=510.

Como resultado del análisis del contenido total de las diferentes PAs, en ES y EC de chile habanero (Fig. 2.4), se pudo observar que los mayores niveles de PAs se registraron en los ES. En EC la cantidad de PAs detectada fue significativamente menor y sólo fueron detectadas la Put y la Cad siendo esta última la PA más abundante de las dos.

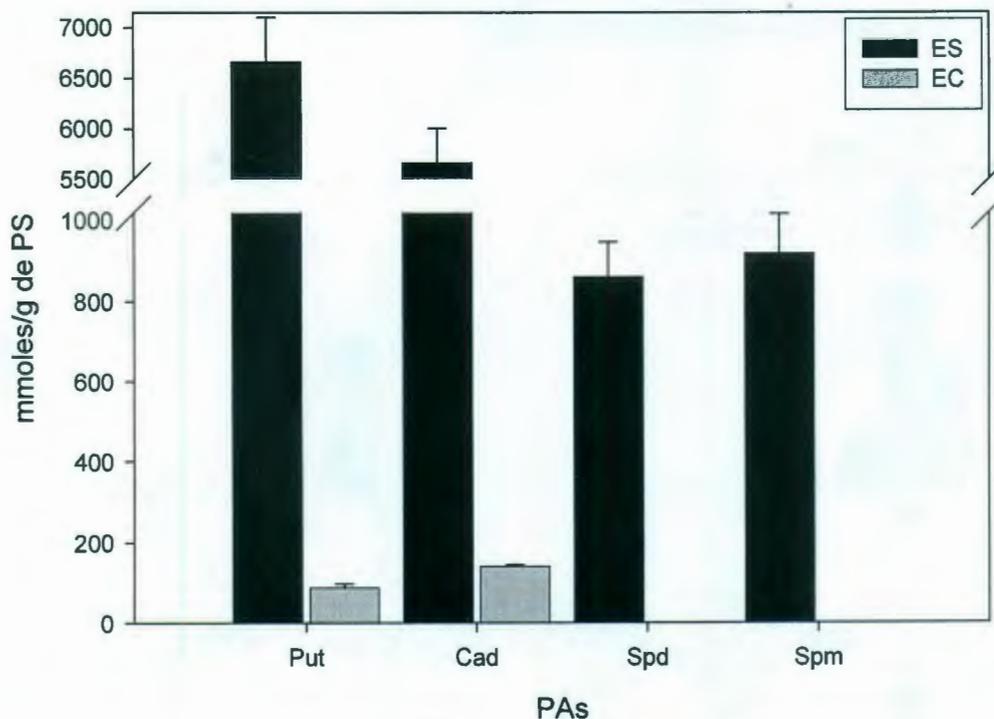


Figura 2.4 Contenidos totales de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm) en embriones somáticos (ES) y en embriones cigóticos (EC) de chile habanero.

En la Figura 2.5 se muestra el contenido endógeno de Put, Cad, Spd y Spm, libres, unidas y conjugadas, respectivamente, en ES y en EC de chile habanero. De todas las PAs evaluadas, las unidas y particularmente en ES, fueron las más abundantes. Al analizar el contenido de Put, se pudo observar que, en ES (Figura 2.5 PUT), esta PA fue encontrada en todas las formas: libres, conjugadas y unidas, siendo mayor el contenido de Put unidas y menor el de Put conjugadas. En EC, la Put en forma unida no fue detectada, mientras que los contenidos de la Put libre y conjugadas fueron significativamente más bajos que los de ES, siendo la Put libre la más abundante. En

el caso de la Cad (Figura 2.5 CAD), fue detectada en ES en forma libre y unida, siendo esta última la más abundante, mientras que en los EC no fue encontrada de forma libre, y las unidas fueron las más abundantes. La Spd (Figura 2.5 SPD) fue detectada libre y unida en ES, las primeras unidas estuvieron presentes en cantidades elevadas, en contraste con las libres. Mientras, en EC no se logró detectar esta PA. De manera similar, en EC no fue detectada Spm (Figura 2.5 SPM) en ninguna de las formas analizadas (libres, unidas, conjugadas), mientras que ES solo fueron detectadas las forma unidas y conjugadas, siendo las unidas más abundantes que las conjugadas. La Spm en forma libre no fue detectada en los ES.

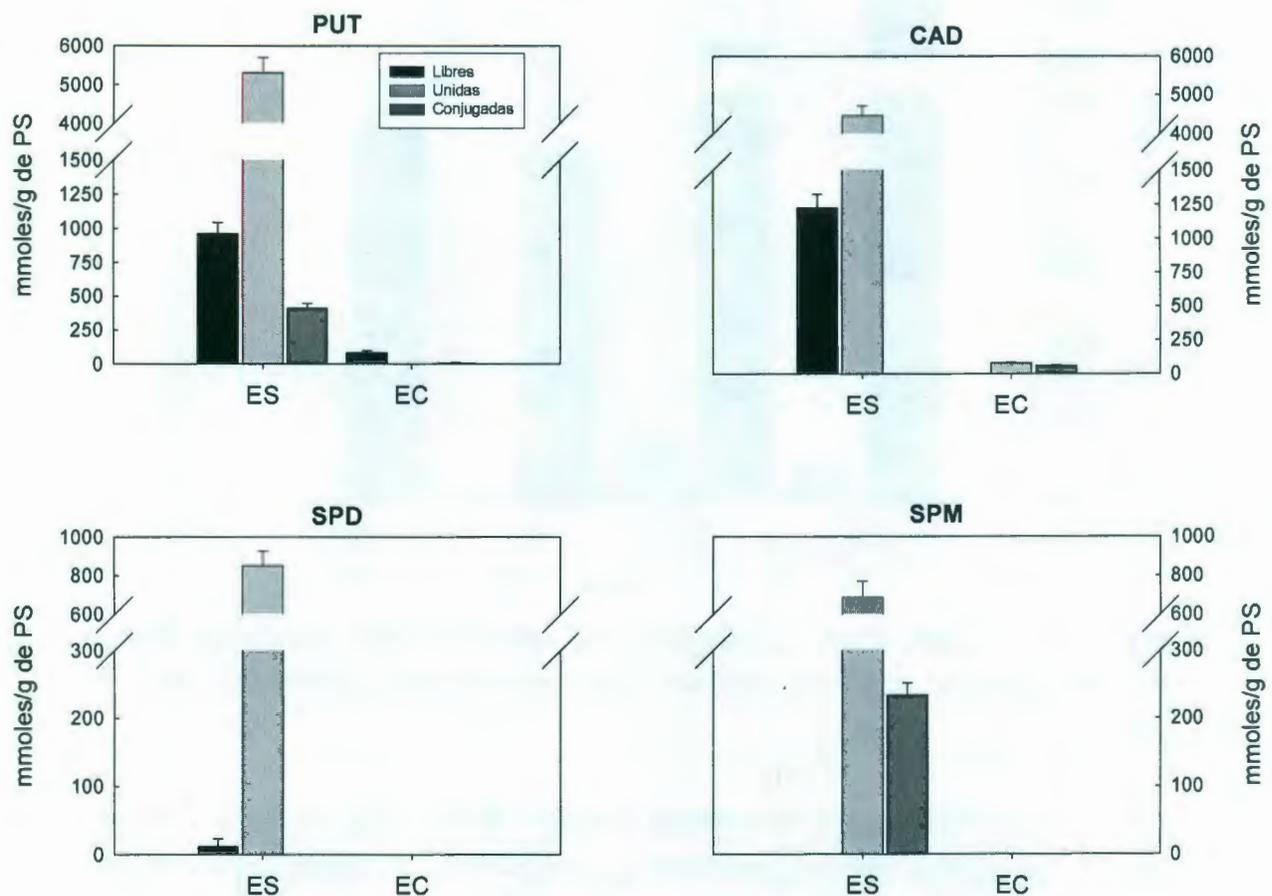


Figura 2.5 Contenido de: PUT= putrescina, CAD= cadaverina, SPD= espermidina y SPM= espermina, libres, unidas y conjugadas, respectivamente, en embriones somáticos (ES) y en embriones cigóticos (EC) de chile habanero.

2.4 DISCUSIÓN

Al caracterizar las variaciones en el contenido y la composición de las PAs en ES y EC de *C. chinense*, fueron encontradas aquellas PAs que son comunes en plantas, pero además, fue detectada la presencia de una PA no común llamada Cad. Este registro resultó interesante ya que a diferencia de Put, Spd y Spm, Cad no es una PA ampliamente distribuida en el reino vegetal por lo que se reconoce como una PA no común en plantas. Ha sido principalmente encontrada en las Fabaceas (Gamarnik y Frydman, 1991), también se tienen reportes de la presencia de esta PA en varias especies de la familia solanácea (por ejemplo *Nicotiana glauca*) en el que se relaciona con la producción de alcaloides (Kuznetsov *et al.*, 2006). En un trabajo reciente Sziderics *et al.* (2010) cuantificaron los niveles de PAs en plantas de *Capsicum annuum* en condiciones naturales con deficiencia de agua (estrés hídrico), al extraer las PAs libres de hoja y raíz detectaron las PAs comunes y Cad, en mayor cantidad en las hojas, únicamente los niveles de Put y Cad fueron significativamente diferentes al control. En ES de Chile habanero, la Cad y Put fueron las PAs que se encontraron en mayor cantidad, siendo Spd y Spm las que se registraron en cantidades mucho menores. Resultados similares fueron reportados por Shevyakova *et al.* (2004), quienes trabajando con *Mesembryanthemum crystallinum* L., detectaron una interacción entre el etileno y la Cad. Estos autores observaron que al cultivar hojas de *M. crystallinum* en medio con NaCl se inducía la rápida emisión de etileno precedida por la acumulación de Cad, también demostraron que el etileno estimula la fosforilación de la LDC y con esto el aumento de Cad. Posteriormente, al tratar las hojas de *M. crystallinum* con etileno se incrementaron dramáticamente el contenido de Cad y disminuyeron simultáneamente los niveles endógenos de Spd, esto debido probablemente a la competencia que existe entre el etileno y las PAs (Spd y Spm) por el mismo precursor, SAM (Moshkov *et al.*, 2008).

Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado en zanahoria, uva y plantas leñosas en las que se reportan altos contenidos de PAs en ES (Faure *et al.* 1991), mientras que las cantidades de PAs en EC resultaron siempre menores. Martin-Tanguy (2001) reportó que durante la germinación del arroz, las PAs conjugadas actúan como formas de almacenamiento de las propias PAs las cuales, después de una hidrólisis, pueden suplir a la célula con PAs adicionales que podrán participar durante la división o la expansión celular. También se ha correlacionado sus niveles con la viabilidad de las semillas y las PAs unidas están involucradas en la respuesta

de las plantas a estrés ambiental y a deficiencias nutricionales, dando estabilidad a las proteínas y ácidos nucleicos.

Los resultados hasta el momento muestran que, probablemente los ES de chile habanero están bajo el efecto de algún estrés, el cual ocasiona que las PAs libres se unan a los ácidos nucleicos y a las proteínas para protegerlos. Otra hipótesis pudiera ser la respuesta al estrés de etileno dentro del recipiente de cultivo, lo que estimula la actividad de la LDC, aumentando la síntesis de Cad y la disminución en la producción de Spd y Spm al competir por el mismo precursor, SAM. En lo que se refiere al EC, llama la atención la presencia de Cad, lo que permite inferir que la presencia de esta PA en chile habanero pudiera ser característico de la especie (*C. chinense*).

2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal S. y N. Chandra (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Curr. Sci.*, 52, 645-46.
- Arroyo R. y M.A. Revilla (1991). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep.*, 10, 414-416.
- Aviles-Viñas S.A. y N. Santana-Buzzy (2007). Papel del etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 65 p.
- Bastola D. R., S. C. Minocha (1995). Increased putrescine biosynthesis through transfer of mouse ornithine decarboxylase cDNA in carrot promotes somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*, 109, 63-71.
- Binzel M.L., N. Sankhla, S. Joshi y D. Sankhla (1996). *In vitro* regeneration in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) from "half- seed explants". *Plant Growth Regul.*, 20, 287-293.
- Buyukalaca S. y F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 46, 227-235.
- Faure O., M. Mengoli, A. Nougarede y N. Bagni (1991). Polyamine pattern and biosynthesis in zygotic and somatic embryo stages of *Vitis vinifera*. *J. Plant Physiol.*, 138, 545-549.
- Gamarnik A. y R. Frydman (1991). Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiology*, 97, 778-785.
- Harini I. y G. Lakshmi-Sita (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89, 107-112.

- Huang X.L., X.J. Li, Y. Li y L.Z. Huang (2001). The effect of AOA on ethylene and polyamine metabolism during early phases of somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Physiol. Plant.*, 113, 424-429.
- Husain S, A. Jain y S.L. Kothari (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annum* L.. *Plant Cell Rep.*, 19, 64-68.
- Khan H., I. Siddique, M. Anis (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annum*. *Biologia Plantarum*, 50(4), 789-792.
- Kuznetsov V., N.L. Radyukina, N.I. Shevyakova (2006). Polyamines and stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(5), 658-683.
- Lecona C.A. y N. Santana-Buzzy (2008). Estudio de las proteínas en embriones cigóticos y embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 61p.
- Li Z. y D.J. Burritt (2003). Changes in endogenous polyamines during the formation of somatic embryos from isogenic lines of *Dactylis glomerata* L. with different regenerative capacities. *Plant Growth Regulation* 40, 65-74.
- López-Puc G., A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, P. Zapata-Castillo, M.C. Montalvo-Peniche, F. Barahona-Pérez y N. Santana-Buzzy (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience* 41(7), 1645-1650.
- Martin-Tanguy J. (2001). Metabolism and function of polyamines in plant: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*, 34, 135-148.
- Minocha S.C., R. Minocha, C.A. Robie (1990). High-performance liquid chromatographic method for the determination of dansyl-polyamines. *Journal of Chromatography*, 511, 177-183.

Minocha R., W.C. Shortle, S. Long, S.C. Minocha (1994). A rapid and reliable procedure for extraction of cellular polyamines and inorganic ions from plant tissues. *Journal of Plant Growth Regulation*, 13, 187-193.

Minocha S.C. y R. Minocha (1995). Role of polyamines in somatic embryogenesis. En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds Vol. 30*. Bajaj, T.P.S. (ed)., Berlin, Germany: Springer Verlag, pp. 55-72.

Moshkov I.E., G.V. Novikova, M.A. Hall y E.F. George (2008). Plant growth regulators III: gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds. En: *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition* George E., Hall M. y De Klerk G. (ed). Springer. pp. 227-281.

Murashige T. y L. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 473-497.

Ochoa-Alejo N. y L. Ireta-Moreno (1990). Cultivar differences in shoot forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Sci. Hort.*, 42, 21-28.

Sanatombi K. y G.J. Sharma (2008). *In vitro* propagation of *Capsicum chinense* Jacq. *Biologia Plantarum*, 52(3), 517-520.

Santana-Buzzy N., A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M.C. Montalvo-Peniche, P.Y. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldívar-Collí, O. Gutiérrez-Alonso y M.L. Miranda-Ham (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum annuum* Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40(6), 1829-1831.

Santana-Buzzy N., A. Canto-Flick, L.G. Iglesias-Andreu, M.C. Montalvo-Peniche, G. López-Puc y F. Barahona-Pérez (2006). Improvement of *in vitro* culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience*, 41(2), 405-409.

Sharma P. y M.V. Rajam (1995). Spatial and temporal changes in endogenous polyamine levels associated with somatic embryogenesis from different

- hypocotyl segments of eggplant. *J. Plant Physiol.*, 146, 658-664.
- Shevyakova N., M. Shorina, V. Rakitin, L. Stetsenko y V. Kuznetsov (2004). Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Doklady Biological Sciences*, 395, 127-129.
- Shoeb F., J.S. Yadav, S. Bajaj y M.V. Rajam (2001). Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of *Indica* rice. *Plant Sci.*, 160, 1229-1235.
- Szasz A., G. Nervo y M. Fari (1995). Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant Physiol.*, 82, 369-374.
- Sziderics A.S., M. Oufir, F. Trognitz, D. Kopecky, I. Matusikova, J.F. Hausman y E. Wilhelm (2010) Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum* L.) during early phase of water deficit. *Plant Cell Rep.*, 29, 295-305.
- Tiburcio A.F., R. Kaur-Sawhney, A.W. Galston (1986). Polyamine metabolism and osmotic stress. *Plant Physiology*, 82, 375-378.
- Walter H.J.P. y Geuns J.M.C. (1986). High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiol.*, 83, 232-234.
- Yadav J.S. y M.V. Rajam (1998). Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant. *Plant Physiol.*, 116, 617-625.
- Zapata-Castillo P.Y., A. Canto-Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz, F. Barahona-Pérez y N. Santana-Buzzy (2007). Somatic embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspension. *HortScience*, 42(2), 329-333.

CAPITULO III. COMPORTAMIENTO DE LAS POLIAMINAS ENDÓGENAS EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CHILE HABANERO CULTIVADOS EN RECIPIENTES CON VENTILACIÓN Y SIN VENTILACIÓN.

3.1 INTRODUCCIÓN

Al caracterizar las variaciones en el contenido y la composición de las PAs en ES y cigóticos de *C. chinense*, fueron encontradas aquellas PAs que son comunes en plantas, pero además, fue detectada la presencia de una PA no común llamada Cad. La Cad se origina de la descarboxilación de la lisina a través de la acción de la lisina descarboxilasa. Shevyakova *et al.* (2004), que trabajaron con *Mesembryanthemum crystallinum* L. detectaron una interacción entre el etileno y la Cad. Estos autores observaron que al cultivar hojas de *M. crystallinum* en medio con NaCl se inducía la rápida emisión de etileno precedida por la acumulación de Cad. Posteriormente, al tratar las hojas de *M. crystallinum* con etileno, se registró un incremento dramático del contenido endógeno de Cad, disminuyendo simultáneamente los niveles endógenos de Spd, debido probablemente a la competencia que existe entre el etileno y las PAs (Spd y Spm) por el mismo precursor: SAM (Moshkov *et al.*, 2008). Shevyakova *et al.* (2004) demostraron que el etileno estimula la fosforilación de la LDC, aumentando el contenido de Cad. Santana-Buzzy *et al.* (2006) reportaron la producción de etileno en plántulas establecidas *in vitro* y su efecto sobre el desarrollo de los brotes. Aviles-Viñas (2007) detectó la presencia de etileno durante la inducción (medio semisólido) de ES de *C. chinense*. El objetivo de este estudio fue analizar el comportamiento de las PAs endógenas en ESs de chile habanero cultivados en recipientes con ventilación (CV) y sin ventilación (SV).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Condiciones generales

Los medios de cultivo y los materiales requeridos durante la manipulación de los explantes en condiciones asépticas, fueron previamente esterilizados en autoclave a 121 °C y 1.2 Kg·cm⁻² de presión durante 15 min. Para los medios de cultivo en estado semisólido se colocaron 25 mL en frascos de vidrio de alimento infantil con capacidad de 100 mL, mientras que para el medio semisólido se colocaron 50 mL en matraces de 250 mL. El pH de los medios se ajustó antes de la esterilización a 5.8 con NaOH 1N y HCl 1N. Las siembras se realizaron en campana de flujo laminar horizontal.

3.2.2 Obtención de material vegetal

Se utilizaron semillas de la variedad NSBm, proveniente del banco de germoplasma de *C. chinense* conservado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. El establecimiento y germinación *in vitro* se realizó según el protocolo de Santana *et. al.* (2005). Se esterilizaron las semillas superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% por 5 min y se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Después se sumergieron en cloro comercial al 30% durante 15 min y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Para la germinación se colocaron 10 semillas por frasco de alimento infantil con medio semisólido adicionado con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y 1.5 μM de GA_3 con un pH de 5.8. Se incubaron en la oscuridad por 15 días y posteriormente se transfirieron a condiciones de 24 h por 15 días a una temperatura de 25 ± 2 °C. La temperatura fue de 25 ± 2 °C durante todo el proceso.

3.2.3 Inducción de embriogénesis somática

Se realizó la inducción de la embriogénesis somática según el protocolo descrito por Aviles-Viñas (2007) en dos condiciones de cultivo, recipientes sin ventilación (SV) y con ventilación (CV). Los explantes se incubaron en condiciones de luz continua a una temperatura de 25 ± 2 °C, a una intensidad lumínica de $40\text{-}50 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en agitación de 100 rpm y se cambió el medio cada 14 días por 42 días.

3.2.4 Cuantificación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 series, con una columna C-18 de 250 mm x 4.6 mm 5 μ , flujo 2 ml/min (acetonitrilo: H_2O 72/28 v/v) durante 30 min y un post-tiempo de 1 min, la temperatura de la columna fue de 50 °C, con un detector de UV-Visible a una longitud de onda de 220 y 337 nm y un detector de fluorescencia con una fase de excitación de 340 nm y una fase de emisión de 510 nm, inyectando 20 μL de muestra.

3.2.5 Caracterización del contenido de poliaminas y etileno en los recipientes de cultivo

Se cuantificaron el contenido de PAs en los embriones, y de etileno en los recipientes de cultivo, en las siguientes etapas del protocolo:

Etapas de inducción y proliferación de la embriogénesis somática (a los 15 y 30 días, en medio semisólido); etapa de desarrollo de embriones (a los 14 días de transferidos a medio líquido); etapa de maduración de los ES: *globular-corazón* a los 28 días de

cultivo; *torpedo-cotiledonar* a los 42 días de cultivo (Figura 3.1). Se cuantificó el contenido de PAs al explante (hipocotilo) sin someterlo a ninguno de los tratamientos evaluados.

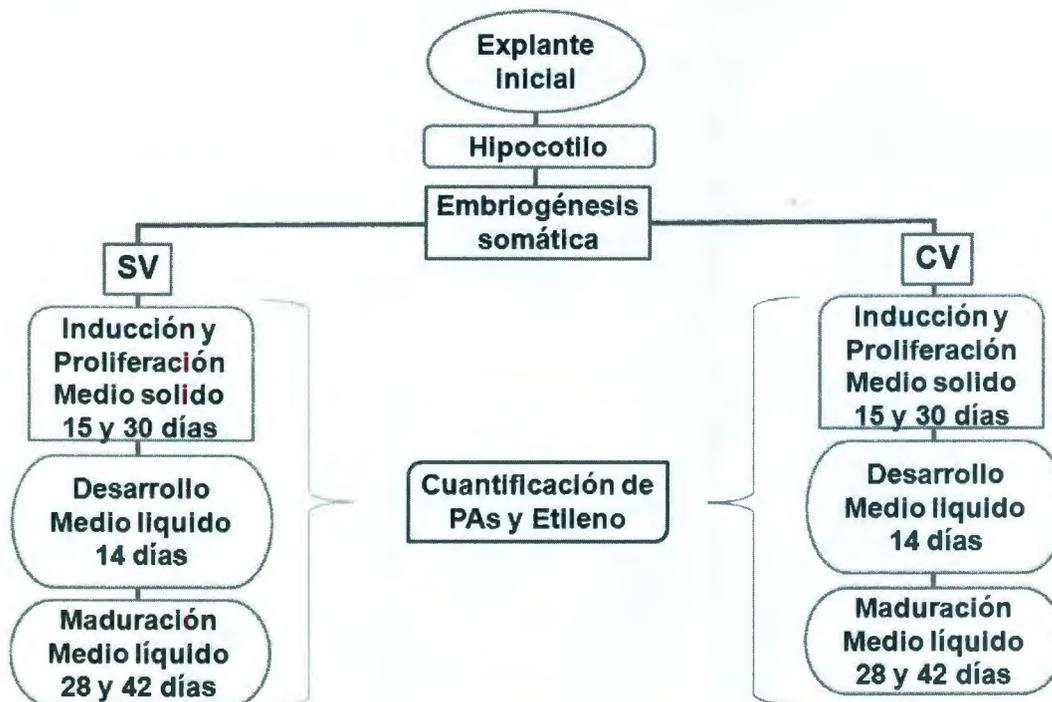


Figura 3.1 Diagrama de flujo de la estrategia experimental a seguir para la cuantificación de PAs y etileno en hipocotilos y embriones somáticos en el protocolo de Aviles-Viñas (2007) en recipientes sin ventilación (SV) y con ventilación (CV).

3.2.6 Cuantificación de etileno

El contenido de etileno en los recipientes de cultivo se determinó en un cromatógrafo de gases HP8690 con un detector FID, columna GS-QFSOT (300*0.53 mm) a 70 °C, utilizando nitrógeno como gas acarreador, se tomaron 2 mL del aire del recipiente de cultivo (Santana *et al.*, 2006).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Contenido de etileno

Como resultado de la cuantificación del contenido de etileno, se pudo observar que en los recipientes CV nunca fue detectado este gas regulador, mientras que sí fue detectado en los SV. Como se aprecia en la Figura 3.2, se registraron picos de etileno que oscilaron entre 2.5 - 4.5 nL·L⁻¹ a lo largo del cultivo, y sólo el etileno no estuvo presente cuando se realizaba la renovación del medio de cultivo, momento en que el etileno fue liberado del recipiente de cultivo.

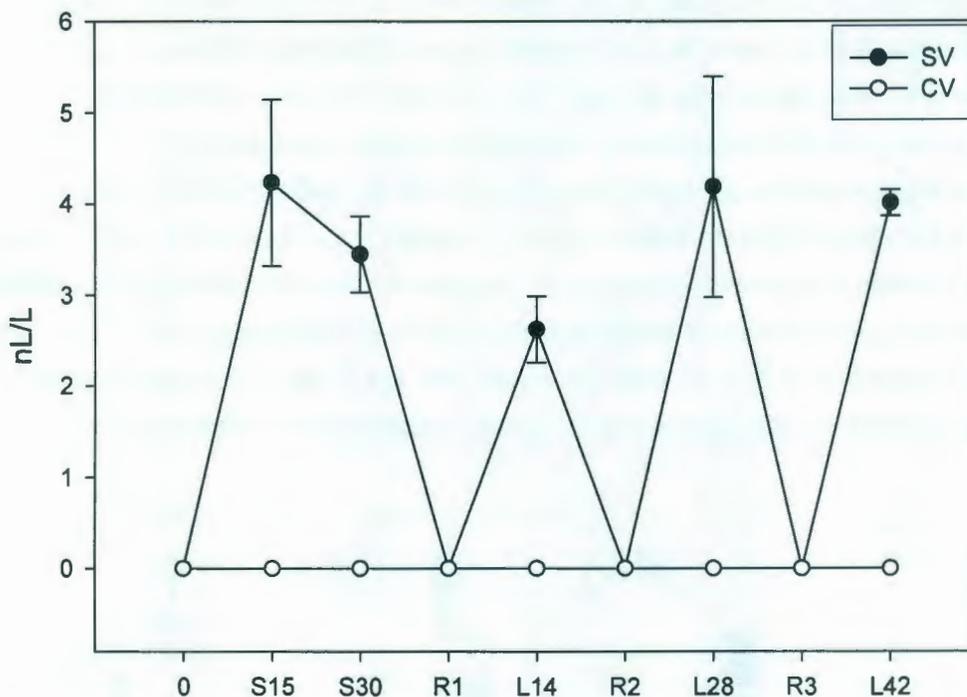


Figura 3.2 Concentración de etileno (nL·L⁻¹) durante la inducción de la embriogénesis somática en diferentes etapas del cultivo a los 0, 15 y 30 días en medio semisólido (0, S15 y S30); 14, 28 y 42 días en medio líquido (L14, L28 y L42); medición después de las resiembras (R1, R2 y R3). En recipientes de cultivo sin ventilación (SV) y con ventilación (CV).

3.3.2 Contenido de poliaminas totales en embriones somáticos cultivados en recipientes sin ventilación y con ventilación

Como resultado de la cuantificación de las PAs contenidas en el explante inicial (segmentos de hipocotilo) previo al cultivo, así como durante la etapa de inducción y proliferación y hasta los 14 días de la etapa de desarrollo, no se logró detectar la presencia de las PAs en ninguna de las repeticiones, probablemente por ser muy bajos los contenidos en los momentos evaluados. Sin embargo, como se muestra en la Figura 3.3, la Put contenida en los ESs mostró una diferencia notable entre los 28 y los 42 días de cultivo en la etapa de maduración, con una ligera tendencia a un mayor incremento en ESs cultivados en recipientes CV a los 42 días, contrario a lo observado a los 28 días. Por su parte, la Cad mostró un comportamiento inverso. Esta fue la segunda PA más abundante en los ESs de esta especie, presentando mayor contenido a los 28 días de cultivo en recipientes SV que en recipientes CV, con una marcada disminución de su contenido a los 42 días de cultivo, momento en que fueron similares los niveles de esta PA no común, en ambas condiciones de cultivo (SV y CV). Spd mostró menor contenido a los 28 que a los 42 días de cultivo, con una ligera tendencia al incremento en los recipientes CV a los 42 días de cultivo, mientras que la Spm fue detectada a los 42 días de cultivo, no así a los 28, mostrando mayor contenido de esta PA cuando los embriones fueron cultivados en recipientes CV.

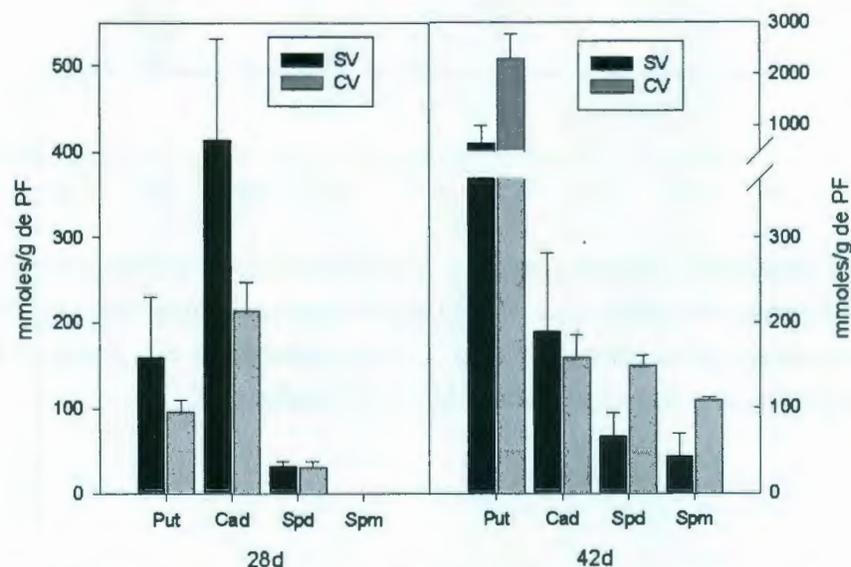


Figura 3.3 Contenido de putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd) y espermina (Spm), en recipientes sin ventilación (SV) y recipientes con ventilación (CV) en embriones somáticos (ES) de chile habanero, a los 28 y a los 42 días de cultivo en medio líquido.

Al analizar el contenido de cada una de las PAs (Put, Cad, Spd, Spm) en sus formas libres, unidas y conjugadas, a los 28 y a los 42 días de cultivo (Fig. 3.4), se pudo observar que sólo a los 42 días de cultivo la Put estuvo presente en todas las formas (libres, unidas y conjugadas), mientras que las unidas se registraron en mayor cantidad. Los contenidos de Put libres, unidas y conjugadas, en recipientes CV fueron significativamente mayores que los detectados en embriones cultivados en recipientes SV. Esta PA (Put), a los 28 días sólo fue detectada en forma libre en ES cultivados en recipientes SV y CV, y unida sólo en recipientes SV. Put conjugada no fue detectada a los 28 días en ninguna de las dos condiciones evaluadas (SV y CV).

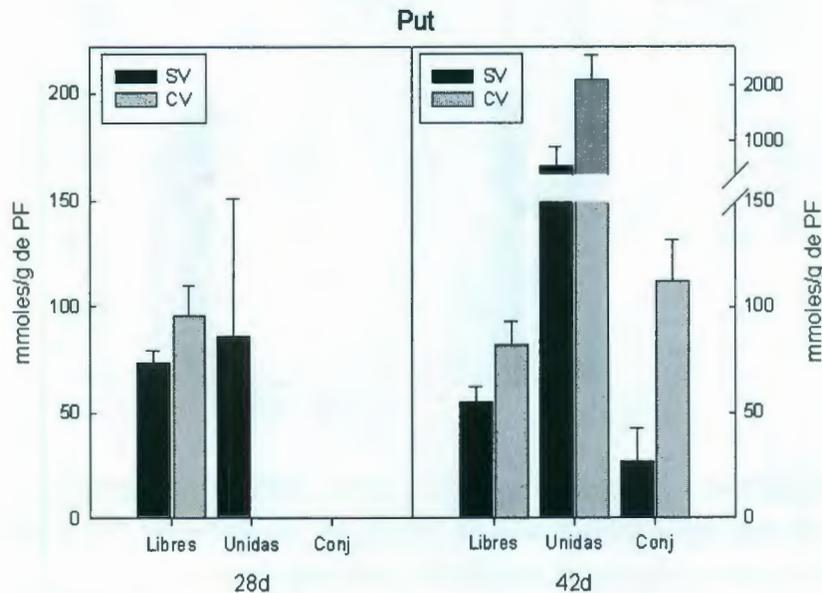


Figura 3.4 Contenido de putrescina (Put) libres, unidas y conjugadas, en embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación (SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en medio líquido.

En la Figura 3.5 se muestran los contenidos de Cad libres, unidas y conjugadas en embriones cultivados en recipientes SV y CV, a los 28 y a los 42 días de cultivo. Como se puede apreciar, los niveles de esta PA fueron mayores en embriones mantenidos en recipientes SV que CV a los 28 días de cultivo, y sólo en sus formas unidas y conjugadas, sin que fuera registrada en forma libre. A los 42 días de cultivo sólo fue detectada en forma conjugada, siendo ligeramente mayor su contenido en ES cultivados en recipientes SV.

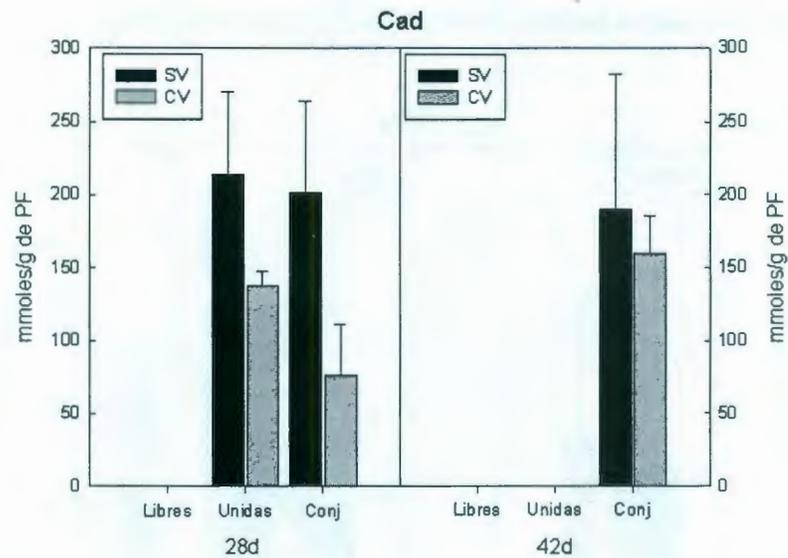


Figura 3.5 Contenido de cadaverina (Cad) libres, unidas y conjugadas, en embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación (SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en medio líquido.

Spd en forma libre, como se muestra en la Figura 3.6, mostró contenidos similares tanto a los 28 como a los 42 días de cultivo en embriones cultivados SV y CV, siendo ligeramente superior en SV a los 42 días de cultivo, mientras que la Spd unida sólo estuvo presente a los 42 días de cultivo, en embriones cultivados en recipientes SV y CV, siendo significativamente superior en su forma unida en ES cultivados en recipientes SV. La Spd conjugada no fue registrada en ninguna de las dos condiciones (SV y CV) ni en los momentos que fueron evaluados (28 y 42 días).

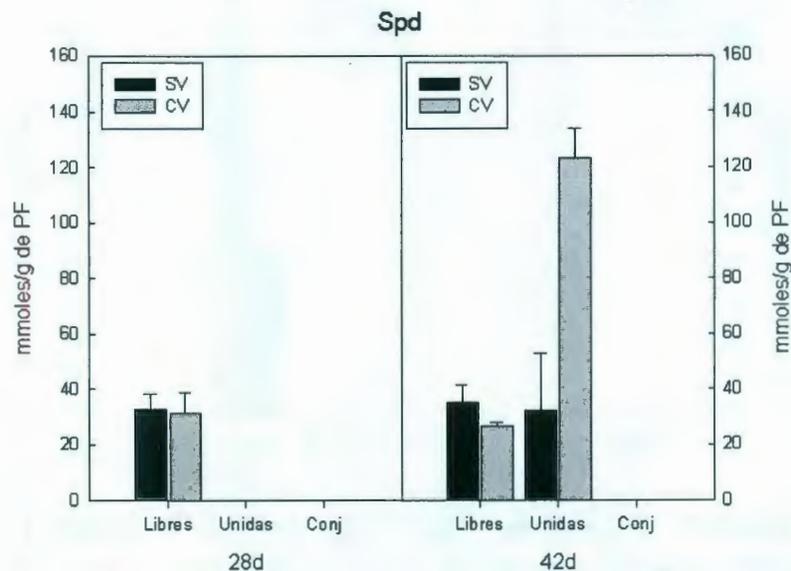


Figura 3.6 Contenido de espermidina (Spd) libres, unidas y conjugadas, en embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación (SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en medio líquido.

Spm, como se muestra en la Figura 3.7, sólo estuvo presente en forma unida, a los 42 días de cultivo, independientemente de la condición de cultivo de los ES; sin embargo, la cantidad de esta PA fue tres veces mayor en recipientes CV que en recipientes SV. Las otras PAs analizadas (Put, Cad, Spd) no fueron detectadas en las muestras analizadas.

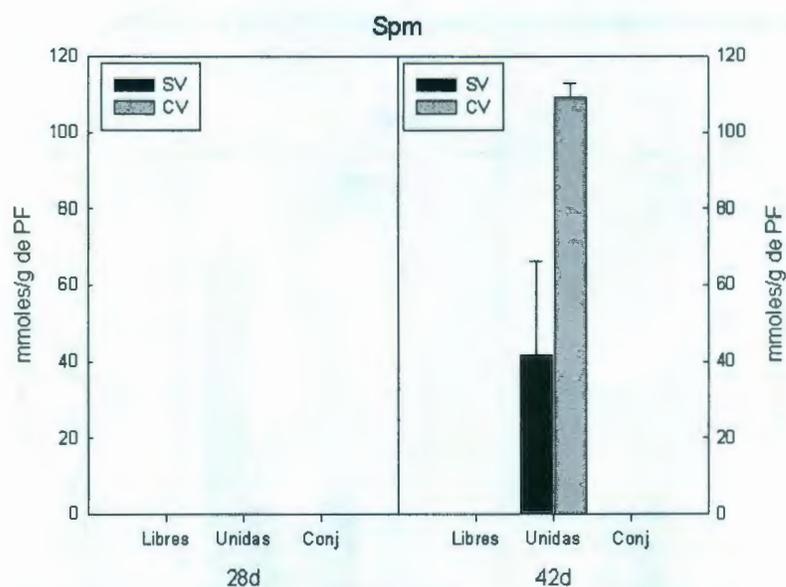


Figura 3.7 Contenido de espermina (Spm) libres, unidas y conjugadas, en embriones somáticos de chile habanero cultivados en recipientes sin ventilación (SV) y recipientes con ventilación (CV), a los 28 y a los 42 días de cultivo en medio líquido.

3.4 DISCUSIÓN

La presencia del etileno en recipientes SV durante el cultivo de brotes de *C. chinense* fue reportado por Santana-Buzzy *et al.* (2006). El contenido del gas regulador fue registrado a partir del día 16, observándose el pico máximo entre los días 28 y 24 del cultivo. Trabajando con esta misma especie, Aviles-Viñas (2007) también reportó la presencia de etileno en los recipientes de cultivo durante la embriogénesis somática, en medio sólido. Corroborando los resultados mencionados anteriormente, en este estudio fue detectado este gas, tanto en medio sólido como en medio líquido.

Las PAs son aminas alifáticas que están implicadas en una gran diversidad de procesos biológicos, por lo que su concentración dentro de las células son estrictamente reguladas (Alcazar *et al.*, 2010). De esta manera, además del ritmo de su biosíntesis, la concentración intracelular de estos compuestos (PAs) libres, es regulada mediante su conjugación con moléculas pequeñas, especialmente ácidos hidroxycinámicos (Stetsenko *et al.*, 2009) (PAs conjugadas solubles) o con sustancias de alto peso molecular, como hemicelulosa, lignina y en menor medida proteínas (PAs conjugadas insolubles). Además de la conjugación, los niveles de PAs libres pueden ser disminuidos por desaminación oxidativa. Los niveles citoplasmáticos de las PAs también pueden ser regulados por compartimentalización subcelular de vacuolas, mitocondrias y cloroplastos, así como por extrusión (Moschou *et al.*, 2008). La proporción relativa de PAs libres y conjugadas varía entre las diferentes especies de plantas. Por ejemplo en el tabaco arriba del 90% de los recursos de PAs se encuentran de forma conjugada (Bagni y Tassoni, 2001). Las características más importantes de las PAs conjugadas con ácidos fenólicos (solubles en ácido perclórico) durante la adaptación a estrés es su actividad antioxidante (Alcázar *et al.*, 2010). Bors *et al.*, (1989) fueron los primeros en describir la actividad antioxidante de las PAs libres y conjugadas solubles en ácido perclórico, mostrando que las PAs libres tienen menos constante de unión con todos los tipos de ROS (comparado con sus conjugados con ácido caféico, cumárico y ferúlico). Conjugados de PAs en plantas bajo condiciones de estrés pueden neutralizar los efectos dañinos. Sin embargo, la formación de PAs conjugadas con compuestos fenólicos bajo condiciones de estrés puede depender de gran manera en la especie de la planta así como el contenido de PAs y sustancias fenólicas en la planta (Stetsenko *et al.*, 2009).

Los niveles de Put encontrados en los recipientes CV fueron ligeramente mayores que en los recipientes SV, siendo esta PA la que se detectó en mayores cantidades. La Put

unida fue la encontrada en mayor cantidad a los 42 días. El papel de la Put en el crecimiento celular no está totalmente elucidado. Sin embargo, se ha reportado que en cultivos embriogénicos de *Pinus oocarpa* y *Pinus patula*, Put estimuló la división celular (Feirer, 1995), mientras que en suspensiones celulares de *Pinus taeda* y de callo de *Nicotiana tabacum* el alto contenido de Put endógena fue asociado con la reducción del crecimiento celular (Silveira *et al.*, 2004; Rastogi y Davies, 2000). Trabajando con protoplastos de avena se observó que la aplicación de Put exógena estimuló la división celular, aunque no se encontró una relación directa entre la concentración de esta PA y la respuesta del cultivo (Wu y Kuniyuki, 1997). Este mismo patrón fue observado en cultivos embriogénicos de *Araucaria angustifolia* suplementados PAs (Steiner *et al.*, 2007).

La Cad, PA poco común en plantas, en esta especie resultó la segunda PA más abundante (después de la Put) en los embriones, siendo ligeramente superior su contenido en los ES cultivados en recipientes SV. La Cad ha detectada en especies pertenecientes a la familia de las Solanaceas, y se ha encontrado relación de esta PA con la producción de alcaloides (Bagni y Tassoni, 2001). Sziderics *et al.* (2010) cuantificaron los niveles de PAs en plantas de *Capsicum annuum* cultivadas en condiciones de campo sometidas a un régimen de deficiencia de agua (estrés hídrico). Al extraer las PAs libres de hoja y raíz detectaron que sólo los contenidos de Put y Cad difirieron significativamente del control. Se ha demostrado que la interacción entre las PAs y etileno no se limitada sólo a antagonismo. *Mesembryanthemum crystallinum* ha sido una especie utilizada como modelo para investigar la interacción entre Cad y etileno bajo condiciones de estrés. Así, en condiciones de salinidad se ha observado que cuando la producción de etileno se incrementó, la Cad se acumuló en hojas (Kuznetsov *et al.*, 2002). Posteriormente, quedó demostrado que la formación de Cad es dependiente del etileno al detectar la acumulación de esta diamina en hojas aisladas expuestas a una atmósfera de etileno o incubadas en presencia de su precursor ACC (Shevyakova *et al.*, 2004). Coincidiendo con estos resultados, en este estudio con *C. chinense* se pudo observar que el contenido de Cad disminuyó ligeramente en los embriones que fueron cultivados en recipientes CV. Por otra parte, esta PA fue detectada también en los embriones cigóticos de esta especie, lo que permite inferir que probablemente la presencia de esta PA poco común en plantas pudiera estar muy relacionada con la especie en sí.

Las cantidades de Spd libres fueron similares en las dos condiciones de cultivo y en ambas fechas, pero las PAs unidas a los 42 días en los recipientes de cultivo CV la Spd Unida se detectó en mayor cantidad siendo aproximadamente 3 veces mayor que en los recipientes SV. La concentración de Spd celular es determinante para la función de eIF5A, lo cual implica el reclutamiento y traducción de RNAm (Matto *et al.*, 2010). Esto nos pudiera estar indicando que existe un mayor estímulo en la formación de proteínas en los recipientes CV ya que se está usando mayor cantidad de esta PA unida.

La Spm se encontró solamente en su forma unida y a los 42 días de cultivo en medio líquido, observándose que su concentración se incrementó drásticamente en ES cultivados en recipientes CV. Comparado con Put y Spd, el contenido de Spm en la célula es generalmente pequeño. Esto pudiera estar relacionado con la necesidad de las células de mantener internamente bajo, un umbral de concentración. El Interés sobre la función y el papel de la Spm en plantas ha sido aumentado recientemente a partir de las evidencias encontradas sobre que la Spm provee tolerancia a la salinidad, y que Spm regresa a convertirse en Spd y de esta pasa a convertirse en Put (Matto *et al.*, 2010).

3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcázar R., T. Altabella, F. Marco, C. Bortolotti, M. Reymond, C. Koncz, P. Carrasco y A.F. Tiburcio (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plants abiotic stress tolerance. *Planta*, 231, 1237-1249.
- Aviles-Viñas S.A. y N. Santana-Buzzy (2007). Papel del etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 65 p.
- Bagni N. y Tassoni A. (2001). Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plant. *Amino Acids*, 20, 301-317.
- Bors W.C. Langebartels, C. Michel, H. Sandermann (1989). Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry*, 28, 1589-1595.
- Feirer, R.P. (1995). The biochemistry of conifer embryo development: amino acids, polyamines, and storage proteins. En: *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 1, Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 317–336.
- Kuznetsov V.V., V.Y. Rakitin, N.G. Sadomov, D.V. Dam, L.A. Stetsenko y N.I. Shevyakova (2002). Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants?. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 120-130.
- Matoo A.K., S.C. Minocha, R. Minocha, A.K. Handa (2010). Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino Acids*, 38, 405-413.
- Moshkov I.E., G.V. Novikova, M.A. Hall y E.F. George (2008). Plant growth regulators III: gibberellins, ethylene, abscisic acid, their analogues and inhibitors; miscellaneous compounds. En: *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition*, George E., Hall M. y De Klerk G. (ed).. Springer. pp. 227-281.

- Murashige T. y L. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Pandey S., S.A. Ranade, P.K. Nagar y Nikhil-Kumar (2000). Role of polyamines and ethylene as modulator of plant senescence. *J. Biosci.*, 25(3), 291-299.
- Rastogi R., Davies P.J. (2000). Effects of light and plant growth regulators on polyamine metabolism in higher plants. En: *Biochemistry and physiology of polyamines in plants*, Slocum R.D., Flores H.E. (ed). CRC Press, Boca Raton, pp 187-199.
- Santana-Buzzy N., A. Canto-Flick, L.G. Iglesias-Andreu, M.C. Montalvo-Peniche, G. López-Puc y F. Barahona-Pérez (2006). Improvement of *in vitro* culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience*, 41(2), 405-409.
- Shevyakova N., M. Shorina, V. Rakitin, L. Stetsenko y V. Kuznetsov (2004). Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Doklady Biological Sciences*, 395, 127-129.
- Silveira V., Floh E.I.S., Handro W., Guerra M.P. (2004). Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 76,53-60.
- Steiner N., C. Santa-Catarina, V. Silveira, E.I.S.Floh y M.P. Guerra (2007). Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 89, 55-62.
- Stetsenko L.A., V.Y. Rakitin, N.I. Shevyakova y V.V. Kuznetsov (2009). Organ-specific changes in the content of free and conjugated polyamines in *Mesebryanthemum crystallinum* plants under salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56, 808-813.

- Sziderics A.H., M. Oufir, F. Trognitz, D. Kopecky, I. Matusikova, J.F. Hausman, E. Wilhelm (2010). Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annum* L.) during early phase of water deficit. *Plant Cell Rep.*, 29, 295-305.
- Walter H.J.P. y Geuns J.M.C. (1986). High speed HPLC analysis of polyamines in plant tissues. *Plant Physiol*, 83, 232-234.
- Wu S.C., Kuniyuki A.H. (1997). Spatial distribution of free and conjugated polyamines in leaves of *Solanum melongena* L. associated with differential morphogenetic potential: efficient somatic embryogenesis with putrescine. *J. Exp. Bot.*, 48, 1537-1545.

CAPITULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La Cad es una PA no común en las plantas y su presencia en esta especie pudiera estar asociada con la producción de alcaloides que se le atribuye a algunas especies de la familia de las Solanaceas. Se ha reportado la presencia de Cad en plantas de *C. annuum* afectadas por deficiencia de agua cultivadas en condiciones naturales (Sziderics *et al.*, 2010). *Mesembryanthemum crystallinum* ha sido utilizada como planta modelo para estudiar esta PA, la cual se ha relacionado principalmente con condiciones estrés y la presencia de etileno, en esta especie (Shevyakova *et al.*, 2004; Kuznetsov *et al.*, 2002). Los resultados alcanzados en este estudio permiten asegurar que los contenidos de PAs del ES difieren significativamente de los que fueron detectados en el EC de esta especie. De esta manera se evidenció que los contenidos totales de Put, Cad, Spd y Spm superaron notablemente a los registrados en EC, en los que sólo se alcanzó a detectar Put y Cad a niveles extremadamente bajos comparados con el ES. Por otra parte, en los ES se pudo apreciar que los contenidos mostraron variaciones notables en los niveles de cada una de ellas, en dependencia de las condiciones a las que estuvieron sometidos. La Cad en ES cultivados en recipientes SV siempre fue mayor que en recipientes CV y que en etapas tempranas del desarrollo de los embriones (28 días) esta PA estuvo en menor cantidad tanto en recipientes SV como en la Spm, por ejemplo, no fue detectada en estadios tempranos de desarrollo, mientras que en los estadios avanzados estuvo presente, en mayor cantidad en los ES mantenidos en recipientes CV. Estos resultados evidencian además, que los contenidos de las PAs pueden variar durante el desarrollo de los embriones ya los contenidos variaron considerablemente de los 28 a los 42 días de cultivo.

De manera general, las PAs encontradas en ES estuvieron en mucho mayor cantidad en ES que en EC. Esto podría atribuirse a que los ES se mantiene constantemente bajo el estrés que le impone *per se* la condición *in vitro*.

La Cad es una PA que aunque es poco común encontrarla en plantas, ya ha sido detectada en raíz y hojas de plantas de *Capsicum annuum* cultivadas en campo (Sziderics *et al.*, 2010), y en este estudio fue detectada EC de *C. chinense*. Por otro lado, se conoce que la Spd tiene un papel muy importante en la modificación postraducciona del factor de iniciación de traducción eucariota del factor 5A, que implica el reclutamiento y traducción de RNAm (Matto *et al.*, 2010). Estos dos característica podrían estar indicando que los ES de 42 días en recipientes CV

tuvieron una mayor cantidad de Spm unida comparado con los ES en recipientes SV, probablemente provocado por algún estrés que en esta condición pudiera estar estimulando una mayor traducción de proteínas.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

- Los contenidos de PAs en EC y ES difirieron notablemente, siendo Put y Cad las que mayores contenidos mostraron, mientras que la Spd y la Spm sólo fueron detectadas en los ES.
- Fue detectada la presencia de Cad, PA no común en plantas, tanto en EC como en ES, mostrando un contenido significativamente mayor en los ES, particularmente cuando los embriones fueron cultivados en recipientes SV.
- Los niveles de las PAs en los ES de *C. chinense* varían con el avance de su desarrollo, siendo de manera general sus contenidos más bajos o no detectados (Spm) en los estadios tempranos (a los 28 días).
- Los contenidos de PAs difirieron en los dos tipos de condiciones de cultivo (CV y SV) y en los dos tiempos (28 y 42 días) siendo mayores a los 28 días en los recipientes SV, y en los recipientes CV a los 42 días.

4.3 PERSPECTIVAS

El realizar experimentos colocando PAs y/o sus inhibidores así como el colocar bloqueadores de los receptores de etileno y aplicar etileno ayudarían a entender el papel de las PAs y etileno dentro de la ES de *C. chinense*.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kuznetsov V.V., V.Y. Rakitin, N.G. Sodomov, D.V. Dam, L.A. Stetsenko y N.I. Shevyakova (2002) Do polyamines participate in the long-distance translocation of stress signals in plants?. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 120-130.

Matoo A.K., S.C. Minocha, R. Minocha, A.K. Handa (2010) Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino Acids*, 38, 405-413.

Shevyakova N., M. Shorina, V. Rakitin, L. Stetsenko y V. Kuznetsov (2004). Ethylene-induced production of cadaverine is mediated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Doklady Biological Sciences*, 395, 127-129.

Sziderics A.H., M. Oufir, F. Trognitz, D. Kopecky, I. Matusikova, J.F. Hausman, E. Wilhelm (2010) Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annum* L.) during early phase of water deficit. *Plant Cell Rep.*, 29, 295-305.