



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL GÉNERO
Capsicum: VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE
REGENERACIÓN *in vitro* EN *Capsicum annuum***

Tesis que presenta

EMILY ELIZABETH MARÍN COLLÍ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DEL GÉNERO Capsicum: VALIDACIÓN DE UN PROTOCOLO DE REGENERACIÓN in vitro EN Capsicum annuum fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Manuel Martínez Estévez, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 12 de Junio de 2012

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:  _____

Nombre: I.B.Q. Emily Elizabeth Marín Collí

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto Recalcitrancia del género Capsicum: Estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile in vitro (Ciencia básica CONACYT), bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Manuel Martínez Estévez.

AGRADECIMIENTOS

“Todo lo puedo en Cristo que me Fortalece”
(Filipenses 4:13)

A Dios que ha sido mi guía quien me ha dado la oportunidad de llegar hasta aquí y por dame las fuerzas para poder terminar este logro en mi vida.

A mi familia por creer siempre en mí, por su apoyo, paciencia y comprensión, pero sobre todo por ese amor que siempre me han brindado en tantos momentos de mi vida, Gracias, los amo!

A mis amig@s, a esas personitas que gracias a Dios tengo esa dicha y bendición de aun conservar en mi vida, son tantas experiencias que he pasado con cada uno de ellos que de alguna manera influyeron en mi estado de ánimo durante todo este tiempo y que han estado ahí siempre apoyándome en los momentos de alegría y tristeza! Gracias amig@s ¡! Los quiero ¡!

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (Becario: 351533).

A los directores de esta tesis, la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Manuel Martínez Estévez por los consejos y apoyo otorgados.

A los miembros del comité tutorial y revisores de esta tesis: Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dra. Sara Nahuat Dzib, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Javier Mijangos por sus comentarios y recomendaciones.

A la MC Adriana Canto Flick y al Ing. Eduardo Balam Uc por su asesoría técnica.

A los compañeros de Laboratorio que me han acompañado durante mi estancia en el CICY: Eunice Gómez, Stephanie López, Alejandrina Pereira, Guadalupe Herrera, Susana Avilés, Daniela Solís, Carlos Regla, Jericó Bello, Raúl Valle, Carlos Lecona, Mario Manuel Puc e Itzamná Salas.

Y a aquellos que de alguna manera estuvieron conmigo y formaron parte importante durante todo este tiempo y que les agradezco por cada momento, cada experiencia y que gracias a ello he crecido un poco más como persona...

Gracias!

DEDICATORIAS

A mi Familia:

A mis padres: Edilberto Marín y Noemí Collí

y

a mis hermanitos: Carlos y Antonio

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 ESPECIES MÁS IMPORTANTES DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	3
1.2 PRINCIPALES PRODUCTORES DE CHILE EN EL MUNDO.....	3
1.3 IMPORTANCIA DEL CHILE EN LA INDUSTRIA.....	4
1.4 CHILE PIMIENTO (<i>CAPSICUM ANNUUM</i>).....	5
1.4.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL CHILE PIMENTO	7
1.5 CULTIVO DE TEJIDOS	9
1.5.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	10
1.5.2 ESTRATEGIAS PARA LA PROPAGACION <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS.....	11
1.6 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	13
1.6.1 FACTORES QUE REGULAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	14
1.7 CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN <i>CAPSICUM ANNUUM</i>	19
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
JUSTIFICACIÓN.....	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
BIBLIOGRAFÍA.....	24

CAPÍTULO II	29
2.1. INTRODUCCIÓN	29
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES	31
2.2.2 FUENTE DE EXPLANTE	31
2.2.3 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS	31
2.3 ETAPA I: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CHILE PIMIENTO EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN IN VITRO REPORTADOS PARA EL GÉNERO.....	32
2.3.1 PROTOCOLO E1: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN MEDIO LÍQUIDO (AVILÉS-VIÑAS Y SANTANA- BUZZY, 2007)	32
2.3.2 PROTOCOLO E2: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA EN MEDIO SEMISÓLIDO (LÓPEZ - PUC ET AL., 2006)	32
2.3.3 PROTOCOLO E3: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA EN MEDIO LÍQUIDO (ZAPATA- CASTILLO ET AL., 2007)	32
2.4 ETAPA II: EFECTO DE LA PRESENCIA, DISMINUCIÓN Y AUSENCIA DEL 2,4-D DURANTE EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN C. ANNUUM	33
2.5 RESULTADOS.....	35
2.5.1 GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CHILE PIMIENTO (C. ANNUUM).....	35
2.5.2 ETAPA I: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CHILE PIMIENTO EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN IN VITRO REPORTADOS PARA EL GÉNERO	36
2.5.3 ETAPA II: EFECTO DE LA PRESENCIA, AUSENCIA Y DISMINUCIÓN DEL 2,4-D DURANTE EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN C. ANNUUM	42
2.6 DISCUSIÓN.....	48

2.7 BIBLIOGRAFÍA.....	50
CAPÍTULO III	53
3.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	53
3.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	56
3.3 PERSPECTIVAS.....	58
3.4 BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 a), c), d) Variedad de colores, tamaños y formas de <i>Capsicum annum</i> , b) Flor de Chile Pimiento	8
Figura 1.2 Principales métodos de micropropagación (George y Debergh, 2008)	12
Figura 1.3 Proceso de embriogénesis somática indirecta (Pérez-Molphe et al., 1999)....	18
Figura 2.1 Germinación de Chile Pimiento en condiciones in vitro: a) 30 días de edad en cuarto oscuro, b) plántulas después de 15 días transferidas a condiciones de fotoperiodo	35
Figura 2.2 Inducción de la ES a partir de hipocotilos de Chile Pimiento: a) hipocotilos después de 15 días en el medio MS conteniendo 2,4-D (9.05 μ M) en luz continua, b) explante de hipocotilo de 30 días de cultivo con estructuras pro-embriogénicas.....	36
Figura 2.3 Número de embriones somáticos de <i>C. annum</i> evaluando diferentes medios de cultivos in vitro. E1: ES en medio líquido; E2: ES en medio semisólido; E3: ES indirecta en medio líquido a los 45 días de cultivo. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes según d. de Tukey ($p \leq 0.05$).....	37
Figura 2.4 Embriones somáticos en <i>Capsicum annum</i> (Chile Pimiento): a) y b) ES directa en medio líquido a los 15 y 30 días de cultivo respectivamente; c) y d) ES directa en medio semisólido (25 y 45 días de cultivo); e) y f) ES indirecta en medio líquido (25 y 50 días de cultivo).....	39
Figura 2.5 Estadios de ES de <i>Capsicum annum</i> en medio líquido: a) globular, b) corazón, c) Torpedo y d) cotiledonar.....	40
Figura 2.6 Protocolo de ES de Chile Pimiento (<i>C. annum</i>), obtenida a partir del explante de hipocotilo y adaptado del protocolo de ESD de medio líquido usado en <i>C. chinense</i> Jacq. se puede observar una gran biomasa de embriones en diferentes estadios.....	41

Figura 2.7 ES de chile pimiento (<i>C. annuum</i>) obtenida a partir de las modificaciones del 2,4-D (T_0 : 4.05 μ M) en la etapa del desarrollo: a), b) y c) a los 30; d) a los 45 días de cultivo y e) pool de embriones somáticos.....	43
Figura 2.8 ES de chile pimiento (<i>C. annuum</i>) obtenida a partir de las modificaciones del 2,4-D (T_1 : 2.26 μ M) en la etapa del desarrollo a los 30 días de cultivo.	44
Figura 2.9 ES de chile pimiento (<i>C. annuum</i>) obtenida a partir de las modificaciones del 2,4-D en la etapa del desarrollo (T_2 : sin presencia de regulador) a los 30 días de cultivo.	45
Figura 2.10 Efecto del 2,4-D en la etapa de histodiferenciación de la ES en chile pimiento (<i>C. annuum</i>). Cada valor es el promedio de 3 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes según dística de Tukey ($p \leq 0.05$).	46
Figura 2.11 Embriones somáticos germinados de chile pimiento (<i>C. annuum</i>) a) embrión a los 30 días en medio líquido de germinación b) embrión con la raíz desarrollada y formación de pelos radiculares a los 40 de cultivo en medio de germinación.....	47
Figura 3.1 Protocolo de embriogénesis somática directa en chile pimiento (<i>C. annuum</i>)	57

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 *Clasificación taxonómica del chile pimienta (CENTA, 2000)* 7

Cuadro 1.2 *Estudios de embriogénesis somática en C. annuum*..... 20

Cuadro 2.1 *Modificaciones del 2,4-D evaluadas para el protocolo seleccionado para la inducción e histodiferenciación de la ES en chile pimienta (C.annuum)*..... 33

ABREVIATURAS

2.4-D	<i>Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético</i>
ABA	<i>Ácido Abscísico</i>
CTV	<i>Cultivo de Tejidos Vegetales</i>
EC	<i>Embriones Cigóticos</i>
ES	<i>Embriogénesis Somática</i>
ESs	<i>Embriones Somáticos</i>
ESD	<i>Embriogénesis Somática Directa</i>
ESI	<i>Embriogénesis Somática Indirecta</i>
GA ₃	<i>Ácido Giberélico</i>
MS	<i>Murashige y Skoog</i>

RESUMEN

El chile (Capsicum spp.) es un producto agrícola con gran demanda en el mercado, representa un grupo diverso de plantas cuya característica común es la de producir frutos de diversos tamaños, colores, formas, sabores y pungencia, que van desde los llamados chiles dulces o morrones, a los habaneros conocidos como los más picantes. La posibilidad de regenerar plantas a partir de células, tejidos y órganos cultivados in vitro, especialmente a través de la embriogénesis somática (ES), constituye una herramienta de gran utilidad para la propagación y mejoramiento genético de las plantas de interés económico (Zapata et al., 2007). Son pocos los reportes que se han publicado sobre la regeneración de Capsicum annuum a través de la ES, es por ello importante el estudio sobre los factores que intervienen en este proceso para establecer un sistema eficiente de regeneración (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagon, 2001). Los protocolos de ES en C. annuum están limitados para su aplicación por cuatro problemas fundamentales: 1) baja eficiencia de los sistemas de regeneración, 2) baja reproducibilidad de los protocolos; 3) alto índice de embriones deformados y 4) baja tasa de germinación y conversión de los embriones en plantas (o incapacidad de elongación). Para este estudio se estableció un protocolo de ES eficiente para chile pimiento, se evaluó la respuesta en tres protocolos de cultivo in vitro reportados para Capsicum chinense. El protocolo que mejor funcionó para esta especie fue el de ES por vía directa al cual se le modificó la concentración de 2,4-D a 4.05 µM. Bajo estas condiciones se obtuvo un armonioso desarrollo de estos explantes, resolviéndose de esta manera dos de los limitantes del género la eficiencia y la reproducibilidad.

ABSTRACT

Pepper (Capsicum spp.) is an agricultural product with high demand in the market. It represents a diverse group of plants whose common feature is to produce fruits of various sizes, colors, shapes, flavors and pungency, ranging from the so called sweet peppers and the hottest peppers. The ability to regenerate plants from cells, tissues and organs grown in vitro, especially through somatic embryogenesis (SE), is a useful tool for propagation and breeding of plants of economic interest (Zapata et al., 2007). Few reports have been published on the regeneration of Capsicum annum through the ES. We are interested in know the factors involved in this process to establish an efficient system of regeneration (Ochoa-Alejo and Ramírez-Malagon, 2001). Actually, the uses of the SE protocols of C. annum are limited by four fundamental problems: 1) Low efficiency, 2) Low reproducibility, 3) High rate of deformed embryos, and 4) Low germination rate and conversion of embryos into plants (or inability to elongation). For this study we established an efficient protocol of SE for sweet pepper, response was evaluated in three in vitro protocols reported for C. chinense. The protocol worked best for this species was via direct SE which was modified 2, 4-D concentration to 4.05 μ M. Under these conditions yielded a harmonious development of these explants, thus resolving two of the limitations of the genus the efficiency and reproducibility.

INTRODUCCIÓN

El chile (Capsicum spp.) es un producto agrícola con gran demanda en el mercado. Todos los chiles pertenecen al género Capsicum, el cual se encuentra ubicado dentro de la familia de las solanáceas, y están agrupados en alrededor de 30 especies. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área comprendida entre Bolivia y Perú, donde se han encontrado semillas de formas ancestrales que datan de hace más de 7,000 años y desde donde se especula, que este género se diseminó al resto del continente americano (Pickersgill, 1989).

El género Capsicum representa un grupo diverso de plantas cuya característica común es la de producir frutos de diversos tamaños, colores, formas, sabores, pungencia y que van desde los llamados chiles dulces o morrones, a los habaneros conocidos como los más picantes. Los miembros del género Capsicum fueron domesticados desde hace 7,000 años y han llegado a ser las especies más consumidas a nivel mundial. Los frutos de Capsicum se han convertido en ingredientes esenciales de la dieta, así como fuente directa de saborizantes, colorantes, agentes farmacológicos y otros productos de interés industrial (Zapata-Castillo, 2005).

La posibilidad de regenerar plantas a partir de células, tejidos y órganos cultivados in vitro, especialmente a través de la embriogénesis somática, constituye una herramienta de gran utilidad para la propagación y mejoramiento genético de las plantas de interés económico.

Los protocolos de regeneración de C. annum, particularmente por embriogénesis somática, que se han reportado a la fecha, están limitados para su aplicación por cuatro problemas fundamentales: 1) baja eficiencia de los sistemas de regeneración, 2) baja reproducibilidad de los protocolos; 3) alto índice de embriones deformados, y 4) baja tasa de germinación y conversión de los embriones a plantas (o incapacidad de elongación). En chile habanero (C. chinense) se han desarrollado protocolos en los que se ha logrado superar la baja eficiencia y la baja reproducibilidad que caracteriza los protocolos reportados anteriormente para el género Capsicum. La inducción se ha podido realizar tanto directa como indirectamente, en medio sólido y en medio líquido.

INTRODUCCIÓN

Tomando en cuenta la recalcitrancia del género Capsicum a la regeneración de plantas in vitro y conociendo los avances que existen en C. chinense, nos planteamos establecer un protocolo de embriogénesis somática en C. annum (chile pimiento).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 ESPECIES MÁS IMPORTANTES DEL GÉNERO *Capsicum*

Todos los chiles pertenecen al género Capsicum. Los estudios taxonómicos coinciden en que son cinco las especies domesticadas: Capsicum baccatum, C. chinense, C. pubescens, C. frutescens y C. annum, de las cuales ésta última es la más importante. Capsicum annum agrupa la mayor diversidad de chiles, ya sean cultivados o silvestres; entre los más populares destacan el guajillo o mirasol, el piquín, el de árbol, el serrano, el jalapeño, el poblano y el chilaca, de los cuales los tres últimos, una vez secos, se denominan como chipotle, ancho o mulato y pasilla, respectivamente.

El cultivo de C. annum se adapta a los diversos climas y tipos de suelo del país, en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 2500 m de altitud. El chile habanero (C. chinense) y el manzano (C. pubescens) se cree que son originarios de Sudamérica, pero en nuestro país son ampliamente conocidos, especialmente en las regiones donde se cultivan como Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco. El manzano, también conocido como ciruelo o perón, sólo prospera en lugares altos que superen los 2000 metros sobre el nivel del mar como en la Sierra de Puebla, las partes altas de Veracruz, en Chiapas y en algunas zonas de Michoacán (Ramírez-Malagon y Ochoa-Alejos, 1996).

1.2 PRINCIPALES PRODUCTORES DE CHILE EN EL MUNDO

La producción de chile a escala mundial se localiza principalmente en China, México, Turquía, España, Estados Unidos, Nigeria e Indonesia. En los últimos 10 años, esa producción se ha incrementado gradualmente a una tasa de crecimiento anual promedio de 6.26%. México es el país con la mayor diversidad genética del género Capsicum, pero cabe destacar que con la cantidad de tierra destinada para este cultivo no es el productor más importante, ya que este cultivo se ve afectado por malezas, plagas y enfermedades las cuales alteran su rendimiento y provocan fuertes daños económicos. Además, en México los costos de producción así como el precio del producto son muy altos y hacen que éste no pueda competir con el de los Estados Unidos y el de otros países que ofrecen menores precios.

Por otra parte, desde el punto de vista comercial, las variedades mejoradas, tienen varias ventajas dado que las plantas fructifican mucho más debido a que pueden ser resistentes a enfermedades causadas por hongos o virus. Los frutos son más uniformes en cuanto a forma, peso, tamaño, color, etc., haciéndolos más atractivos para el mercado.

*Se ha planteado que la sustitución de los cultivos de variedades criollas por las mejoradas implica el riesgo de perder la riqueza de germoplasma mexicano de la especie, es decir, se incrementa el riesgo de que desaparezca la diversidad genética de una o muchas variedades si éstas dejan de cultivarse (Pozo-Compodónico et al., 1991). Por lo tanto, es conveniente llevar a cabo programas de conservación del germoplasma de Chile, así como colectas sistematizadas de tipos y variedades de *Capsicum* que aún se encuentran sin caracterizar en el país.*

1.3 IMPORTANCIA DEL CHILE EN LA INDUSTRIA

Por su color, sabor y aroma el Chile se ha convertido en un condimento popular en muchas partes del mundo. En México el consumo de este fruto representa una tradición cultural debido a su gran cantidad, amplia variedad y sabor picante. La pungencia de este fruto es causada por siete alcaloides o capsaicinoides, siendo la capsaicina y la dihidrocapsaicina las responsables del 90% del sabor pungente (Contreras y Yahia, 1998).

El fruto recibe múltiples aplicaciones, las cuales comprenden desde su utilización como condimentos en los alimentos hasta aplicaciones medicinales, pasando por la obtención de materia prima con fines artesanales e industriales (Long-Solís, 1998).

*Este fruto se utiliza en la industria farmacéutica por su alto contenido de capsaicina, la cual ayuda a inhibir dolores musculares así como el crecimiento de tumores cancerosos (González-Salán, 2004). Externamente se usa como revulsivo en pomadas y linimentos contra los dolores reumáticos y las neuralgias, por vía oral se usa el jugo o tintura del fruto contra las hemorroides; en este caso puede ser preparado en vinagre como condimento de comidas; también se recomienda la tintura de los diversos frutos de *Capsicum* en la gota, en los reumatismos y en las bronquitis (Zapata-Castillo, 2005).*

CAPÍTULO I

En el campo de la defensa personal se ha generado una serie de aerosoles de tipo defensivo, cuyos efectos irritantes se deben a productos orgánicos como la pimienta de cayena, pimienta roja u otros picantes similares. Estos compuestos orgánicos no cuentan con sustancias tóxicas para el organismo humano ya que incluso hasta su eventual ingesta no presenta peligrosidad para la salud, generando tan sólo efectos irritantes (Pollak y Saukko, 2000).

Los síntomas de ceguera, sofoco y náusea causados por el contacto de estos productos orgánicos desaparecen al cabo de 30 minutos sin causar efectos secundarios. Por esta razón, los aerosoles que contienen pungentes orgánicos (y no químicos) son el material de uso permitido.

El chile se consume generalmente fresco, en condimento o seco. Los chiles ancho, mulato, mirasol y pasilla, se secan para destinarse a la industria artesanal del mole. También, estos chiles se usan para extraer el pigmento rojo que se emplea para colorear embutidos como chorizo y salami. En la industria avícola los chiles se utiliza para preparar mezclas de alimentos balanceados. Además, son ampliamente utilizado en la industria dedicada a la producción de cosméticos (Zapata-Castillo, 2005).

1.4 CHILE PIMIENTO (*Capsicum annuum*)

*El pimiento pertenece a la familia de las solanáceas (Solanaceae) y es la principal variedad cultivada del género *Capsicum*, el cual tuvo su origen en el continente americano, probablemente en el sur de Brasil, pero la especie *Capsicum annuum* fue domesticada en México pues fue cultivada extensamente desde la época precolombina. Durante los siglos XV y XVI fue llevada a Europa, África y Asia por los colonizadores españoles y portugueses. Actualmente *Capsicum annuum* se cultiva en la mayoría de los países tropicales y subtropicales del mundo (Carrillo, 2007). La mayoría de sus frutos se consumen en fresco, cocido o como un condimento o "especia" en comida típica de diversos países, además de que existe una gran gama de productos industriales que se usan en la alimentación humana: congelado, deshidratados, encurtidos, enlatados, pastas y salsas. También hay que mencionar su función decorativa ya que en algunas ocasiones por su gran variedad de colores pueden ser utilizados como plantas ornamentales.*

Las condiciones óptimas de su cultivo son de 20 a 25°C, ya que a temperaturas mayores puede disminuir la producción de sus frutos y aumentar la caída de sus flores. Entre algunas de sus enfermedades causadas por diversos hongos, bacterias y virus podemos mencionar la alternariosis (podredumbre interna de los frutos), antracnosis (manchas circulares en los frutos), tristeza o seca de pimiento, marchitez bacteriana (pseudomonas) y el mosaico (Orellana, 2000)

En cuanto a sus propiedades nutritivas su principal componente es el agua, seguido de los hidratos de carbono, lo que hace que sea una hortaliza con un bajo aporte calórico. Es una buena fuente de fibra y, al igual que el resto de las verduras, su contenido proteico es muy bajo y apenas aporta grasas. En cuanto al contenido en vitaminas, los pimientos son muy ricos en vitamina C, particularmente los de color rojo. De hecho, llegan a contener más del doble de la que se encuentra en frutas como la naranja o las fresas (CENTA, 2000)

*En la Península de Yucatán hay una gran diversidad inter e intraespecífica de tipos de chile que se diferencian por su forma y tamaño, color, sabor y picante. Esta riqueza genética de chiles regionales se debe en gran parte a la diversidad de factores edáficos y climáticos, y a la persistencia de los sistemas tradicionales de cultivo. Los campesinos han manejado sus semillas de chile durante cientos de años en coevolución con una gran diversidad de patotipos de enfermedades y plagas. Bajo el sistema tradicional los agricultores han adquirido un amplio conocimiento local, producto de la estrecha convivencia que han mantenido, a través de los años, con los ambientes en los que viven y trabajan. Aunque el chile pimiento no es considerado un cultivar específico de la región su consumo tiene una gran demanda por lo cual es importante su estudio para su conservación y mejoramiento biotecnológico. En la región existen otras especies pertenecientes al género *C. annum* en las que se pueden mencionar: **yaaxic**, **xcat'ic**, **pico paloma**, **cha'huá**, **sucurrey maax**, (*C. annum* var. *aviculare*), los cuales son de gran importancia junto al chile habanero (*C. chinense* Jacq.) (Latoumerie et al., 2001).*

1.4.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL CHILE PIMENTO

El chile pimiento (Cuadro 1.1), es una planta herbácea, de hábito perenne en condiciones naturales, pero cultivada como anual en la mayoría de los casos, debido a su susceptibilidad a heladas y a daño por enfriamiento. Las plantas tienen hábito arbustivo y alcanzan los 75 cm de altura. El tallo presenta ramificación dicotómica y sobre las ramas se disponen hojas de tamaño medio, enteras, de forma oval-oblonga, glabras y de color verde intenso. Las flores son perfectas y se presentan solitarias en las axilas de las ramificaciones; son de tamaño pequeño (1 cm), con cáliz dentado, cinco pétalos de color blanco y anteras amarillenta-azules o púrpuras. El fruto de la especie es una baya con dos o cuatro lóbulos con una cavidad entre la placenta y la pared del fruto, siendo esta la parte aprovechable de la planta, tiene forma globosa, rectangular, cónica o redonda y tamaño variable, su color es verde al principio y luego cambia con la madurez a amarillo o rojo púrpura en algunas ocasiones (Figura 1.1). La constitución anatómica del fruto está representada básicamente por el pericarpio y la semilla. El peso del fruto fluctúa entre unos pocos gramos hasta medio kilo. Se consumen verdes, muy apreciados por su sabor característico (CENTA, 2000)



Reino	Plantae
División	Embriophyta Asiphonograma
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Polemoniales
Familia	Solanácea
Género	Capsicum
Especie	C. annum L.

Cuadro 1. 1 Clasificación taxonómica del chile Pimiento (CENTA, 2000)



Figura 1.1 a), c), d) Variedad de colores, tamaños y formas de *Capsicum annuum*, b) Flor de Chile Pimiento

1.5 CULTIVO DE TEJIDOS

Se le llama cultivo de tejidos vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de la planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez-Molphe et al., 1999). La regeneración de plantas *in vitro*, es posible gracias a uno de los atributos más importantes de las células vegetales: la totipotencia celular que se define como la capacidad que tiene cualquier célula para dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo dado, así como la reproducción completa del organismo (Lackie y Dow, 1989). Bajo condiciones de laboratorio es posible observar la expresión de la totipotencia a partir de una sola célula, ya que la capacidad de producción de embriones no está restringida al desarrollo del cigoto (Dodds y Roberts 1985; Goldberg et al., 1994). Este proceso se conoce como embriogénesis somática y los casos en que puede presentarse de forma natural en algunas plantas se le conoce como apomixis (George, 1983). Sin embargo también se puede inducir la formación de embriones somáticos a través del cultivo de tejidos vegetales (Goldberg et al., 1994; Pérez-Molphe et al., 1999). Con el cultivo *in vitro* de órganos o tejidos se provoca la reanudación de la mitosis, se favorece la dediferenciación celular que permite la expresión de potencialidades normalmente reprimidas (Margara, 1988). La capacidad de ciertos tejidos vegetales (callo), órganos (flores y raíces) y embriones de crecer de manera más o menos indefinida, se ha utilizado durante muchas décadas en los laboratorios científicos como un instrumento de investigación por genetistas, botánicos y fitopatólogos. A estos métodos se les ha llamado cultivo de tejidos, una expresión que en ocasiones se usa como sinónimo de micro-propagación (Hartmann, et al., 1995).

1.5.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DE CULTIVO *in vitro*

El CTV se basa en tres principios básicos, de cuya comprensión y manipulación depende del éxito o fracaso de cualquier trabajo en este campo. Los principios básicos, de acuerdo a Pérez-Molphe et al., 1999, son los siguientes:

a) Elección del explante

Se llama explante al órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que va ser utilizado para iniciar el cultivo. Este puede ser una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores, entre ellos. En teoría cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el tipo de explante que se elija será determinante para la obtención de la respuesta deseada, ya que cada uno de ellos responderá o se comportará de manera diferente al cultivo.

b) Elección del medio y condiciones de cultivo

El medio de cultivo consiste en dos grupos de componentes. Los primeros son los esenciales, es decir aquellos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del tejidos cultivado. Este grupo incluyen a los nutrientes minerales, la fuente de carbono y algunas vitaminas. El segundo grupo de compuestos son los llamados opcionales, que si bien en ocasiones no son indispensables para mantener la vida del tejido, a este grupo pertenecen las fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal. Además de la formulación del medio, es importante considerar las condiciones físicas del cultivo (luz, fotoperiodo, temperatura y humedad), ya que éstas contribuyen a la respuesta del explante.

c) Condiciones asépticas

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos, etc.), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar la contaminación con microorganismos en un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos, también de igual manera en su incubación y manipulación. La respuesta de un tejido al cultivo *in vitro* depende de la interacción entre el explante, el medio y las condiciones de cultivo. Esta respuesta se puede dar como organogénesis (formación de órganos adventicios como raíces y brotes), embriogénesis somática (formación de embriones a partir de células somáticas), formación de tejido calloso o simplemente desarrollo del tejido.

1.5.2 ESTRATEGIAS PARA LA PROPAGACION *in vitro* DE PLANTAS

La regeneración de plantas *in vitro* según Krikorian (1993) puede ser inducida por diferentes vías (Figuras 1.2):

- *Multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio en este caso puede estar en los meristemos, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos o los brotes de las yemas en raíces.*
- *Organogénesis directa. En este caso, la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explante, o en alguna parte escindida de la planta.*
- *Organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en este caso en el callo; es obvio que el callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta.*
- *Embriogénesis somática directa. Los embriones se forman directamente en el explante primario*
- *Embriogénesis somática indirecta. Los embriones se forman a partir de un callo embriogénico.*

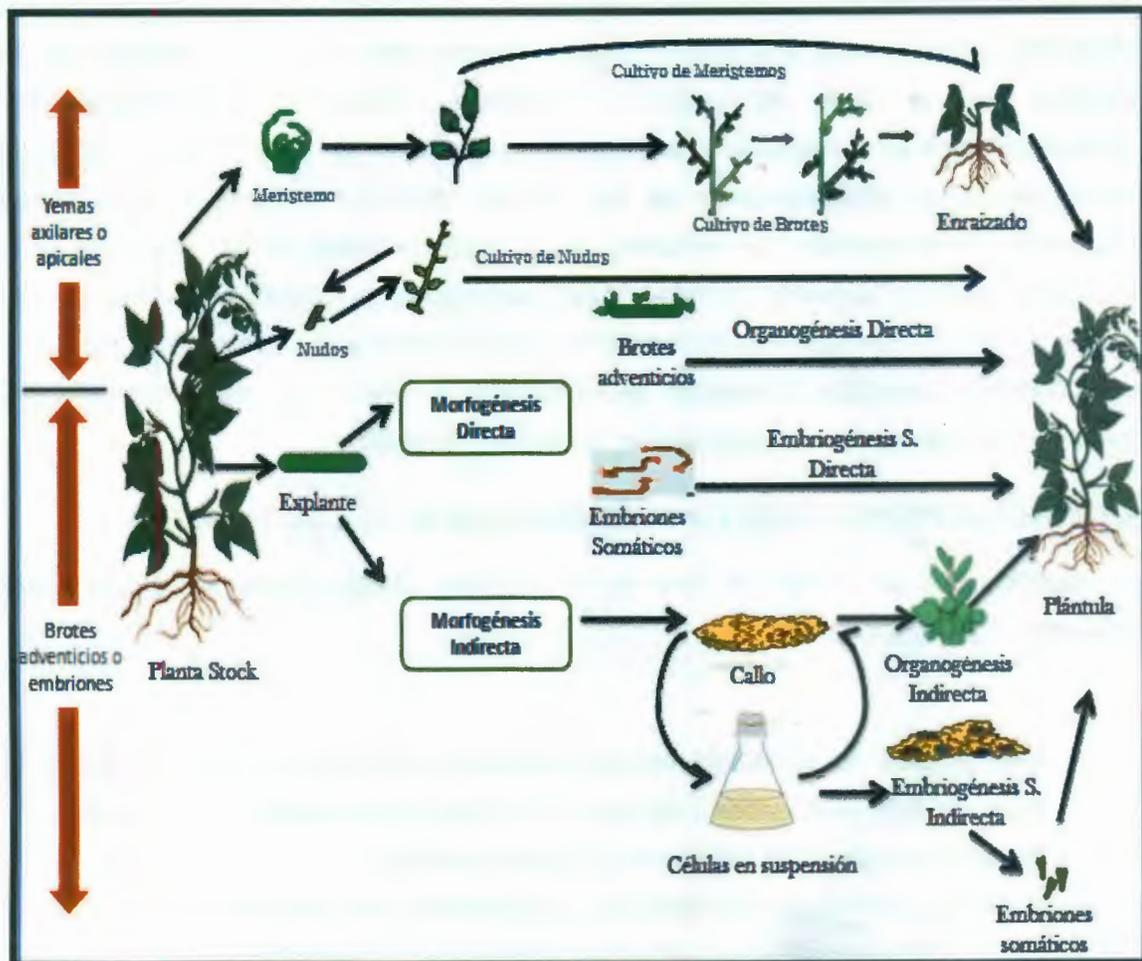


Figura 1. 2 Principales métodos de micropropagación (George y Debergh, 2008)

1.6 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

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

*Hacia 1960, Reinert y Stuart lograron por primera vez la diferenciación de embriones somáticos sobre callos y cultivos en suspensión de *Daucus carota*. Ellos encontraron que el desarrollo in vitro de estas estructuras presentaba grandes semejanzas con la embriogénesis cigótica, interpretando que en este caso la expresión de la totipotencialidad celular resultaba del aislamiento espacial y fisiológico de una célula o grupo de células. La ES es un sistema ideal para investigar los procesos completos de diferenciación de plantas, así como los mecanismos de expresión de totipotencia en células vegetales. Tiene muchas ventajas comparada con la embriogénesis cigótica; por ejemplo, a) el proceso de embriogénesis es fácilmente monitoreado, b) el ambiente del embrión puede ser controlado, c) un gran número de embriones puede ser fácilmente obtenido (Avilés-Viñas y Santana-Buzzy, 2007).*

En los estudios de la ES se sigue utilizando la zanahoria como un sistema modelo no solamente para estudios sobre el control del desarrollo, sino que también para determinar los eventos bioquímicos que controlan la morfogénesis.

Como embriones somáticos asexuales o adventicios se han definido los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat et al., 1979). Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares deben ser también capaces de crecer y formar plantas normales (Roca y Mroginski, 1991).

En pocas palabras podemos definir la ES como el proceso por el cual las células somáticas forman estructuras bipolares y sin conexión vascular al tejido materno, pasando por una serie de etapas características a la embriogénesis cigótica, pero sin que ocurran fusión de gametos (William y Maheswaran, 1996).

La ES *in vitro*, puede ocurrir por dos vías: directa (ESD) e indirecta (ESI); en la ESD los embriones se originan directamente de las células del explante, mientras que en la ESI, en una primera etapa del cultivo, se forma un callo. Si este callo es transferido a un medio de cultivo líquido, donde es desagregado, se forma una suspensión celular a partir de la cual son inducidas las células a formar los embriones somáticos. Este es un proceso mucho más complejo que la ESD. La ESD se da cuando las células del explante original están predeterminadas a formar embriones somáticos, por lo que sólo se requiere proporcionar al tejido las condiciones adecuadas para la inducción y diferenciación de los embriones somáticos. En la ESI, el explante original no tiene células proembriogénicas, por lo que se requiere primero darle al tejido, las condiciones para que ocurra la inducción y luego cambiarlo a otras que sean propicias para la diferenciación de los embriones. Las células de tejidos muy jóvenes, como por ejemplo los embriones cigóticos inmaduros; son ya en una buena proporción células proembriogénicas, o si no, son fácilmente inducibles para que lo sean. Por el contrario, las células más diferenciadas o de tejidos adultos muy difícilmente o casi nunca se llegan a convertir en proembriogénicas. Esto explica por qué la ES resulta sencilla en algunos tejidos y prácticamente imposible en otros (Pérez-Molphe et al., 1999).

1.6.1 FACTORES QUE REGULAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las fases fundamentales de la ES son la inducción, histodiferenciación, maduración, germinación y conversión del embrión (Figura 1.3). Cada una de estas fases es regulada por diversos factores (Pérez-Molphe et al., 1999).

Inducción

Durante la inducción, las células somáticas adquieren características embriogénicas mediante una completa reorganización del estado celular, incluyendo cambios fisiológicos, metabólicos y moleculares (Fehér et al., 2003). Lo anterior está basado en la teoría de la totipotencialidad (Jiménez, 2001). Según Pérez-Molphe et al. (1999) la inducción es el proceso de conversión de una célula somática a una célula proembriogénica y ellos consideran que los factores determinantes para que suceda el proceso de inducción son:

1. Genotipo. Se sabe que diferentes genotipos aún de una misma especie muestran diferencias notables en la capacidad para activar elementos claves que se requieren para iniciar el proceso de embriogénesis somática. Lo anterior hace que ciertos genotipos seas más propensos a la embriogénesis somática, mientras que en otros esta vía de regeneración es prácticamente imposible.

2. Grado de diferenciación de las células de explante. El tipo de explante es un factor importante que determina la capacidad embriogénica del cultivo. La ES se ha inducido en diferentes tipos de explantes, de los cuales podemos mencionar: el pecíolo, la hoja, el hipocotilo, la raíz, el brote meristemático, la semilla, el cotiledón y el embrión cigótico maduro o inmaduro (López-Puc, 2008). La ES es mucho más factible en tejidos jóvenes muy pocos diferenciados, y prácticamente imposible en tejidos maduros completamente diferenciados (Pérez-Molphe et al., 1999).

3. Auxinas. La presencia de auxinas es un factor determinante para que ocurra el fenómeno de inducción. Se sabe que la presencia de este tipo de regulador del crecimiento estimula entre otras cosas la metilación del ADN lo cual puede favorecer el cambio del patrón de expresión genética que se requiere para que ocurra la inducción (Pérez-Molphe et al., 1999).

Se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico, usualmente se emplea el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la ES en el callo. Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de 2,4-D (Halperin et al., 1965); en consecuencia hay que remover la auxina, o usarla en concentraciones muy bajas. Tanto la inducción de la ES como el desarrollo de los estados subsiguientes de los embriones dependen de la presencia de nitrógeno reducido.

4. Aislamiento celular. Se sabe que el aislamiento de una célula o de un grupo de células con respecto al resto del tejido estimula también la inducción o conversión de una célula somática en proembriogénica. Este aislamiento ocurre cuando hay necrosis en el tejido adyacente o bien cuando se aplican tratamientos físicos para separar las células (Pérez-Molphe et al., 1999).

Histodiferenciación

Al proceso de formación de órganos que ocurre cuando los embriones globulares se desarrollan hasta alcanzar la etapa cotiledonar, se le da el nombre de histodiferenciación (Thorpe, 1995). En esta etapa las masas de células proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante una división y diferenciación celular simultáneas. Para que estas células cesen su multiplicación y pasen a una fase de diferenciación se requiere la eliminación de las auxinas exógenas. Una de los fenómenos iniciales en esta etapa es el establecimiento de una polaridad en las masas de células proembriogénicas. Esta polaridad se mantendrá durante todo el desarrollo del embrión (Pérez-Molphe et al., 1999).

Hay casos en los que los embriones pueden continuar su desarrollo en el mismo medio de inducción (Conger et al., 1989); sin embargo, los embriones somáticos obtenidos así tienen poca calidad (López-Puc, 2008).

Durante la etapa de histodiferenciación, los embriones somáticos pasan por una serie de estadios intermedios muy similares a los que ocurren en la embriogénesis cigótica. En las dicotiledóneas estos estadios son: globular, de corazón y de torpedo, mientras que en las monocotiledóneas son: globular, coleoptilar y escutelar (Pérez-Molphe et al., 1999).

Maduración

La maduración se caracteriza por la deposición de sustancias de almacenamiento, represión de la germinación y adquisición de tolerancia a la desecación (Thorpe, 1995). Sin embargo, hay especies en las que los embriones somáticos no se desarrollan normalmente. En algunos casos germinan, pero no se convierten en plántulas normales (López-Puc, 2008). El desarrollo del embrión y la maduración pueden en ciertos casos interrumpirse por la germinación precoz, lo que provoca que las plántulas no se desarrollen normalmente (Jiménez, 2005).

Normalmente un embrión somático en estadio torpedo aún no tiene la capacidad de germinar. Para que adquiera esta capacidad se requiere una fase de maduración durante la cual ocurre básicamente una elongación celular ya sin división. Para la mayoría de las especies se sabe que los estímulos que hacen posibles la maduración son el ácido

CAPÍTULO I

abscísico (ABA) y la desecación (Pérez –Molphe et al., 1999). Una de las estrategias para superar estos problemas ha sido el uso de reguladores de crecimiento vegetales, que permitan a los embriones somáticos alcanzar fases avanzadas de desarrollo, similares a las observadas en embriones cigóticos. Entre estos reguladores de crecimiento se encuentra el ABA, el cual se aplica en el medio de cultivo durante las fases finales para prevenir la germinación precoz. Esto ayuda a tolerar la desecación y mejorar la calidad de los embriones germinados (Mauri y Manzanera, 2004).

Germinación

La germinación es el proceso fisiológico que puede definirse como los cambios metabólicos que empiezan con la hidratación de la semilla y terminan cuando la radícula se alarga y emerge de la cubierta seminal (Rojas-Aréchiga et al., 1997). Esta definición no se puede aplicar a embriones somáticos, ya que éstos no poseen cubierta seminal, por lo que quizás, la definición de germinación más apropiada en embriones somáticos sería, la emisión de radícula (López-Puc, 2008). Para que eso suceda se requiere estímulos como la luz, el ácido giberélico (GA_3) o las citocininas. Los embriones somáticos carecen de tejidos de reservas por lo que la germinación solo ocurre *in vitro* en donde el medio de cultivo aporta los nutrientes, o bien, cuando se les proporcionan depósitos artificiales de nutrientes (semillas artificiales) (Pérez-Molphe et al., 1999). La ES se ha conseguido con éxito en un menor número de especies que la organogénesis, debido a que es un fenómeno en apariencia más complicado. Sin embargo, cuando ésta es posible, su productividad en cuanto al número de plantas que se puede generar es mayor. Por otro lado, la ES sirve como base para la producción de semillas artificiales, que no son más que embriones somáticos encapsulados en una matriz que contienen nutrientes que hace las veces de tejido de reserva, y en algunos casos inhibidores como el ABA que detiene la germinación prematura. Para el montaje de un sistema de embriogénesis somática, las variables principales a manejar son el tipo de explante, y el tipo y concentración de auxinas a utilizar para la inducción del tejido proembriogénico. Los explantes más utilizados suelen ser embriones sexuales con diferentes estadios de maduración, y en menor medida, cualquier tejido somático de la planta (Pérez-Molphe et al., 1999).

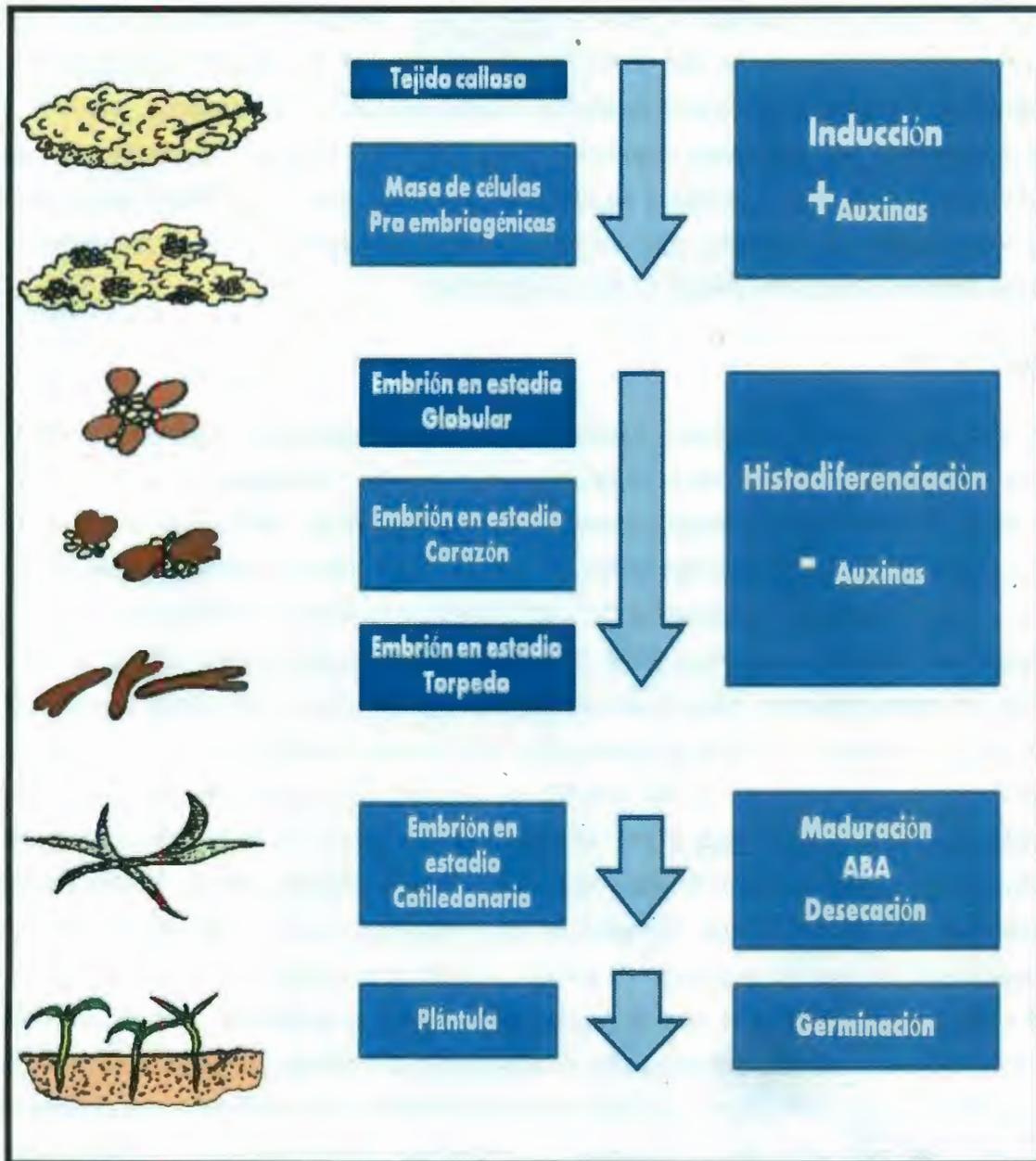


Figura 1.3 Proceso de embriogénesis somática indirecta (Pérez-Molphe et al., 1999)

1.7 CULTIVO IN VITRO EN *Capsicum annuum*

La morfogénesis *in vitro* constituye un proceso básico para desarrollar trabajos de mejoramiento y propagación de plantas por métodos biotecnológicos. La posibilidad de regenerar plantas a partir de células, tejidos y órganos cultivados *in vitro*, especialmente a través de la ES, constituye una herramienta de gran utilidad para la propagación y el mejoramiento genético de las plantas de interés económico. No obstante, numerosos reportes muestran que la regeneración *in vitro* de algunas especies es difícil de lograr. Este es el caso del género *Capsicum* el cual se ha establecido en condiciones *in vitro* pero su regeneración bajo estas condiciones es difícil y cuando ocurre es poco eficiente (Zapata-Castillo, 2005).

Dentro de los estudios que se han hecho en la regeneración de plantas *in vitro* de diferentes tipos de chiles (*Capsicum* spp.) ha sido obtenida bajo diferentes protocolos por diferentes autores (Fari y Czako, 1981; Phillips y Hustenberger, 1985; Ezura et al., 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996, Binzel et al., 1996), directa o indirectamente a partir de células y tejidos de chile (Gunay y Rao, 1978; Agrawal y Chandra, 1983; Arroyo y Revilla, 1991; Valera y Alejo, 1992). Los resultados reportados evidencian que la eficiencia en la obtención de plantas, aún resulta baja para este género. La obtención de embriones somáticos, directa e indirectamente, tanto en medio sólido como en líquido, ha sido reportada por Harini y Sita (1993), Buyukalaca y Mavituna (1996) y Binzel et al. (1996a). Todos estos protocolos han sido desarrollados en cultivares pertenecientes a la especie *C. annuum* (cuadro 1.2).

Dentro de esta especie se han reportado trabajos sobre la embriogénesis somática *in vitro* del chile habanero, reportado por López-Puc et al. (2006), Zapata-Castillo et al. (2007) y Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007), quienes han establecido protocolos para la inducción y proliferación de embriones somáticos en medio semisólido y líquido en esta especie, por diferentes vías (directa e indirectamente), los cuales se caracterizan por la alta reproducibilidad y alta eficiencia en cuanto a los embriones somáticos formados; sin embargo estos mismos protocolos aun siguen con la problemática de altos índices de embriones deformados y el bajo índice de conversión.

Cuadro 1. 2 Estudios de embriogénesis somática en *C. annuum*

<u>AUTOR</u>	<u>EXPLANTE</u>	<u>RUTA</u>	<u>RCV</u>	<u>RESULTADO</u>
Harini <i>et al.</i> , 1993	Embrión cigótico	ESD	2,4-D	6-10 ESs/ explantes
Binzel <i>et al.</i> , 1996	Embrión cigótico	ESD	2,4-D	5-6 ESs/ explantes
Buyukalaca <i>et al.</i> , 1996	Embrión cigótico	ESI	2,4-D	74 Ess/ml de medio líquido
Mavituna <i>et al.</i> , 1996	Embrión cigótico	ESI	2,4-D	57 Ess/ml
Kintzios <i>et al.</i> , 2001	Hoja	ESI	2,4-D, BAP	72 ES globulares/ explantes
Steinitz <i>et al.</i> , 2003	Embrión cigótico	ESD	Centrofenoxina, Quinclorac, 2,4-D	6 ESs/ explantes
Khan <i>et al.</i> , 2006	Tallo y brotes	ESD	TDZ	16-22 ESs/ explantes

OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo de regeneración por embriogénesis somática para la especie C. annum (chile pimienta), reconocida como recalcitrante a la morfogénesis in vitro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✿ *Evaluar la respuesta de chile pimienta en diferentes protocolos de regeneración in vitro reportados para el género.*
- ✿ *Establecer un protocolo para inducción y desarrollo de la embriogénesis somática en chile pimienta (C. annum).*

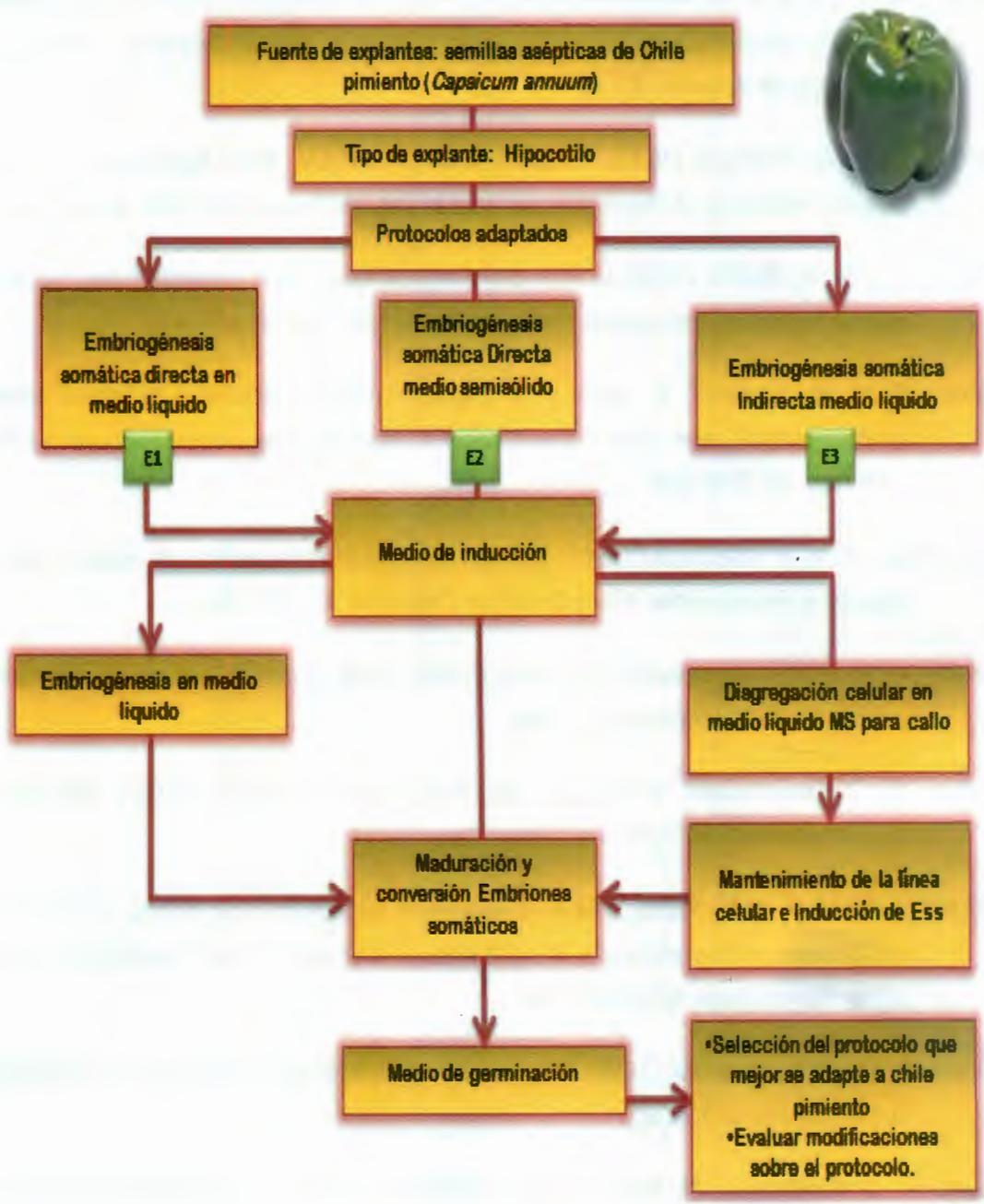
JUSTIFICACIÓN

Capsicum es considerado como un género recalcitrante a la morfogénesis *in vitro*. Aunque son pocos los reportes de morfogénesis *in vitro*, hasta fechas recientes solo se han logrado la inducción de brotes y la ES en la especie *C. annum* (Agrawal y Chandra, 1983; Ochoa-Alejos e Ireato, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996; Binzel et al., 1996; Hanini y Lakshmi, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Steintz et al., 2003). Sin embargo, estos protocolos de ES de *Capsicum*, muestran bajas eficiencia, baja reproducibilidad, baja capacidad de germinación y alto índice de embriones deformados, mientras que los brotes adquieren forma de rosetas y no alcanzan a alongarse después de formados. En Chile habanero (*C. chinense*) se han desarrollado protocolos en los que se ha logrado superar la baja eficiencia y la baja reproducibilidad que caracteriza los protocolos reportados anteriormente para el género *Capsicum*.

Es por ello que usando como base protocolos de Chile habanero estos se evaluarán en nuestro modelo de estudio (Chile pimienta), una vez evaluado y seleccionado el protocolo al cual se ajuste nuestro modelo se procederá a disminuir la concentración del 2,4-D en la etapa de desarrollo, ya que ésta se ha observado que dependiendo de la concentración puede tener un efecto dual en los cultivos, actuando como auxina o como agente estresante (López-Puc, 2008). Debido a ello, se sugiere que este compuesto podría estar participando en el problema de recalcitrancia de la especie, específicamente en la etapa de conversión de embrión a plántulas.

Por la importancia del género y por los beneficios que reporta contar con un protocolo de ES para la especie *C. annum* que sea predecible para regenerar embriones somáticos, este proyecto es de suma importancia y validez. Además, contar con protocolos eficientes para la especie *C. chinense* Jacq., podría ser una alternativa que contribuya al mejoramiento de protocolos ya reportados en este género.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BIBLIOGRAFÍA

- Avilés-Viñas, S.A. y N. Santana-Buzzy (2007). *Papel del Etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (Capsicum chinense Jacq.)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 65 pp.
- 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 (1990). *In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars*. *Plant Cell Rep.* 10: 414-416.
- Binzel, M. L., N. Sankhla, S. Joshi y D. Sankhla (1996). *Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (Capsicum annuum L.)*. *Plant Cell Rep.* 15: 536-540.
- Buyukalaca, S. y F. Mavituna (1996). *Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.
- Carrillo, A. M. (2007). *Agrocadena Regional Cultivo: Chile Dulce*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Grecia Alajuela. 76pp.
- Conger, B., J. Hovenesain, R. Trigiano y D. Gray (1989). *Somatic embryo ontogeny in suspension cultures of orchardgrass*. *Crop Sci.* 29
- Contreras, P. M. y M.E. Yahia (1998). *Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile pepper and relation with peroxidase activity*. *J. Ag. Food Chem.* 46:2075-2078.
- Dodds, J. H. y R.W. Roberts (1985). *Experiments in plant tissue culture*. Ed. Cambridge University Press. 232 pp.
- Ezura, H., S. Nishimiyay M. Kasumi (1993). *Efficient regeneration of plants independent of exogenous growth regulators in bell pepper (Capsicum annuum L.)*. *Plant Cell Rep.* 12: 676-680.

CAPÍTULO I

- Fari, M. y M. Czako (1981). *Relationships between position and morphogenetic response of pepper hypocotyls explant culture in vitro*. *Sci. Hort.* 15: 207-213.
- Fehér, A., P. Taras y D. Dudits (2003). *Transition of somatic plant cells to an embryogenic state*. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 74(3), 201-228.
- George, E. (1983). *Plant Propagation by tissue culture*. Ed. Exegetics. Part 1. 574 pp.
- 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.
- Goldberg, R.B., G. De Pavia y R. Yadegari (1994), *Plant embryogenesis: Zygote to seed*. *Science* 266,605-614.
- González-Salán, M. R. (2004). *El género capsicum al servicio de la sociedad guatemalteca, Simposio y Seminario Taller sobre el Género Capsicum: Chile*. FACYT 01-2004.
- Gunay, A. L. y P.S. Rao (1978). *In vitro plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of red pepper (Capsicum)*. *Plant Sci. Lett.* 11: 365-372.
- Halperin, W. and D.F. Wetherell (1965). *Ammonium requirements for embryogenesis in vitro*, *Nature*, 205:519-520.
- Harini, I. y G. Sita (1993). *Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (Capsicum annum L.)*. *PlantSci.* 89: 107-112.
- Hartmann, H. y D. Kester, D. (1995). *Propagación de plantas*. México D.F. compañía editorial Continental. 760 pp.
- Jiménez, V. (2001). *Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormone*. *R. Bras. Fisiol. Veg.* 13: 196 – 223.
- Krikorian, A.D., M. W. Roca .y L. A. Mroginski (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) L.A. (eds.) Cali, Colombia. P xii, 970 pp.

-
- Lackie, J.M. y J. A. T. Dow. (1989). *The dictionary of cell biology*. Ed. Academic Press. 399 pp.
- Latoumerie, L., J.L. Chávez, M. Pérez, C.F. Hernández, R. Martínez, L. M. Arias y G. Castañon (2001). *Exploración de la Diversidad Morfológica de chiles regionales en Yaxcabá, Yucatán, México*. *Agronomía Mesoamericana* 12(1): 41-47.
- Long-Solís, J. (1998). *Capsicum y cultura: La historia del chile*. Fondo de Cultura Económica, México, 203pp.
- López-Puc, G. (2008). *Inducción y Caracterización de la embriogénesis somática in vitro del chile habanero (Capsicum chinese Jacq.)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 96 pp.
- 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
- Margara, J. (1988). *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemos y la organogénesis*. Madrid, Mundi-Prensa. 223 pp.
- Maun, P. y J. Manzanera (2004). *Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (Q. ilex L.)*. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 40: 495-498.
- Orellana- Benavides, F.E., J.C. Escobar- Betancourt, A. J. Morales de Borja, I.S. Méndez de Salazar, R.A. Cruz-Valencia y M.E. Catellón-Hernandez (2000). *Cultivo de Chile Dulce*. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal. El Salvador. 51pp.
- Pérez-Molphe, E.M., R. Ramírez-Malagon, H. G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejos (1999). *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, 179 pp.
-

CAPÍTULO I

- Phillips, G. C. y J.F. Hubstenberger (1985). *Organogenesis in pepper tissue cultures*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 4: 261-269.
- Pollak, S. y P. Saukko(2000). *Clinical Forensic Medicine, Overview*. In: *Encyclopedia of Forensic Sciences*. Siegel JA, Saukko PJ, Knupfer GC. Academic Press San Diego. San Francisco. New York. Boston. London. Sidney. Tokio. 362-368 pp.
- Pozo-Compodónico, O., S. Montes-Hernández y E. Redondo-Juárez (1991). *Chile (Capsicum spp.)*. En R. Ortega, G. Palomino, F. Castillo, V. González y M. Livera (eds.) *Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México*. Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C., México, pp. 217-238.
- Ramírez, J. (1996). *El chile en Biodiversitas*. Año 2, Núm. 8. pp. 8-14.
- Roca, W. M. y L. A. Mroginski (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 953 pp.
- Rojas-Aréchiga, M., A. Orozco-Segovia y C. Vázquez- Yanes (1997). *Effect of light on germination of seven species of cacto from Zapotitlán Valley in Puebla, Mexico*. *J. Arid Environments* 36: 571-578.
- Thorpe, E. (1995). *In vitro embriogénesis in plant*. Kluwer Academia Publishers Netherlands. pp. 543.
- Tisserat, B., E.B. Essan y T. Murashige (1979). *Somatic embryogenesis in angiosperms*. *Hortic. Rev.* 1:1-78.
- Valera-Montero, L. L. y N. Ochoa-Alejo (1992). *A novel approach for chilli pepper (Capsicum annum L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls*. *Plant Sci.* 84: 215-219.

Williams, E.G. y G. Maheswaran(1986). *Somatic, embryogenesis: Factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Annals of Botany*.57: 443-462.

Zapata-Castillo, P.Y. (2005). *Estudio de la Morfogénesis in vitro del chile habanero (Capsicum chinense Jacq.). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biotecnología en plantas. CICY, 55pp.*

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.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE CHILE PIMIENTO (*Capsicum annuum*) DURANTE EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *in vitro*

2.1 INTRODUCCIÓN

Capsicum es un género reconocido como recalcitrante a la regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro*, razón por la que aun resulta muy difícil aplicar las técnicas biotecnológicas para su mejoramiento genético. Aunque son pocos los reportes de morfogénesis de chile *in vitro*, hasta fecha reciente, solo se ha logrado la inducción de brotes y la embriogénesis somática (ES) en la especie *C. annuum* (Ochoa e Ireato, 1990; Arroyo y Revilla, 1991; Agrawal y Chandra, 1993; Harini y Lakshmi, 1993; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Ramírez y Ochoa, 1996; Binzel et al., 1996; Steintz et al., 2003). Sin embargo, los protocolos de ES de *Capsicum* reportados a la fecha, muestran las siguientes problemáticas: baja eficiencia, baja reproducibilidad, baja capacidad de germinación y el alto índice de embriones deformados.

Un factor muy importante de la ES asociado con la proliferación continua de células embriogénicas es la concentración de la auxina en el medio de cultivo. Hay datos que indican que la auxina a altas concentraciones es necesaria para causar la desdiferenciación y la estimulación de la totipotencia estimulando la inducción del desarrollo del tejido vascular (Fosket y Roberts, 1964; Klee et al., 1987). Un ejemplo típico es el modelo de inducción de la ES de *Daucus carota*, en el cual el callo embriogénico y el mantenimiento de las suspensiones celulares obtenidas a partir de este callo ocurre en presencia de 2,4-D. Sin embargo, para que los embriones somáticos se formen y se desarrollen, se requiere transferir las estructuras proembriogénicas a un medio libre de este regulador (Zimmerman et al., 1993), con el consiguiente desarrollo normal de los embriones.

También se sabe que una vez que se ha inducido el proceso de la ES, las concentraciones altas de auxinas inhiben el desarrollo normal y la maduración de los embriones somáticos y que de igual forma estimulan la embriogénesis secundaria (Merkle et al., 1995). Este comportamiento fue similar a lo reportado para el género *Capsicum*, usando el de cultivar de chile habanero, al inducir la ES en la vía directa (Avilés-Viñas,

2007), como la indirecta (Zapata-Castillo et al., 2007). En ambos casos la reducción de la concentración de la auxina (2,4-D) a la mitad de su concentración favoreció el desarrollo normal y la sincronía de los embriones somáticos. Tomando en cuenta la recalcitrancia del género *Capsicum* a la morfogénesis *in vitro* vía ES se desea contar con un sistema de regeneración que permita utilizar técnicas biotecnológicas para el mejoramiento genético de la especie.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Procedimientos generales

Los medios y materiales de cultivo utilizados, fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1.2 kg cm⁻² de presión durante 20 min. Los medios de cultivo en estado semisólido se dosificaron a 20 ml en frascos de vidrio tipo gerber. El pH fue ajustado a 5.7 previo a la esterilización, utilizando NaOH 1.0 N ó HCL 1.0 N. según se requiera. Las siembras se realizaron en una campana de flujo laminar horizontal estéril para garantizar la asepsia.

2.2.2 Fuente de explante

Como fuente de explante se utilizó una variedad comercial de chile pimiento dulce (*C. annuum*) conocida como California Wonder (9288595). Las semillas se germinaron *in vitro* siguiendo la metodología empleada por Santana et al. (2005). en la cual, el medio de cultivo contiene las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962). con la adición de 1.5 µM de GA₃. Una vez obtenidas las plántulas asépticas de 14-15 días de edad, el hipocotilo fue seccionado para tomar segmentos de 3 a 4 mm de largo como explante para la inducción de la embriogénesis somática.

2.2.3 Desinfección de semillas

La desinfección de las semillas, se realizó según el protocolo descrito por Santana et al. (2005) que consiste de los siguientes pasos: inicialmente las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% por 5 min y se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®: 6% i. a.) diluida al 30% (v/v), durante 15 min. Finalmente, las semillas se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada estéril y se incubaron en el medio de germinación descrito anteriormente en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 ± 2°C.

2.3 ETAPA I: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CHILE PIMIENTO EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN *in vitro* REPORTADOS PARA EL GÉNERO

Se evaluaron diferentes protocolos que se han usado para la ES en Capsicum chinense, esto es con la finalidad de determinar el medio de cultivo mas adecuado para inducir este proceso embrionario en Capsicum annum.

2.3.1 Protocolo E1: embriogénesis somática directa en medio líquido (Avilés-Viñas y Santana- Buzzy, 2007)

Se seleccionaron explantes de hipocotilos de 15 días de edad, para luego inducirlos a embriones somáticos en un medio semisólido [MS + 2,4-D (9.05 μ M) + gelrite (2 $g L^{-1}$)] durante 30 días. Posteriormente el explante se transfirió al medio líquido MS reduciéndolo a la mitad el 2,4-D. Los cultivos se mantuvieron a 100rpm en luz continua haciendo cambios de medio cada 14 días).

2.3.2 Protocolo E2: embriogénesis somática directa en medio semisólido (López –Puc et al., 2006)

A fin de evaluar la capacidad de adaptación del chile pimiento a este protocolo, que originalmente fue establecido para inducir la embriogénesis somática directa de Capsicum chinense Jacq., se cultivó el explante hipocotilo en un medio MS semisólido conteniendo 2,4-D (9.05 μ M), sacarosa (3%), tiamina-HCl (29.64 μ M), cisteína-HCl (142.36 μ M), mio-inositol (554.93 μ M) y gelrite (0.2%) a un pH de 5.8. El cultivo se mantuvo en fotoperíodo a $25\pm 2^{\circ}C$, durante 30-45 días.

2.3.3 Protocolo E3: embriogénesis somática indirecta en medio líquido (Zapata-Castillo et al., 2007)

Los explantes de hipocotilo se cultivaron en un medio para la inducción de callo embriogénico, el cual contenía MS, 2,4-D (9.05 μ M), sacarosa (3%), tiamina-HCl (29.6 μ M), Cis-HCl (42.3 μ M), mio-inositol (555 μ M), gelrite (0.2%), incubándose bajo luz continua (40-50 μ molm²/s) a $25\pm 2^{\circ}C$. Una vez formados los callos, éstos fueron transferidos a medio líquido para su desagregación celular el cual está compuesto por MS, 2,4-D (4.5 μ M), sacarosa (3%), tiamina-HCl (29.6 μ M), Cisteína-HCl (42.3 μ M), mio-inositol (555 μ M) y se mantuvieron durante 70 días a 100 rpm, bajo luz continua (40-50

CAPÍTULO II

$\mu\text{molm}^2/\text{s}$) a 25 ± 2 °C subcultivándolos cada 14 días. Una vez establecida la línea celular se mantuvo en un medio que contenía MS, 2,4-D ($4.5 \mu\text{M}$), sacarosa (3%), tiamina-HCl ($29.6 \mu\text{M}$), Cisteína-HCl ($42.3 \mu\text{M}$), mio-inositol ($555 \mu\text{M}$); 70 días de cultivo, con subcultivos cada 14 días a 100 rpm, bajo luz continua ($40\text{-}50 \mu\text{molm}^2/\text{s}$) a 25 ± 2 °C.

2.4 ETAPA II: EFECTO DE LA PRESENCIA, DISMINUCIÓN Y AUSENCIA DEL 2,4-D DURANTE EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *C. annuum*

Con el fin de determinar cómo influye la presencia, disminución y ausencia del 2,4-D en la etapa de histodiferenciación se diseñó el siguiente experimento utilizando el proceso de embriogénesis somática vía directa (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Modificaciones del 2,4-D evaluadas para el protocolo seleccionado para la inducción e histodiferenciación de la ES en chile pimiento (*C. annuum*).

Tratamientos	Etapas de la Embriogénesis Somática	
	Inducción	Histodiferenciación
T0	$9.05\mu\text{M}$	$4.05\mu\text{M}$
T1	$9.05\mu\text{M}$	$2.26\mu\text{M}$
T2	$9.05\mu\text{M}$	-----

Después de determinar la respuesta de los explantes en los diferentes tratamientos evaluados, los embriones fueron cultivados en medio de maduración y germinación el cual fue común para todos los protocolos evaluados.

Maduración

Los embriones somáticos en estadio cotiledonar fueron transferidos a medio líquido de maduración conteniendo las sales MS reducidas a la mitad de su concentración original, suplementado con ABA (1.89 μM) y sacarosa (30 gL^{-1}). Una vez cultivados los embriones, fueron incubados a una temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad por 21 días.

Germinación

Embriones somáticos en estadio cotiledonar fueron transferidos a medio de germinación. El medio estuvo compuesto por sales MS, suplementado con AG_3 (1.1 μM), sacarosa (30 gL^{-1}), y gelrite (2 gL^{-1}), siguiendo el protocolo reportado por Santana et al. (2005). Una vez en el medio de germinación, los embriones fueron incubados a $25\pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de fotoperiodo (16 horas luz; 8 horas oscuridad) a una intensidad lumínica de 40-50 $\mu\text{molm}^2/\text{s}$, hasta su germinación.

Análisis de Datos

Los datos fueron procesados utilizando el paquete estadístico SPSS 16 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Realizando un análisis de varianza (ANDEVA) y comparando las medias de acuerdo a Tukey ($p \leq 0.05$), cuando fue requerido.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE CHILE PIMIENTO (*C. annuum*)

Las semillas germinaron en su totalidad a los 30 días de incubación en oscuridad. Una vez germinadas fueron trasladadas a condiciones de fotoperiodo durante una semana, en donde las plántulas (15 días de edad) comenzaron a producir clorofila (Figura 2.1).



Figura 2.1 Germinación de chile pimiento en condiciones in vitro: a) 30 días de edad en cuarto oscuro, b) plántulas después de 15 días transferidas a condiciones de fotoperiodo

Las plántulas in vitro de chile pimiento comparadas con las de chile habanero tienen un periodo de germinación mas largo (30 días), siendo el chile habanero un tiempo de germinación de 15 días (Santana-Buzzy et al. 2005). Las plántulas in vitro de chile pimiento morfológicamente son de mayor tamaño comparado con las plántulas in vitro de chile habanero.

2.5.2 ETAPA I: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE CHILE PIMIENTO EN DIFERENTES PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN *in vitro* REPORTADOS PARA EL GÉNERO

Inducción de la ES

Tomando en cuenta que el medio de inducción de la ES reportado para chile habanero es común a los tres protocolos evaluados. En el cultivar de los explantes de *C. annuum*, se pudo apreciar que en los extremos del mismo se formó una callosidad ligera a manera de cicatrización en las primeras dos semanas, en la que fueron observadas las estructuras pro-embriogénicas. Estas estructuras se tomaron de color blanco cristalino a blanco cremoso con el transcurso de los días, similar a la respuesta de chile habanero durante la etapa de inducción (Figura 2.2).

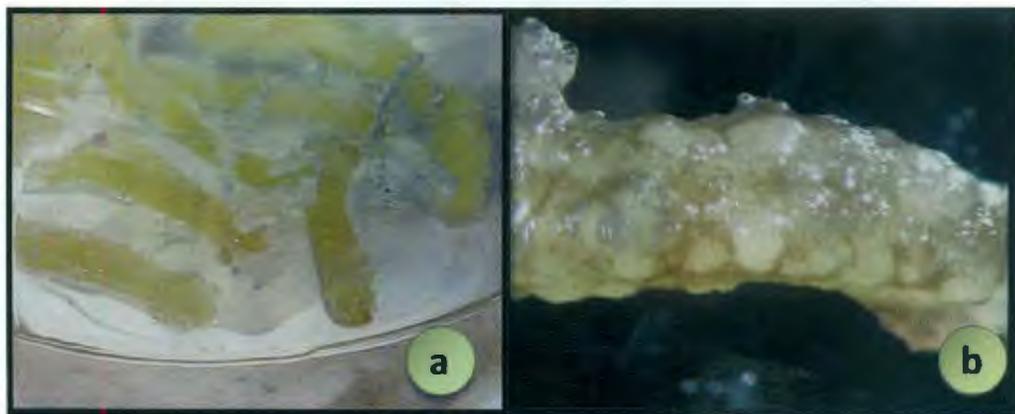


Figura 2.2 Inducción de la ES a partir de hipocotilos de chile pimiento: a) hipocotilos después de 15 días en el medio MS conteniendo 2,4-D ($9.05 \mu\text{M}$) en luz continua, b) explante de hipocotilo de 30 días de cultivo con estructuras pro-embriogénicas

Después de los 30 días de cultivo los explantes de *C. annum*, con estructuras proembriogénicas, fueron transferidos a los medios correspondientes de los tres protocolos evaluados: E1 (Avilés-Viñas y Santana-Buzzy, 2007), E2 (López-Puc et al., 2006) y E3 (Zapata-Castillo et al., 2007). El número de embriones somáticos por cada tratamiento se observa en la figura 2.3 donde se puede apreciar que la ESD tuvo un número mayor de embriones somáticos (190 Ess/ ml).

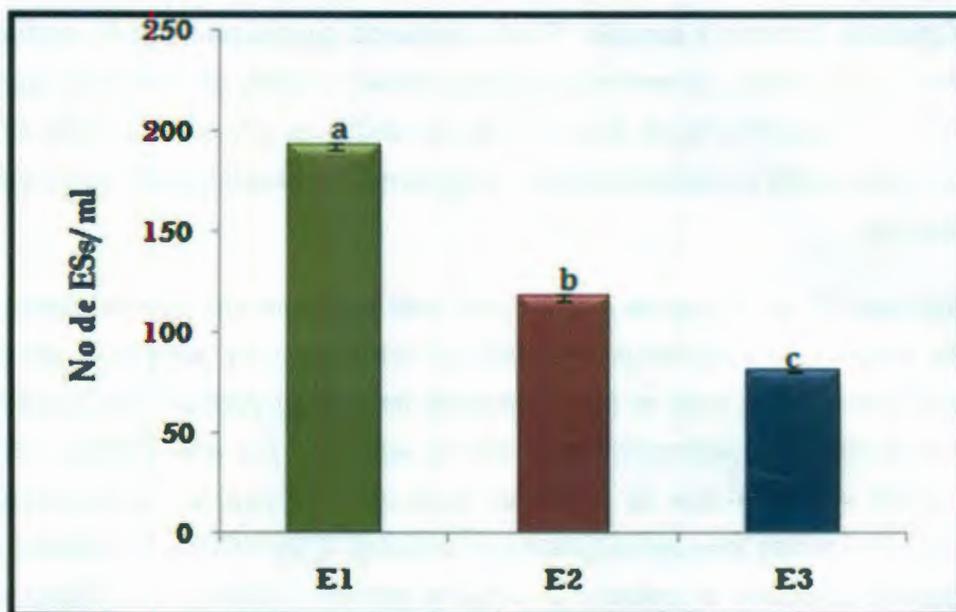


Figura 2.3 Número de embriones somáticos de *C. annum* evaluando diferentes medios de cultivos *in vitro*. E1: ES en medio líquido; E2: ES en medio semisólido; E3: ES indirecta en medio líquido a los 45 días de cultivo. Cada valor es el promedio de 3 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes según dójima de Tukey ($p \leq 0.05$).

En el protocolo E3 en el que la ES es indirecta los callos friables, blanco-compacto, una vez colocados en el medio de cultivo se disgregaron rápidamente, de manera similar a lo reportado por Zapata-Castillo et al. (2007). A los 30 días de cultivo se pudo apreciar la presencia de embriones somáticos en los estadios globular y corazón, observándose que en estos estadios los embriones dispersos en el medio presentan una morfología normal [Figura 2.4 e) y f)].

Cuando se utilizó el protocolo E2 los explantes mostraron la formación de embriones en estadio globular, corazón y torpedo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por López-Puc et al. (2006), observándose similar eficiencia dada por elevando número de embriones por explante [Figura 2.4 c) y d)]; sin embargo, por ser una ESD en medio sólido, probablemente la eficiencia pueda ser superada en medio líquido, como ocurrió en chile habanero.

En el protocolo E1, en el cual se produjo para chile habanero una ESD en medio líquido se pudo observar una rápida proliferación de los embriones somáticos, sin que se observara formación de callo ni establecimiento de una suspensión celular previa a la formación de los embriones coincidiendo con lo reportado por Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007). A los 30 días de cultivo se pudo observar una abundante biomasa de embriones en estadios tempranos (globular y corazón). A los 45 días se hicieron visibles los embriones somáticos en estadios avanzados (torpedo y cotiledonar) [Figura 2.4 a) y b)]. Hay que mencionar que la biomasa de embriones somáticos se caracterizó por su asincronía, típica de este proceso y que ha sido reportada en la embriogénesis somática de chile habanero por Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007), Lecona-Guzmán y Santana-Buzzy (2008).

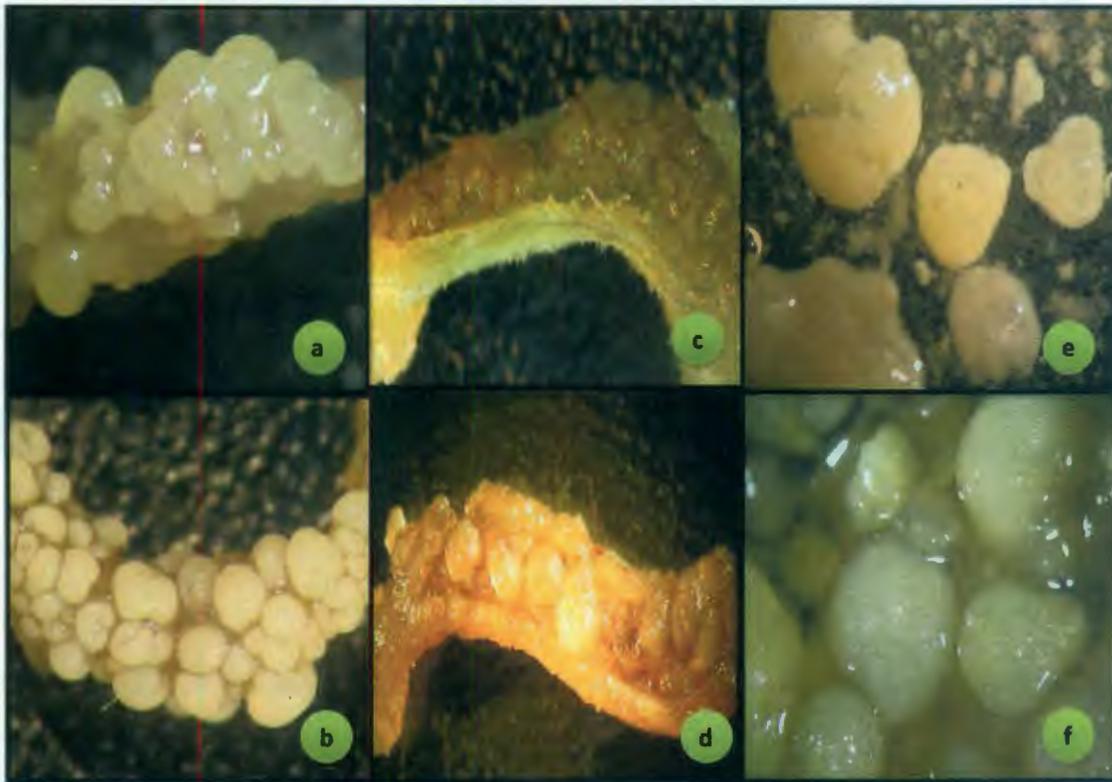


Figura 2.4 Embriones somáticos en *Capsicum annum* (chile pimiento): a) y b) ES directa en medio líquido a los 15 y 30 días de cultivo respectivamente; c) y d) ES directa en medio semisólido (25 y 45 días de cultivo); e) y f) ES indirecta en medio líquido (25 y 50 días de cultivo).

Estos resultados permiten inferir que los protocolos de *C. chinense* evaluados en *C. annum* funcionan de manera similar para ambas especies hasta la fase previa a la maduración de los embriones somáticos siendo el protocolo E1, es decir, el protocolo de ESD en medio líquido el que responde con mayor eficiencia en la formación de ES en *C. annum*, coincidiendo con los resultados obtenidos para *C. chinense*. Los protocolos de ES tanto para la inducción y la histodiferenciación con las modificaciones de los tres protocolos responden de manera favorable en chile pimiento (*Capsicum annum* L.), además de ser reproducibles y dando los primeros estadios característicos de la ES similar al chile habanero (Figura 2.5).

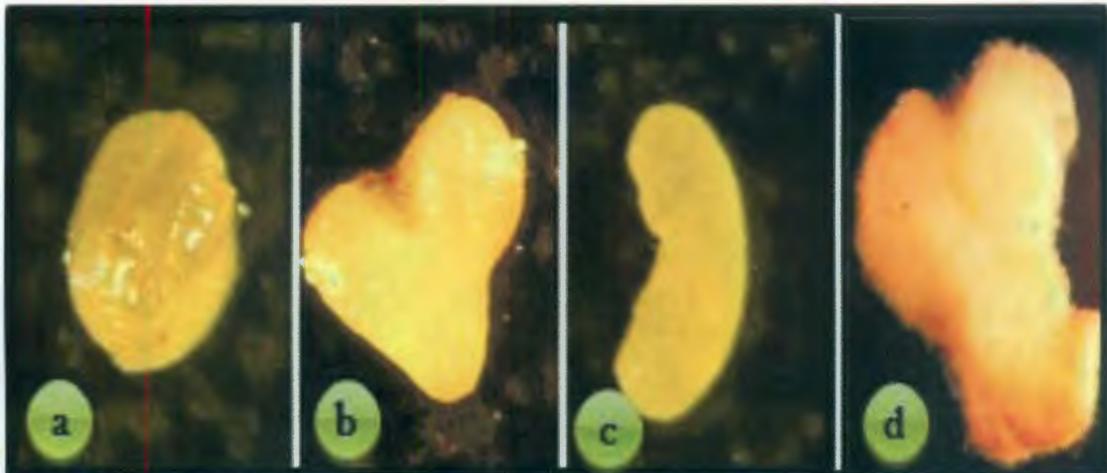


Figura 2.5 Estadios de ES de *Capsicum annuum* en medio líquido: a) globular, b) corazón, c) Torpedo y d) cotiledonar

Aunque existen reportes de ES en la especie *Capsicum annuum*, los trabajos realizados (Hariniy Sita, 1993; Binzel et al., 1996; Buyukalaca et al., 1996; Steinitz et al. 2003), permiten inferir que, en primer lugar, que el embrión cigótico ya sea maduro o inmaduro, es el explante que mejor ha respondido a la inducción de embriones somáticos ya sea de la vía directa ó indirectamente y en segundo lugar, que la eficiencia y reproducibilidad del proceso son muy baja.

En nuestro estudio, de los tres protocolos evaluados, (López-Puc et al., 2006; Zapata-Castillo et al., 2007; Avilés-Viñas y Santana-Buzzy, 2007) para la inducción y la histodiferenciación de la ES en *C. chinense* Jacq, el protocolo de ESD en medio líquido resultó la formulación de medio de cultivo más adecuada para la iniciación de dicho proceso en chile pimiento (*C. annuum*). También el hipocotilo resultó un explante adecuado para la inducción de los embriones somáticos a diferencia de los reportados para este género los cuales utilizan embrión cigótico.

Como se puede apreciar en nuestros resultados, la metodología establecida para la inducción de la embriogénesis somática en *C. annuum* consta de tres etapas: 1) inducción de la ES en medio semisólido 2,4-D ($9.05 \mu\text{M}$), 2) disgregación y proliferación de los

CAPÍTULO II

embriones somáticos y 3) formación de embriones somáticos en diferentes estadios (Figura 2.6).

Estas etapas difieren con las del protocolo que hasta la fecha ha sido reportado como el más eficiente para esta especie (Buyukalaca y Mavituna, 1996), en el cual utiliza embrión cigótico inmaduro como explante inicial y la ES se desarrolla en seis pasos: 1) Iniciación del callo embriogénico, 2) establecimiento de suspensiones celulares, 3) pretratamiento, 4) iniciación de los embriones somáticos, 5) maduración, 6) conversión a plantas.

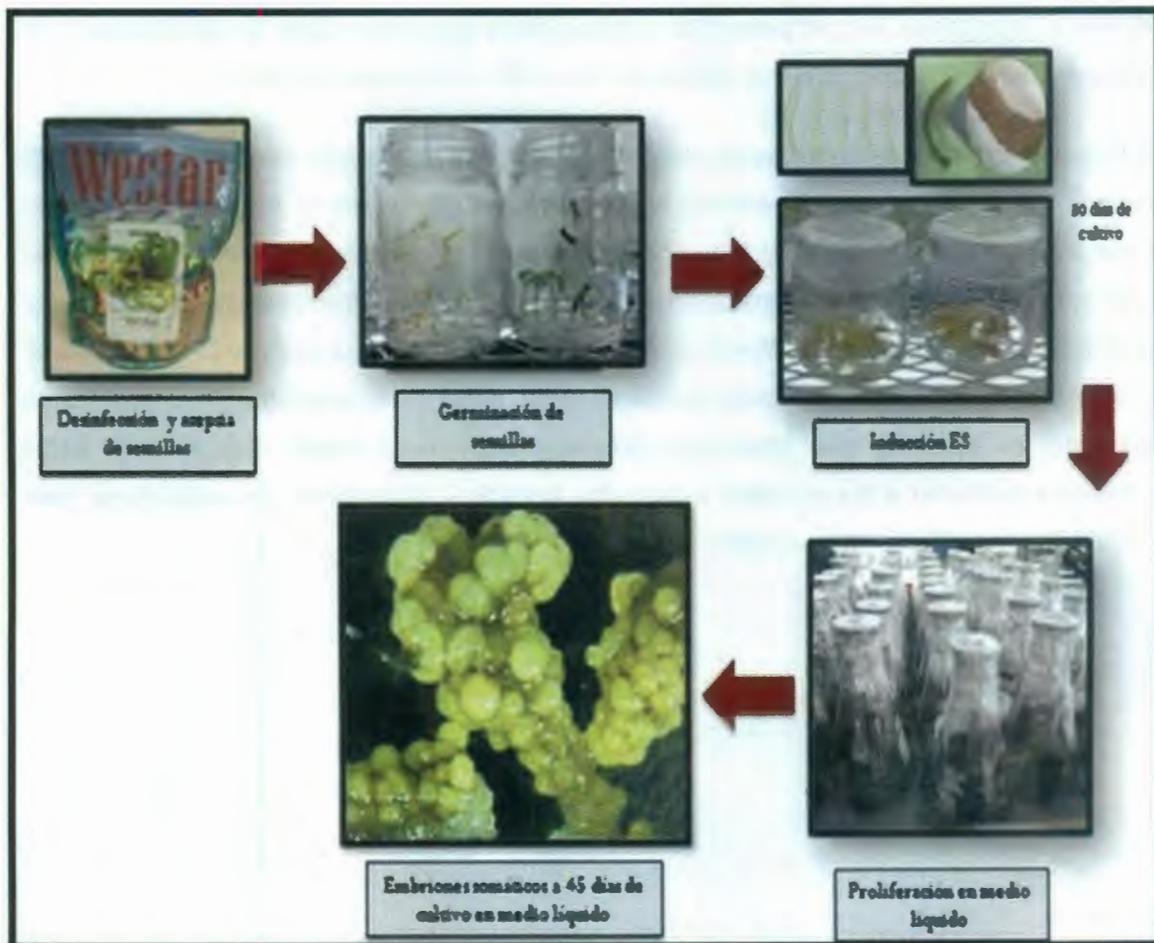


Figura 2.6 Protocolo de ES de chile pimienta (*C. annuum*), obtenida a partir del explante de hipocotilo y adaptado del protocolo de ESD de medio líquido usado en *C. chinense* Jacq. se puede observar una gran biomasa de embriones en diferentes estadios.

2.5.3 ETAPA II: EFECTO DE LA PRESENCIA, AUSENCIA Y DISMINUCIÓN DEL 2,4-D DURANTE EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *C. annuum*

Como resultado de la evaluación del comportamiento de los embriones somáticos de chile pimiento durante su desarrollo, cultivados en presencia, disminución y supresión del 2,4-D, en el medio de cultivo, se pudo observar en el tratamiento E1 la mejor respuesta, tanto en la etapa de inducción como durante la histodiferenciación de los embriones somáticos, aunque la embriogénesis se presentó siempre de manera directa en las células del explante (hipocotilo), el cual presentó características deseables para la morfogénesis de manera directa en chile pimiento utilizando hipocotilo como explante inicial.

Sobre este protocolo anteriormente descrito se trabajó modificando solamente la etapa de histodiferenciación y específicamente en la disminución y supresión de la auxina en este caso 2,4-D. El tratamiento (T0) fue considerado como testigo ya que este tiene la misma concentración de 2,4-D del protocolo E1 (4.05 μM) la cual fue descrita en apartados anteriores, observándose la eficiencia y calidad del embrión. Los embriones presentaron una forma muy definida en cuanto tamaño y color. Además se encontraron embriones en los primeros estadios que abarcaron todo alrededor del explante (Figura 2.7). Estos explantes arribaron a los estadios avanzados torpedo y cotiledonar con estructuras bien definidas a los 45 días de subcultivo.

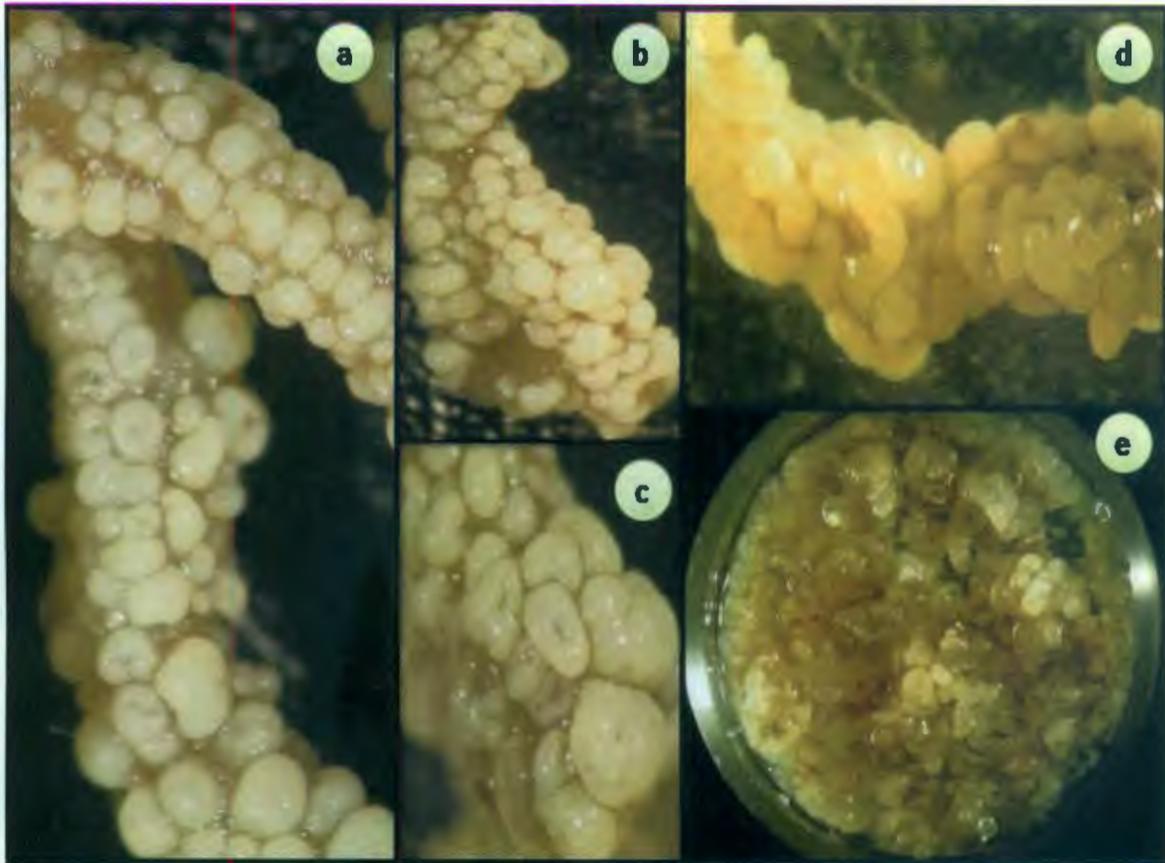


Figura 2.7 ES de chile pimienta (*C. annuum*) obtenida a partir de las modificaciones del 2,4-D (T_0 : $4.05 \mu\text{M}$) en la etapa del desarrollo: a), b) y c) a los 30; d) a los 45 días de cultivo y e) pool de embriones somáticos.

Al utilizar el tratamiento (T_1), el cual tuvo una concentración reducida del 2,4-D ($2.26 \mu\text{M}$) se observó a los 25 días un comportamiento similar al tratamiento testigo, presentándose una gran cantidad de embriones alrededor del hipocotilo en los primeros estadios, presentando un tamaño más compacto y una coloración más oscura que los embriones del tratamiento testigo, además de presentar una cantidad menor de embriones deformados pudiendo ser el T_1 una buena opción para la etapa de histodiferenciación de embriones somáticos en chile pimienta (Figura 2.8).



Figura 2.8 ES de chile pimienta (*C. annuum*) obtenida a partir de las modificaciones del 2,4-D (T1: 2.26 μ M) en la etapa del desarrollo a los 30 días de cultivo.

Cuando se uso el tratamiento T2 compuesto del medio basal MS sin regulador, se pudo apreciar que los embriones no se siguieron desarrollando quedando estancados en los primeros estadios y formando aglutinaciones junto con el callo generado (Figura 2.9). Además de que el tejido presentó necrosis después de los 15 días de subcultivo, siendo este tratamiento descartado y de esta manera corroborando de que es muy importante la presencia de una auxina para la proliferación y desarrollo de embriones somáticos en *C. annuum*.

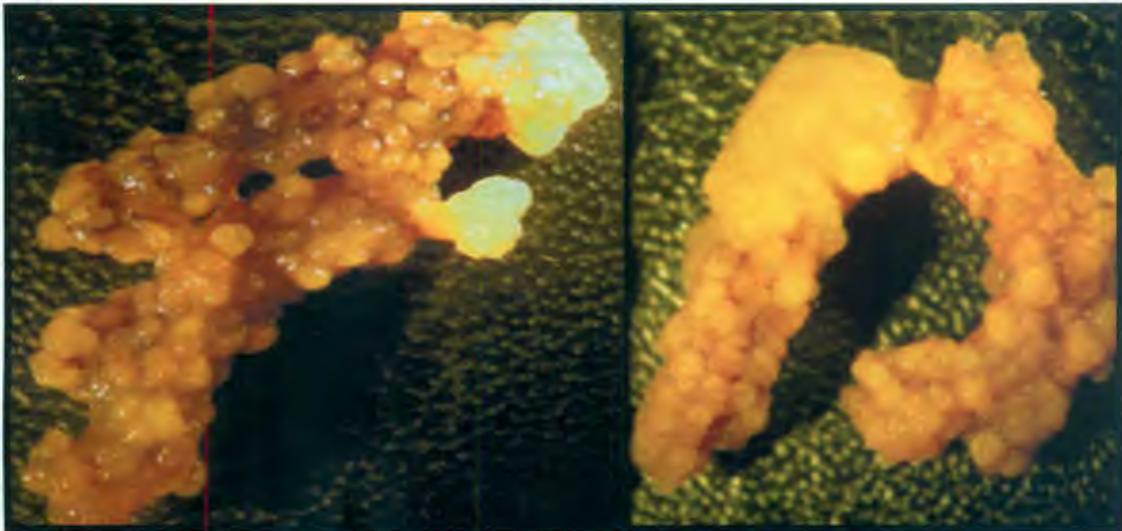


Figura 2.9 ES de chile pimiento (*C. annuum*) obtenida a partir de las modificaciones del 2,4-D en la etapa del desarrollo (T2: sin presencia de regulador) a los 30 días de cultivo.

De manera muy general en el Figura 2.10 se puede apreciar el comportamiento que llevan los tratamientos en la etapa de histodiferenciación con las modificaciones del 2,4-D, mostrándose el T1 (2.26 μ M) como el que tuvo una mayor cantidad de embriones que el tratamiento testigo, al igual que tuvo una cantidad de embriones deformados mínimo. En cuanto al T2 solo se muestra el total de embriones que se pudieron visualizar en el explante y no se pudo diferenciar entre los embriones normales y deformados ya que estos estancaron su desarrollo en el estadio globular y posteriormente se produjo la muerte del tejido, por lo que los resultados inferidos hasta el momento nos pueden dar una información muy importante en cuanto a la dependencia de la auxina para el crecimiento normal de los embriones.

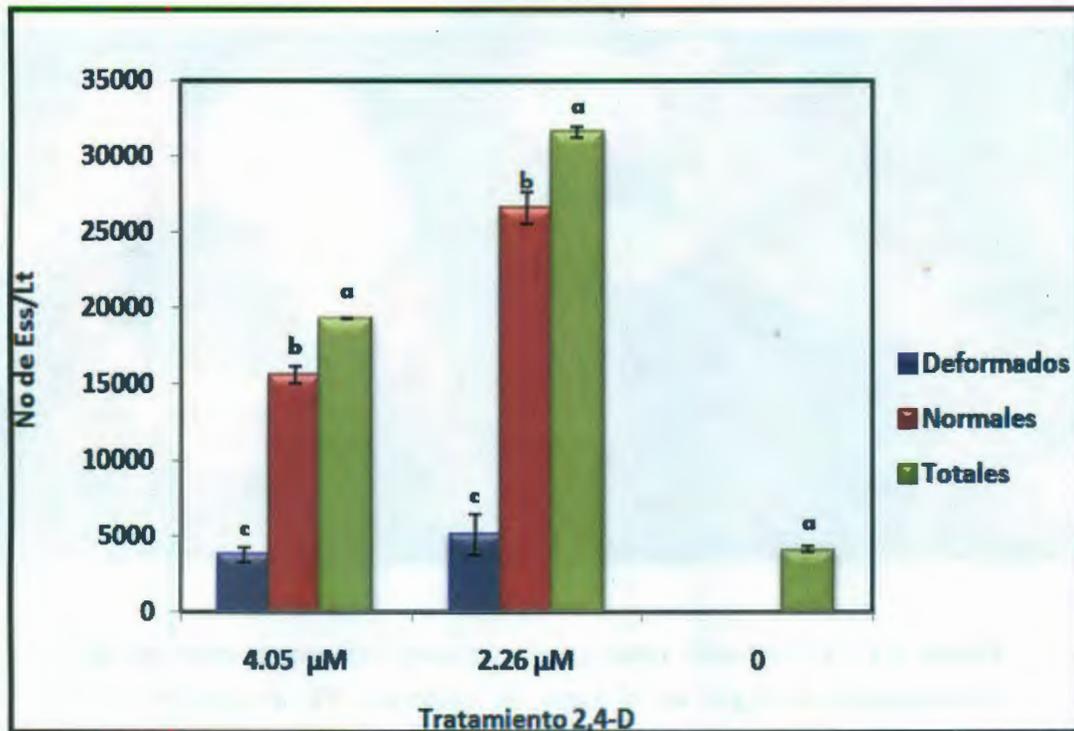


Figura 2.10 Efecto del 2,4-D en la etapa de histodiferenciación de la ES en chile pimiento (*C. annuum*). Cada valor es el promedio de 3 repeticiones con el error estándar. Letras diferentes según dócima de Tukey ($p \leq 0.05$).

Los embriones somáticos inducidos y desarrollados en el medio líquido MS+2,4-D (4.05 µM) y MS +2,4-D (2.26 µM) tuvieron un comportamiento similar cuando se subcultivaron en un medio líquido con 1.89 µM de ABA, ambos mostraron una rápida elongación de los embriones en estadio cotiledonar y al transferirlos a un medio líquido de germinación (conteniendo 1.1 µM GA3) su coloración cambió a verde; esto puede ser atribuido por el desarrollo de cloroplastos en las células de los embriones.

También se pudo observar la formación de pelos radiculares sobre dichos explantes (Figura 2.11). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Steintz et al. (2003) que de igual manera trabajaron con *C. annuum* utilizando como explante embrión cigótico, en dicho trabajo se observó una amplia gama de anomalías morfológicas, tales como la ausencia de los cotiledones, el desarrollo de un solo cotiledón deforme y fusión de los mismos, pero la anomalía más importante fue la ausencia de los meristemos apicales, este

CAPÍTULO II

último caso fue presentado en este estudio donde no se presenta la formación de los meristemos apicales, solo se presenta la emisión y elongación de la radícula.

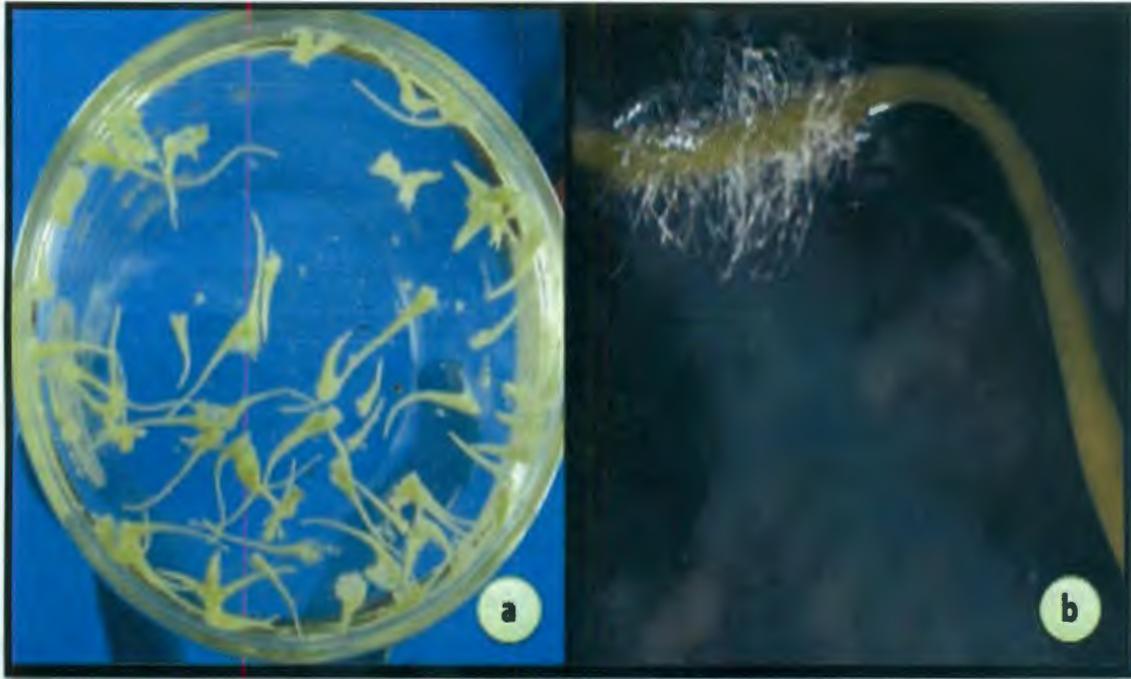


Figura 2.11 *Embriones somáticos germinados de chile pimienta (C. annuum)*
a) embrión a los 30 días en medio líquido de germinación b) embrión con la raíz desarrollada y formación de pelos radiculares a los 40 de cultivo en medio de germinación.

2.6 DISCUSIÓN

Los reportes de embriogénesis somática en el género *Capsicum* realizados permiten inferir que el embrión cigótico maduro o inmaduro es el explante que mejor ha respondido a la inducción de embriones somáticos, ya sea de manera directa o indirecta (Hariniy Sita, 1993; Binzel et al., 1996; Buyukalaca et al., 1996; Steinitz et al., 2003), sin embargo la eficiencia y reproducibilidad aun son muy bajas. En la primera parte del estudio se evaluaron tres protocolos de cultivo in vitro reportados para *C. chinense* en los cuales se ha resuelto dos limitantes en el género *Capsicum* (eficiencia y reproducibilidad). Es importante mencionar que el explante evaluado fue hipocotilo a diferencia de los reportes del género *Capsicum* en la cual utilizan como explante al embrión cigótico. Utilizar este explante (hipocotilo) en *C. annum* indudablemente redundará en una mejoría de la eficiencia del proceso que comparado con la manipulación y extracción del embrión cigótico éste resulta muchos menos laborioso y su respuesta es muy rápida al cultivo in vitro.

De esta manera se pudo comprobar que en el género *Capsicum* no existe dependencia, ni del genotipo ni del explante para la inducción la embriogénesis somática siendo de esta manera el hipocotilo el más eficiente. Por otro lado el protocolo reportado por Buyukalaca y Mavituna (1996) que ha sido considerado como uno de los más eficientes para la obtención de embriones somáticos por medio de la vía indirecta, este reporta un porcentaje de conversión y germinación elevado comparado con los demás reportes, sin embargo, el número de embriones somáticos es de 54 ESs/ml comparado con el protocolo reportado en este trabajo en el cual se obtuvieron 190 ESs/ml a través de la vía directa en medio líquido superando el número de embriones además de la sincronía, calidad y eficiencia de los embriones obtenidos. Esto nos indica que los requerimientos del medio de cultivo que se reportó para chile habanero son favorables de igual manera para el chile pimiento.

Por otra parte, un factor muy importante en el sistema de ES para la inducción es el 2,4-D, auxina sintética fundamental en este proceso y que de manera general en la mayoría de los reportes es considerado como un antagonico en la etapa de la histodiferenciación, por lo que la mayoría de los protocolos la suprimen en esta etapa del proceso. También este compuesto es considerado como un factor responsable del desarrollo anormal del

CAPÍTULO II

meristemo apical durante el cultivo in vitro, en diversas especies vegetales (Parrotet al., 1988). En este estudio se pudo visualizar una marcada dependencia del explante por el 2,4-D, no solo para la etapa de la inducción, si no que a todo lo largo de la etapa de desarrollo (histodiferenciación), ya que la supresión de esta auxina provocó la muerte celular de los embriones a los 15 días de cultivo.

A diferencia de otros sistemas de ES reportados en diferentes especies, en el caso de Capsicum, esta auxina no se puede suprimir, de lo contrario, el proceso se detiene y los embriones no avanzan más allá del estadio globular. Sin embargo, al reducir la concentración de esta auxina (a 2.26µM) se pudo visualizar que el comportamiento de los embriones fue muy parecido al tratamiento testigo (4.05 µM) ya que a los embriones a los 30 días se encontraron en los estadios desde globular hasta corazón y a los 55 días ya se pueden visualizar los estadios avanzados.

En cuanto al número de embriones somáticos en el tratamiento T1 (3.16×10^4 / L) fue mucho mayor que en que el tratamiento T0 (1.93×10^4 / L), adicionalmente el número de embriones deformados fue menor en el T1 (0.5077×10^4 / L), por lo que, se podría utilizar esta última concentración para el protocolo de embriogénesis en esta especie, ya que como se había mencionado, las elevadas concentraciones de las auxinas durante la etapa de desarrollo podría estar causando un efecto inhibitorio sobre el desarrollo normal del meristemo apical en los embriones (Steinitz, 2003).

Sin embargo, los resultados descritos aquí, así como en otros trabajos (Kaparaski, 2008) nos demuestran que las concentraciones de auxinas son muy importantes y que la aplicación de estos reguladores no se puede suprimir, ya que es necesaria para la inducción de la ES, y que la larga exposición a este puede estar causando anomalías en los embriones. Por esta razón es pertinente trabajar con la menor concentración posible de esta auxina; ya que de lo contrario pudiera estar ocasionando anomalías en el embrión y de esta manera no sería posible una germinación y mucho menos conversión de la plántula.

2.7 BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. y N. Chandra (1983). *Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of Capsicum annum 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*. *PlantCell Rep.* 10:414-416.
- Avilés-Viñas, S.A. y N. Santana-Buzzy (2007). *Papel del Etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (Capsicum chinense Jacq.)*. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 65pp.
- Binzel, M. L., N. Sankhla, S. Joshi, y D. Sankhla (1996). *Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (Capsicum annum L.)*. *Plant Cell Rep.* 15:536-540.
- Buyukalaca, S. y F. Mavituna (1996). *Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.
- Fosket, D. y L. Roberts (1964). *Induction of wound-vessel differentiation in isolated coleus stem segments in vitro*. *Am. J. Bot.* 51:19-25.
- Harini, I. y G. Sita (1993). *Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (Capsicum annum L.)*. *Plant Sci.* 89: 107-112.
- Kaparaskis, G. y P.A. Alderson (2008). *Role for Cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (Capsicum annum L.)?* *J Plant Growth Regul.* 27: 110-114
- Klee, H., R. Horsch, M. Hinchee, M. Hein y N. Hoffmann (1987). *The effects of overproduction of two Agrobacterium tumefaciens T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants*. *Genes Dev* 1: 86-96.
- Lecona-Guzmán, C.A. y N. Santana-Buzzy (2008). *Estudio de las proteínas en embriones cigótico y embriones somáticos de chile habanero (Capsicum chinense Jacq.)*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 61pp.

- López-Puc, G., A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, P. Zapata-Castillo, M. 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 (6) 1-7.
- Merkle, S.A., W.A. Parrott y B.S. Flinn (1995). Morphogenic aspects somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (ed.). *In vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 155-203.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Ochoa-Alejo, N. y L. Ireta-Moreno (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annum* L.) cultured in vitro. *Sci. Hort.* 42:21-28.
- Parrott, W.A., G. Dryden, S. Vogt, D.F. Hildebrand, G.B. Collins y E.G. Williams (1988). Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In Vitro Cell Dev Biol* 24:817-820
- Ramírez-Malagon, R. y N. Ochoa-Alejo (1996). An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Rep.* 16:226-231.
- Santana-Buzzy, N., A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M. Montalvo-Peniche, P. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldívar-Collí, O. Gutiérrez-Alonso y M. Miranda-Ham (2005). Regeneration of Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40:1829-1831.
- Steinitz, B., M. Küsek, Y. Tabib, I. Paran y A. Zelcer (2003). Pepper (*Capsicum annum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *in vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 39:296-303.

Zapata-Castillo, P.Y, A. Canto-Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz, F. Barahona-Pérez y Santana Buzzy N (2007). Somatic embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspension. *HortScience* 42(2):329-333

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

CAPÍTULO III

3.1 DISCUSIÓN GENERAL

El uso de la ES para la propagación seguirá aumentando según haya más protocolos que sean avanzados y refinados, además de ser capaces de producir embriones somáticos morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad de germinar y convertirse en plantas de una manera rápida y eficaz. Entre las ventajas que ofrece la ES está la posibilidad de obtener volúmenes de producción superiores en un menor tiempo, lo cual convierte a este sistema en una vía de regeneración potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Thorpe, 1991). Además la disponibilidad de protocolos para la obtención de embriones somáticos es clave para la automatización de la micropropagación y la consecuente reducción de costos para su implementación a escala comercial (Olmos et al., 2004).

La regeneración de plantas in vitro de diferentes tipos de chiles (género Capsicum) han sido obtenidas bajo diferentes protocolos (Buyukalaca y Mavituna, 1996; Binzelet al., 1996) ya sea de manera directa o indirecta a partir de diversos tejidos del chile (Agrawal y Chandra, 1983; Arroyo y Revilla, 1991; Valera y Ochoa, 1992), aún así, los resultados reportados evidencian que la eficiencia en la obtención de plántulas, aún resulta baja para este género. La obtención de embriones somáticos ya sea de manera directa o indirecta, tanto en medio sólido como líquido ha sido reportada por Harini y Sita (1993), Buyukalaca y Mavituna, (1996) y Binzel et al. (1996), sin embargo, estos protocolos aún presentan ineficiencias para la obtención de embriones somáticos en C. annum.

Estas ineficiencias para obtener embriones somáticos dentro de este género puede explicar el por qué C. annum es considerado como recalcitrante a la morfogénesis, en el que la regeneración de plantas a partir de células, tejidos y órganos no ha logrado grandes avances, lo que limita la aplicación de técnicas avanzadas como la transformación genética que permita el mejoramiento de la especie (Ochoa y Ramírez, 2001). Dentro de las limitantes que tienen estos protocolos reportados para Capsicum se encuentran una baja eficiencia, baja reproducibilidad y capacidad de germinación, además de un alto índice de embriones deformados. Esta incapacidad de los chiles para desarrollar plantas completas in vitro, limitan sustancialmente el uso de las técnicas

biotecnológicas en el mejoramiento y propagación de sus cultivares.

*Sin embargo, dentro de este mismo género, se cuentan con protocolos de ES tanto directa como indirectamente, para la especie *C. chinense* que han resuelto algunas limitantes que se presentan para este género (López-Puc et al., 2008, Zapata-Castillo et al., 2007, Avilés-Viñas y Santana-Buzzy, 2007). El protocolo de Avilés-Viñas y Santana-Buzzy (2007), el cual es de ESD en medio líquido resultó ser el más eficiente en la producción de embriones con una mejor calidad y abundante biomasa de los mismos, además de ser altamente reproducible.*

*Al evaluar estos protocolos en chile pimiento se pudo comprobar que estos, al pertenecer al mismo género se pueden adaptar estos protocolos a la especie *C. annum*, donde de igual manera el protocolo de ESD (E1) y utilizando como explante hipocotilo, resultó ser favorable para la obtención de embriones somáticos.*

*Estos embriones presentaron una gran sincronía y con un bajo índice de embriones deformados, mostrando una mayor eficiencia y calidad comparado con los demás sistemas reportados para el género *Capsicum*. Sin embargo, aunque se tuvo una gran biomasa de los embriones somáticos se puede observar recalcitrancia a la conversión.*

*A pesar de que la recalcitrancia *in vitro* afecta la aplicación práctica de la biotecnología en muchas especies de plantas, no ha sido estudiada con detalle (Benson, 2000).*

*Las auxinas son consideradas las hormonas más importantes en la regulación de la ES *in vitro* (Cooke et al., 2002). El 2,4-D ha sido reportado como el factor causante del anormal desarrollo del meristemo apical en varias especies (Parrott, et al., 1988). En zanahoria se ha comprobado que el tiempo de exposición de los ESs a 2,4-D afecta la capacidad de germinación de los mismos (Kamada et al., 1989), es por ello que en este trabajo se decidió probar el efecto de la concentración de esta auxina en la etapa de desarrollo de la embriogénesis (histodiferenciación).*

CAPÍTULO III

Al utilizar una concentración de 4.05 μ M de este regulador no se afectó la calidad ni la sincronía de los embriones; sin embargo una supresión del 2,4-D paraliza el proceso, no pudiendo avanzar más del estado globular. De esta manera se comprobó que el 2,4-D no puede suprimirse después de ser inducida la ES.

*Sin embargo, se enfrentan aún dos de los problemas reportados para el género *Capsicum*: la frecuencia de embriones deformados y la baja capacidad de germinación de los embriones somáticos, lo que limita drásticamente la regeneración de plantas completas en la especie. Este problema pudiera estar relacionado con la dependencia de este proceso con el 2,4-D ya que pudiera ser un elemento desestabilizador durante el desarrollo, y en consecuencia, puede estar relacionado con la malformación que sufre el meristemo apical de los embriones de esta especie. Esta pudiera ser una de las causas fundamentales de la incapacidad de los embriones somáticos para germinar, lo cual también se observa para *C. chinense*.*

3.2 CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ *El hipocotilo fue un explante altamente morfogenético para la inducción de la ES de *Capsicum annuum*.*
- ✓ *Los proceso de inducción e histodiferenciación se caracterizaron por una alta eficiencia y reproducibilidad de la ES en *C. annuum*, superando dos problemas limitantes de los protocolos del género.*
- ✓ *La ES en *C. annuum* fue favorecida cuando se redujo a la mitad la concentración de 2,4-D durante la histodiferenciación, sin embargo, no fue posible suprimirlo totalmente del medio de cultivo.*
- ✓ *La concentración y el tiempo de exposición de los explantes al 2,4-D influyó en la respuesta obtenida en cada uno de los tratamientos. A mayor concentración y tiempo de exposición al 2,4-D el desarrollo de los embriones se produjo en menor tiempo.*

CAPÍTULO III

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se ha propuesto un protocolo de inducción a la ESD de chile pimienta en medio líquido, la cual se describe en las siguientes etapas (Figura 3.1.):

1. **Asepsia de semillas** (Asepsia de semillas (alcohol 70% X 5' + cloro 30% X 15')
2. **Germinación de semillas *in vitro*** MS+GA₃ (1.15 μM), selección de explantes (hipocotilos de 15 días de edad)
3. **Inducción de la embriogénesis** a partir de hipocotilos en medio semisólido MS + 2,4-D (9.05 μM) + gelrite 0.2 % por 30 días en luz continua
4. **Inducción de la embriogénesis en medio líquido** MS + 2,4-D (4.05 μM) a 100rpm en luz continua (con cambios de medio cada 15 días)
5. **Maduración de embriones somáticos** MS/2, ABA (1.89 μM), sacarosa (3%). pH 5.8. Oscuridad 25 ± 2°C, por 21 días
6. **Germinación de embriones somáticos** en un medio líquido con MS, GA₃ (1.1 μM), sacarosa (3%), pH 5.8 luz continua a 25 ± 2°C, por 30 días.

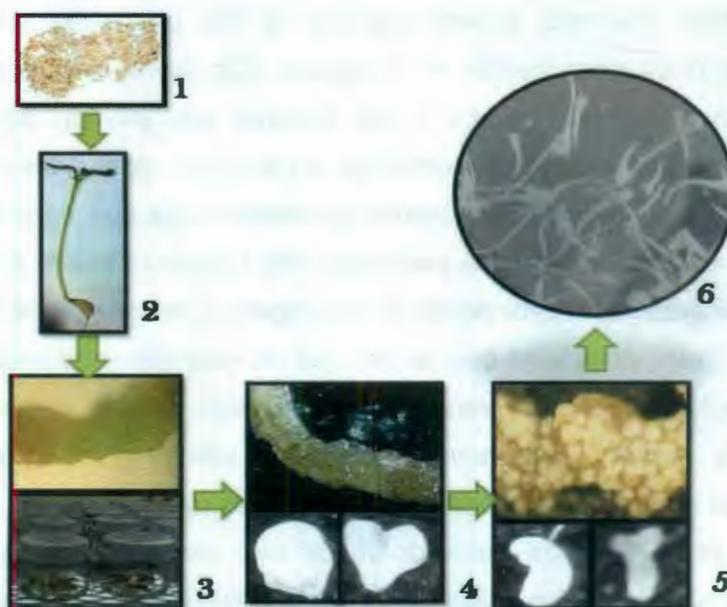


Figura 3.1 Protocolo de embriogénesis somática directa en chile pimienta (*C. annuum*)

3.3 PERSPECTIVAS

C. annuum es la especie más importante del género *Capsicum*. Sus variedades aunque no pueden ser cultivadas en muchos países, como condimento son consumidas prácticamente en todo el mundo. Los problemas que más lo afectan son, como en muchos otros cultivos, aquellos relacionados con el estrés, tanto los impuestos por el ambiente, como los que ocasionan las plagas y las enfermedades. El mejoramiento genético es una de las metas que tiene la mayoría de los laboratorios que están abordando la biotecnología de *Capsicum*. Contar con un sistema de regeneración *in vitro*, y particularmente vía ES, por tanto ha sido objetivo común de los grupos que han venido trabajando con esta especie. Sin embargo, la persistencia de la baja eficiencia y reproducibilidad, así como el alto índice de embriones deformados y por consiguiente bajo índice de conversión, ha limitado el avance de todos estos trabajos. En este proyecto, sin embargo, se estableció por primera vez, un protocolo de ES para la especie *C. annuum* en el que se descarta definitivamente el embrión cigótico como explante inicial, contrario a lo que se ha reportado para esta especie, obteniéndose también por vez primera, una elevada eficiencia en la producción de embriones somáticos ($1.9 \times 10^4 \cdot L^{-1}$), la más alta reportada para la especie hasta la fecha.

En este estudio logramos superar algunos de los problemas que se han venido reportando consuetudinariamente en el género *Capsicum*, e indudablemente queda mucho por investigar en relación a los factores que pueden estar provocando la recalcitrancia de esta especie. Sin embargo, los avances alcanzados muestran que si se logran superar los problemas aún quedan pendientes para que los embriones somáticos se conviertan en plantas normales, probablemente *Capsicum* pueda ser reconocido como uno de los géneros con mayor potencial embriogénico de los que se han reportado a la fecha. No obstante, el sistema que se propone en este trabajo, puede ser utilizado para estudiar aspectos básicos del crecimiento y desarrollo durante la morfogénesis *in vitro*. Por otro lado, constituye un resultado de gran utilidad para los grupos que están interesados en regenerar *Capsicum in vitro* con fines de propagación y de mejoramiento por métodos biotecnológicos, pudiendo utilizar este sistema para desarrollar estudios a nivel de la histodiferenciación de los embriones somáticos de esta especie.

CAPÍTULO III

Para La ES es una valiosa alternativa para la propagación de algunas especies vegetales. Esta herramienta es el método de multiplicación de plantas más eficiente conocido, ya que es posible obtener miles de plantas en espacios tan reducidos como un matraz o un biorreactor de pequeña capacidad. Sin embargo, la ES adquiere una gran relevancia en aquellas especies clasificadas como recalcitrantes a la germinación de sus semillas, y que además muestran un comportamiento similar a la morfogénesis in vitro, como es el caso de algunas especies del género Capsicum.

3.4 BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. y N. Chandra (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. *Mathania*. *Curr. Sci.* 52: 645-46.
- Arroyo, R. y M.A. Revilla (1990). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Rep.* 10: 414-416.
- Avilés-Viñas, S.A. y N. Santana-Buzzy (2007). *Papel del Etileno durante la embriogénesis somática del chile habanero (Capsicum chinense Jacq.)*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. 65 pp.
- Benson, E. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In vitro Cell Dev. Biol-Plant.* 36:141-148
- Binzel, M. L., N. Sankhla, S. Joshi y D. Sankhla (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 536-540.
- Buyukalaca, S. y F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.
- Cooke, T.J., D. Poli, A. E. Sztejn y J.D. Cohen (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Plant Molecular Biology.* 49(3-4): 319-338.
- Harini, I. y G. Sita (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci.* 89: 107-112.
- Kamada, H, T. Kiyosue y H. Harada(1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production, *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* .25(12) 1163-1166
- 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

CAPÍTULO III

- Ochoa –Alejo, N. y R. Ramírez-Malagón (2001). *In vitro chili pepper Biotechnology*. In *Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*. 37(6): 701-729.
- Olmos, S., G. Luciani y E. Galdeano (2004). *Micro propagación. Parte V Métodos de propagación y conservación de germoplasma*. En: Echenique, V; Rubinstein C y Mroginski L (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (Ed): INTA, Buenos Aires, Argentina, 163 - 178.
- Parrott, W.A, G. Dryden, S. Vogt, D.F. Hildebrand, G.B. Collins y E.G. Williams (1988). *Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean*. In *Vitro Cell Dev Biol* 24:817-820
- Ramírez-Malagon, R. y N. Ochoa-Alejo (1996). *An improved and reliable chili pepper (Capsicum annum L.) plant regeneration method*. *Plant Cell Rep*. 16:226-231.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 953 pp.
- Santana-Buzzy, N., A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M. C. Montalvo-Peniche , P. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldívar-Collí, O. Gutiérrez-Alonso y M. Miranda- Ham (2005). *Regeneration of Habanero pepper (C. chinense Jacq.) via organogenesis*. *HortScience* 40:1829–1831.
- Thorpe, E. (1995). *In vitro embriogénesis in plant*. Kluwer Academia Publishers Netherlands. pp.543.
- Valera-Montero, L. L. y Ochoa-Alejo, N. (1992). *A novel approach for chilli pepper (Capsisumannum L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls*. *PlantSci*. 84: 215-219.
- Villalobos, V. y T. Thorpe T. (1991). *Micropropagación: conceptos, metodologías y resultados*. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. (Ed): Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia, pp. 128 – 141

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