



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO DE LAS AUXINAS DURANTE LA INDUCCIÓN
E HISTODIFERENCIACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA DE *Capsicum* spp.**

Tesis que presenta

Jacobo Pérez Pastrana

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2013



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 **EFFECTO DE LAS AUXINAS DURANTE LA INDUCCIÓN E HISTODIFERENCIACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Capsicum spp.*** 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 del (la) Dra. Nancy Santana Buzzy, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Felipe', is written over a horizontal line.

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 5 de agosto de 2013.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. P. Pastrana', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Jacobo Pérez Pastrana

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 titulado Recalcitrancia a la morfogénesis del género *Capsicum*: estudios morfológicos, bioquímicos y moleculares relacionados con los factores que afectan la capacidad de regeneración de plantas de chile *in vitro* bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realización de mis estudios de maestría (No. Registro de Becario 264523).

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. por permitirme hacer uso de sus instalaciones para la realización de mi tesis.

A la Dra. Nancy Santana Buzzy, por aceptarme en su equipo de trabajo, dedicando su tiempo en la dirección y corrección del proyecto que se ve culminado con esta tesis, y sobre todo por depositar su confianza en mí. Siendo un honor pasar a formar parte de la lista de sus alumnos. Por todo ello; muchas Gracias.

A la M.C. Adriana Canto Flick y al M.C. Eduardo Balam Uc, por su apoyo técnico incondicional, que hizo posible que mi trabajo estuviera listo en tiempo y forma.

Agradezco enormemente a los miembros de mi comité tutorar y revisores de mi tesis: Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, Dr. Manuel Martínez Estévez y la Dra. Sara Luz Nahuat Dzib por sus comentarios y recomendaciones.

A la Dra. Susana Avilés Viñas por la generosidad que tuvo en compartir conmigo de sus conocimientos al enseñarme la técnica de histología que enriqueció el trabajo.

A la M.C. Clara Teresa Monreal Vargas por incursionarme y alentarme a seguir en el ámbito de la ciencia.

A mis amigos de la Unidad de Bioquímica. En especial a la I.A.F. Dulce I. G. Álvarez López, a la Q.F.B Seele Laura Rodríguez Piña, a la M.C. Rosa Y. Us Camas, al M.C. Geovanny Nic Ca, al M.C. Benjamín Ayil Martínez, al Dr. Hernan J Villanueva-Alonzo, a la M.C. Marianne Soledad Rivero, a la Dra. Eunice Gómez Uc, al M.C. Carlos Regla Márquez, a la I.B.Q. Karime Zubieta Sánchez, al M.C. Raúl Valle Gough, al I.B. Jorge Luis García Almada, al Q.F.B. Miguel Angel Uc Chuc y al I.B. Ulises Rodríguez Corona, por permitirme compartir con ustedes esta etapa inolvidable de mi vida.

DEDICATORIAS

A Dios,

Dios mío, en ti confié.

Salmos 25:2.

Mi Familia;

A mi papá, Dr. Agustín Pérez Centeno, por ser un ejemplo de vida.

A mi mamá, Sara Pastrana Vivas, por permitirme volar tan alto como yo me lo proponga.

A mi hermano, Samuel Pérez Pastrana, por demostrar que podemos conseguir nuestros sueños.

Mi novia

Con especial cariño a Dulce Ivonn Guadalupe Álvarez López por acompañarme y apoyarme a lo largo de esta etapa.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	7
ANTECEDENTES	7
1.1 CHILE HABANERO (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).....	7
1.2 PIMIENTO MORRON (<i>Capsicum annuum</i> L. var. California Wonder).....	8
1.3 CULTIVO <i>in vitro</i> DE PLANTAS	9
1.4 LAS FITOHORMONAS	10
1.5 ROL DE LAS AUXINAS DURANTE EL PROCESO EMBRIONARIO	11
1.6 LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	14
1.7 EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA E INDIRECTA	16
1.8 LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	17
1.9 LA HISTODIFERENCIACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	18
1.10 EMBRIOGENESIS SOMATICA EN EL GENERO <i>Capsicum</i>	22
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28

JUSTIFICACIÓN.....	28
Estrategia Experimental.....	29
CAPÍTULO II	30
ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES AUXINAS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>C. chinense</i> Jacq., Y <i>C. annuum</i> L.....	37
2.1 INTRODUCCIÓN.....	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.2.1 Fuente de explante	37
2.2.2 Establecimiento de plantas asépticas	38
2.3 ETAPA I: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES AUXINAS DURANTE LA HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs DE <i>C. chinense</i> Y <i>C. annuum</i>	38
2.3.1 Etapa I: Inducción a la embriogénesis somática directa.....	38
2.3.2 Etapa I: Efecto de diferentes auxinas durante el proceso de histodiferenciación.....	39
2.4 ETAPA II: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PICLORAM DURANTE LA INDUCCIÓN E HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs EN DIFERENTES EXPLANTES DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	41
2.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	41
2.6 RESULTADOS	43
2.7 ETAPA I: ANÁLISIS HISTOLÓGICO	51

2.8 ETAPA II: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PICLORAM DURANTE LA INDUCCIÓN E HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs DE <i>C. chinense</i> Jacq.....	54
2.9 ETAPA II: ANÁLISIS HISTOLÓGICO	56
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	61
PERPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA	65

1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Las fitohormonas regulan todo el crecimiento y desarrollo de la planta	11
Figura 1.2 Patrones de distribución de la auxina durante el desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	12
Figura 1.3 Representación gráfica de los gradientes de auxina y su transporte durante el proceso de embriogénesis	13
Figura 1.4 <i>Kalanchoe daigremontiana</i> , formación embriones adventicios.....	14
Figura 1.5 Representación esquemática del desarrollo embrionario en angiospermas	15
Figura 1.6 Principales métodos de propagación <i>in vitro</i>	16
Figura 1.7 RCV empleados en medios de inducción de acuerdo a 124 protocolos de ES.....	18
Figura 1.8 Histodiferenciación de la ES en soya.....	19
Figura 1.9 Proceso de la embriogénesis somática.	20
Figura 1.10 Representación esquemática del papel de la auxina durante la histodiferenciación....	21
Figura 1.11 Estadios y desarrollo de la ES en <i>C. annuum</i> L.....	24
Figura 1.12 Embriogénesis somática directa inducida con medio MS adicionado con 9.05 μM de 2,4-D a partir de diferentes explantes	25
Figura 1.13 Embriogénesis somática directa inducida a partir de hipocótilo de chile Habanero con medio MS adicionado con 9.05 μM de 2,4-D	25
Figura 1.14 Anormalidades más frecuentemente observadas durante la histodiferenciación de ESs en <i>C. chinense</i>	26
Figura 1.15 Embriogénesis somática en chile Habanero.....	27
Figura 1.16 Diagrama experimental.	29
Figura 2.1 Segmentos de hipocótilo de <i>C. annuum</i> después de 30 días de inducción MS + 2,4-D (9.05 μM).....	39

Figura 2.2 Segmentos de hipocótilo de <i>C. chinense</i> después de 30 días de inducción, MS + 2,4-D (9.05 μ M) 40	
Figura 2.3 Embriogénesis somática de <i>C. annuum</i> obtenida a partir de segmentos de hipocótilo, sin la epidermis, en medio conteniendo 4.52 μ M 2,4-D (Testigo).....	43
Figura 2.4 Caracterización histológica de la Embriogénesis Somática de <i>C. annuum</i> en medio con 2,4-D.	45
Figura 2.5 Variación en el número de embriones somáticos formados a los 30 días de cultivo en <i>C. chinense</i> en diferentes concentraciones de 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA..	47
Figura 2.6 Variación en el número de embriones somáticos formados a los 30 días de cultivo en <i>C. annuum</i> en diferentes concentraciones de 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA.....	47
Figura 2.7 Efecto de diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA), durante el proceso de histodiferenciación en <i>C. chinense</i> (30 días de cultivo).	48
Figura 2.8 Efecto de diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA), durante el proceso de histodiferenciación en <i>C. annuum</i> (30 días de cultivo).....	48
Figura 2.9 Desarrollo y morfología de los ESs de <i>C. chinense</i> var. Mayan Ba' alché formados en presencia de AIA a diferentes concentraciones, (Transferidos a MS sin RCV).....	50
Figura 2.10 Desarrollo y morfología de los embriones somáticos de <i>C. annuum</i> formados en presencia de 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA, a diferentes concentraciones (Transferidos a MS sin RCV).	51
Figura 2.11 ES's en estadios de desarrollo avanzados del tratamiento Dicamba (4.52 μ M) de <i>C. annuum</i> var. California Wonder (Transferidos a MS sin RCV).	51
Figura 2.12 Corte longitudinal del embrión somático de <i>C. annuum</i> desarrollados en presencia de Picloram, Dicamba y AIA, en sustitución del 2,4-D.....	52
Figura 2.13 Embrión somático avanzado mostrando la deformación tipo "alfiler" ("pin"), (Tratamiento: Picloram 2.26 μ M, <i>C. annuum</i> var. California Wonder)	53
Figura 2.14 Embrión somático (<i>C. annuum</i> var. California Wonder) germinado en medio MS - RCV, proveniente del medio MS + Dicamba (2.26 μ M).....	54

Figura 2.15 Variación en el número de embriones formados en diferentes tipos de explantes (provenientes de medio de inducción MS + 9.05 μ M de Picloram), empleando diferentes concentraciones de Picloram.55

Figura 2.16 Respuesta a la formación de embriones de diferentes tipos de explantes a diferentes concentraciones de Picloram, provenientes de medio MS + 9.05 μ M de Picloram (inducción).56

Figura 2.17 Análisis histológico de la embriogénesis somática a partir de explantes de hoja en medio MS + Picloram (2.26 μ M) durante la histodiferenciación.....57

Figura 2.18 Micrografía electrónica de embriones de la especie *Brassica juncea*.58

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN

2. OBJETIVOS

3. METODOLOGÍA

4. RESULTADOS

5. CONCLUSIONES

6. REFERENCIAS

7. ANEXOS

8. GLOSARIO

9. ÍNDICE ALFABÉTICO

10. ÍNDICE DE TABLAS

11. ÍNDICE DE FIGURAS

12. ÍNDICE DE CUADROS

13. ÍNDICE DE GRÁFICOS

14. ÍNDICE DE MAPAS

15. ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

16. ÍNDICE DE VIDEOS

17. ÍNDICE DE AUDIO

18. ÍNDICE DE OTROS MATERIALES

19. ÍNDICE DE OTROS RECURSOS

20. ÍNDICE DE OTROS ELEMENTOS

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de la especie <i>C. chinense</i> (revisado por Woodson et al., 1973).....	7
Cuadro 1.2 Características morfo-agronómicas de <i>Capsicum chinense</i> var. Mayan Ba' alché.....	8
Cuadro 1.3 Ficha técnica de <i>Capsicum annuum</i> var. California Wonder.....	9
Cuadro 1.4. Relación de trabajos de ES desarrollados en <i>Capsicum</i> spp.....	23
Cuadro 2.1 Tratamientos evaluados durante el proceso de histodiferenciación de los ESs inducidos con 9.05 μ M de 2,4-D.	40
Cuadro 2.2 Tratamientos evaluados en la inducción e histodiferenciación de los ESs empleando Picloram y diferentes explantes.	41

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN
2	1.1. OBJETIVO
3	1.2. ALCANCE
4	1.3. DEFINICIONES
5	1.4. REFERENCIAS
6	1.5. ACRÓNIMOS
7	1.6. ORGANIZACIÓN DEL DOCUMENTO
8	1.7. ESTRUCTURA DEL DOCUMENTO
9	1.8. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
10	1.9. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
11	1.10. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
12	1.11. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
13	1.12. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
14	1.13. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
15	1.14. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
16	1.15. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
17	1.16. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
18	1.17. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
19	1.18. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
20	1.19. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
21	1.20. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
22	1.21. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
23	1.22. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
24	1.23. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
25	1.24. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
26	1.25. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
27	1.26. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
28	1.27. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
29	1.28. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
30	1.29. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
31	1.30. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
32	1.31. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
33	1.32. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
34	1.33. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
35	1.34. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
36	1.35. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
37	1.36. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
38	1.37. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
39	1.38. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
40	1.39. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
41	1.40. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
42	1.41. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
43	1.42. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
44	1.43. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
45	1.44. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
46	1.45. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
47	1.46. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
48	1.47. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
49	1.48. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
50	1.49. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
51	1.50. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
52	1.51. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
53	1.52. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
54	1.53. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
55	1.54. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
56	1.55. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
57	1.56. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
58	1.57. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
59	1.58. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
60	1.59. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
61	1.60. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
62	1.61. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
63	1.62. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
64	1.63. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
65	1.64. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
66	1.65. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
67	1.66. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
68	1.67. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
69	1.68. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
70	1.69. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
71	1.70. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
72	1.71. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
73	1.72. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
74	1.73. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
75	1.74. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
76	1.75. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
77	1.76. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
78	1.77. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
79	1.78. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
80	1.79. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
81	1.80. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
82	1.81. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
83	1.82. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
84	1.83. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
85	1.84. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
86	1.85. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
87	1.86. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
88	1.87. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
89	1.88. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
90	1.89. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
91	1.90. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
92	1.91. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
93	1.92. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
94	1.93. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
95	1.94. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
96	1.95. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
97	1.96. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
98	1.97. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
99	1.98. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
100	1.99. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS
101	1.100. DESCRIPCIÓN DE LOS CONTENIDOS

ABREVIATURAS

Embriogénesis somática	ES
Embriogénesis somática directa	ESD
Embriogénesis somática indirecta	ESI
Embriones somáticos	ESs
Ácido 2,4- diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido Indolacético	AIA
Ácido Indolbutírico	AIB
Ácido Naftalenacético	ANA
Medio de cultivo Murashige y Skoog	MS
Regulador de crecimiento vegetal	RCV
Variedad	var.

RESUMEN

Capsicum es uno de los géneros de plantas con mayor importancia comercial a nivel internacional. Está integrado por más de 25 especies, conocidas como chiles. A pesar de la gran demanda de sus productos en el mercado, los chiles no han sido proporcionalmente beneficiados por investigaciones que conduzcan a solucionar los múltiples problemas que lo afectan. La falta de variedades tolerantes a plagas y enfermedades, así como al estrés que el ambiente les impone (elevadas temperaturas, déficit de agua, salinidad, etc.) son algunas de las problemáticas que requieren ser atendidas de manera multidisciplinaria, con mayor prioridad. Sin embargo, la regeneración de plantas es el proceso fundamental que determina el éxito para cualquiera de sus aplicaciones biotecnológicas. *Capsicum* es reconocido como un género severamente recalcitrante al desarrollo de brotes y embriones, a plantas. A pesar de que en la actualidad contamos con protocolos eficientes y reproducibles de embriogénesis somática en *C. annuum* y *C. chinense*, los embriones somáticos presentan anomalías en el meristemo apical que impide su conversión en plantas. Se están estudiando diferentes factores que pudieran estar provocando este comportamiento en las especies de este género. Aunque aún se desconocen las causas que provocan estas deformaciones, existe la posibilidad de que la dependencia que ha mostrado al 2,4-D a lo largo del proceso (inducción e histodiferenciación) pudiera estar provocando esta incapacidad en los embriones somáticos. En este contexto, se propuso evaluar la respuesta de *C. annuum* y *C. chinense* a otras auxinas (Picloram, Dicamba y AIA). Los resultados evidenciaron que el 2,4-D pudo ser sustituido por Picloram, incluso desde la inducción del proceso, en *C. chinense*, y con cualquiera de las tres auxinas evaluadas durante la histodiferenciación, para ambas especies, aunque resultaron más favorables al proceso en cuanto a calidad de los embriones somáticos de *C. chinense*, cuando se utilizaron 4.52 μM de AIA o de Dicamba para *C. annuum*. AIA favoreció significativamente el número de embriones formados, en *C. annuum*, mientras que, Picloram resultó particularmente beneficioso en la etapa de desarrollo de los embriones somáticos en *C. chinense*. A pesar de ser eliminado el 2,4-D del medio de cultivo se observó la persistencia de las deformaciones en los ES formados, lo que permitió descartar al 2,4-D como responsable de la recalcitrancia en el género *Capsicum*.

The text in this section is extremely faint and largely illegible. It appears to be a summary or abstract of a document, but the specific details are difficult to discern. The text is organized into several paragraphs, with some lines appearing to be bolded or otherwise emphasized. The overall structure suggests a formal report or academic paper.

ABSTRACT

Capsicum is one of the plants genus more commercially important worldwide. It hosts over 25 species, known as chili peppers. Although the high demand for their products in the international market, in Mexico chilies are not proportionally beneficial from research leading to resolve the multiple problems that affect it: the lack of tolerant varieties to pests and diseases, as well as to the environmental stress. High temperatures, lack of water and soil salinity are some of the issues that required multidisciplinary attention, with higher priority. Biotechnology provides us with highly efficient tools to achieve in a very short time, genetic materials more tolerant, more productive and better adapted to the environmental conditions. However, the regeneration of plants is the fundamental process that determines the success for any of their applications. *Capsicum* is recognized as a severely recalcitrant genus due to the failure of the shoots elongation and to the conversion of the embryos in plants. Even though at present we have efficient and reproducible protocols of somatic embryogenesis in *C. annuum* and *C. chinense*, somatic embryos have abnormalities present in the apical meristem that impedes its conversion into plant. Different factors which could be provoking this behavior in some species of this genus are presently being studied. Even though causes of these deformations are still unknown, it is possible that the dependency showed to 2,4-D throughout the process (induction and histodifferentiation) could be leading to such an incapacity in the somatic embryos. In this context it was proposed to evaluate the response of *C. annuum* and *C. chinense* to other auxins (Picloram, Dicamba and AIA). The results showed that 2,4-D could be substituted for Picloram, even from the induction of the process in *C. chinense*. And during the histodifferentiation the 2,4-D could be substituted with the other auxins assessed for both species (*C. annuum* and *C. chinense*). Although for the process resulted more favorable regarding quality of the somatic embryos of *C. chinense* when 4.52 μM of Dicamba and 4.52 μM of AIA (*C. annuum*) were used. AIA significantly favored the number of embryos formed in *C. annuum*, while Picloram proved particularly beneficial in the development stage of the somatic embryos in *C. chinense*. Despite having removed the 2,4-D from the culture medium, the abnormalities observed were persistent. Inferred that 2,4-D is not responsible for the recalcitrance of genus *Capsicum*. PIN, which has been associated with the auxin transport, was the type deformation that occurred more frequently.

INTRODUCCIÓN

En la familia de las Solanaceas se ubica el género *Capsicum*, al que pertenecen todos los chiles. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente entre Bolivia y Perú, donde se ha reportado el hallazgo de semillas ancestrales. A partir de este centro de origen se inició a la diseminación del género al resto del continente americano (Pickersgill, 1997).

Su domesticación, empezó aproximadamente hace 7,000 años, su cultivo se remonta entre los años 5,200 y 3,400 a.C. En la actualidad se cuentan con alrededor de 22 especies silvestres, 5 de las cuales ya han sido domesticadas (*Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., y *C. pubescens* Ruiz & Pav) (McLeod et al., 1982). La gran mayoría de los chiles cultivados pertenece a la especie *C. annuum*.

Este recurso genético, tiene un valor incalculable para la humanidad, debido a la multiplicidad de usos que estos tienen, los chiles se han convertido en ingredientes esenciales en la gastronomía, a manera de condimentos o en la elaboración de salsas. También se han empleado en la elaboración de colorantes naturales. Y al extraer la capsaicina u otros metabolitos secundarios, sirve en la fabricación de agentes farmacológicos, o productos de interés industrial. Es por ello que las especies del género *Capsicum* se han convertido en plantas de interés socio-económico para México y particularmente para los estados productores como Yucatán.

Uno de los propósitos que tiene la humanidad es el realizar mejoramiento genético continuo a plantas de interés agronómico para poder afrontar los diversos factores bióticos y abióticos. Las investigaciones dirigidas a la obtención de la embriogénesis somática (ES) tienen un amplio campo de aplicación al usar herramientas biotecnológicas que facilitan este mejoramiento. Además, la ES es el método más adecuado de propagación *in vitro*. Teniendo algunas ventajas sobre la organogénesis, así como, la generación de plantas completas con el meristemo apical y la raíz primaria, evitando la senescencia, rejuvenecimiento, y la rizogénesis.

Hoy en día, existen numerosos reportes para el género *Capsicum* enfocados a la ES, la mayoría se han realizado en *C. annuum* (Bárány et al., 2005; Binzel et al., 1996;

Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Lakshmi Sita, 1993; Khan *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Koleva-Gudeva *et al.*, 2007; Steinitz *et al.*, 2003; Supena y Custers, 2011). Sin embargo se ha mencionado que la regeneración *in vitro* es difícil de lograr, y en los casos que se ha conseguido, su eficiencia es baja, por lo que se le considera como un género recalcitrante a la morfogénesis (Ochoa-Alejo y Ramirez-Malagon, 2001). De ahí la importancia de estudiar los factores que están involucrados en este proceso morfogénico para poder establecer un sistema de regeneración eficiente.

Avilés Viñas en el 2013 reportó un protocolo de inducción de embriogénesis somática directa para *C. chinense*, que resultó altamente reproducible y eficiente dado el elevado número de embriones obtenidos por explante, sin embargo, existe un alto índice de embriones deformados y una baja tasa de conversión en planta. Además este protocolo fue posible emplearlo en *C. annuum*, obteniendo resultados similares (Datos sin publicar).

Para poder optimizar el proceso y mejorar el desarrollo de los ESs, es imprescindible estudiar los factores que afectan la ES. Alguno de estos son, la elección del genotipo y el explante, del medio de cultivo, de los reguladores de crecimiento, de la fuente de nitrógeno, de la fuente de carbono y de la adición de compuestos naturales (Ji *et al.*, 2011). En la mayoría de los estudios en donde es necesario el uso de reguladores de crecimiento durante este proceso, son las auxinas y las citocininas las que juegan un papel principal (Fehér *et al.*, 2002; Fischer-Iglesias *et al.*, 2001; Gaj, 2004). Las auxinas 2,4-D, NAA, IAA, Picloram y Dicamba son las más utilizadas para la obtención de la ES en diferentes especies (Raemakers *et al.*, 1995). En estudios relacionados a la respuesta de diferentes fuentes de auxinas en leguminosas, se hace mención que el uso del 2,4-D presenta una mayor frecuencia de anomalías morfológicas en los embriones que impiden la conversión a planta (Lakshmanan y Taji, 2000).

En este trabajo se propuso estudiar el efecto que tienen diferentes auxinas durante el proceso de inducción e histodiferenciación de los embriones somáticos (ESs) para las especies de *C. annuum* variedad California Wonder y *C. chinense* variedad Mayan Ba' alché, partiendo del protocolo reportado por Avilés-Viñas (Avilés-Viñas *et al.*, 2013), con el fin de mejorar la calidad de los embriones obtenidos.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

La especie *C. chinense*, conocida comúnmente como chile habanero, es uno de los chiles con mayor pungencia. Su centro de origen se localiza en el Amazonas. En tiempos precolombinos se dispersó a diferentes islas de la Cuenca del Caribe y de éstas, a la Península de Yucatán (DeWitt y Bosland, 1993). Dada su importancia en la Península de Yucatán se le ha otorgado la denominación de origen de esta especie, merito que comparte con los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche desde el año 2010. Esto se debe al hecho de que la mayor diversidad de la especie en el mundo se localiza en la Península, los frutos de las accesiones encontradas en la región varían en forma, tamaño y color, además la característica organoléptica peculiar de este cultivo le da una gran plusvalía.

La clasificación taxonómica de esta especie (Cuadro 1.1), fue realizada por el botánico Australiano Nikolaus Joseph von Jacquin (1727- 1817).

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de la especie *C. chinense* (revisado por Woodson *et al.*, 1973).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>C. chinense</i> Jacq.

A pesar de ser una especie del Continente Americano, el botánico Jacquin lo nombró *C.*

chinense, al provenir sus materiales de estudio de Lanchow, China, Ac. 751 (P. I. 157,062) (Smith y Heiser Jr, 1957), mencionándolo como un suceso lamentable al no ser este su centro de origen.

En la actualidad se trabaja en la generación de variedades promisorias de chile habanero de la Península de Yucatán. Una de las variedades registradas y certificadas es la variedad Mayan Ba' alché, seleccionada como modelo de estudio en la realización de este trabajo. En el Cuadro 1.2 se presentan sus principales características morfo-agronómicas.

Cuadro 1.2 Características morfo-agronómicas de *Capsicum chinense* var. Mayan Ba' alché.

Fruto	Color	Naranja	
	Largo	4.11 cm	
	Ancho	2.96 cm	
	No. de lóculos	3	
	Peso	8.69 g	
	Pungencia	626.92 SHU	
	Rendimiento/ planta	4.76 kg	
	No. de frutos/ planta	428	

1.2 PIMIENTO MORRON (*Capsicum annuum* L. var. California Wonder)

Capsicum annuum L. es la especie que cuenta con la mayor cantidad de variedades cultivadas dentro del género. Una de ellas es el pimiento morrón, *Capsicum annuum* var. California Wonder, utilizada como modelo de este estudio. En el Cuadro 1.3, se presentan sus principales características morfo-agronómicas.

Cuadro 1.3 Ficha técnica de *Capsicum annuum* var. California Wonder

Fruto	Forma del fruto	Cuadrada	
	No. de lóculos	3 o 4	
	Tamaño	10 cm de largo / 9 cm de ancho	
	Peso	225 a 250 gramos	
	Color	Rojo al madurar	
	Grosor	Medio	

A pesar de ser el pimiento originario de América, en la actualidad casi la mitad del pimiento que se consume en el mundo se produce en el área del Mediterráneo (Namesny, 1996). Su introducción en Europa, África y Asia se asocian con el viaje de Colón al Continente americano (Heiser, 1995). Este es un cultivo que se ha adaptado a casi todas las zonas templadas y cálidas del mundo. Sus frutos pueden ser consumidos tanto en fresco como en conserva.

1.3 CULTIVO *in vitro* DE PLANTAS

El cultivo *in vitro* de plantas es una herramienta biotecnológica, que consiste en cultivar y manipular las plantas en condiciones artificiales, axénicas y controladas como la temperatura, intensidad y duración de luz, nutrición, consistencia y pH del medio; a partir del cultivo de protoplastos, células aisladas, callo, embriones, órganos y tejidos; hasta el cultivo de plantas completas (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999).

El cultivo *in vitro* se puede emplear para resolver problemas básicos o aplicados de la biología vegetal. Se ha utilizado para la producción de metabolitos secundarios, de interés farmacéutico, para la conservación de especies, en los bancos de germoplasma, en la obtención de híbridos somáticos, en los programas de mejoramiento genético y en la micropropagación de plantas (Pierik y Ayerbe Mateo-Sagasta, 1990), todo esto gracias a los avances en el estudio de la morfogénesis.

Los primeros intentos de cultivo *in vitro* fueron reportados en el año 1902 por el investigador botánico Gottlieb Haberlandt. Sus experimentos dieron inicio al desarrollo de una nueva herramienta de estudio, lo cual permitió tener un enfoque diferente para el estudio y comprensión de los fenómenos fisiológicos y morfológicos de las plantas (Laimer y Rücker, 2003).

El descubrimiento de los reguladores del crecimiento permitió que avanzara en gran medida las técnicas del cultivo *in vitro*. El primer regulador aislado fue el 3-ácido indolacético (AIA) en el año 1885. Sus propiedades de división celular fueron descubiertas 31 años después de los experimentos de Haberlandt (Laimer y Rücker, 2003). Y su existencia fue demostrada por F. W. Went en 1928, al poder interrumpir el crecimiento de plántulas de avena a las cuales se les secciono el coleoptilo y restableciéndolo cuando se le volvía a colocar (Salisbury, 1994).

1.4 LAS FITOHORMONAS

Tomando en cuenta que las células de las plantas son estáticas, al tener una la pared celular rígida, dependen de señales móviles para desencadenar una reprogramación en los tejidos, esta función la realizan pequeñas moléculas de señalización endógenas que coordinan el desarrollo y los procesos fisiológicos en la planta, conocidas como fitohormonas (Davies, 2010). Además, les permiten a las plantas sobrevivir a constantes cambios y adaptarse a ambientes adversos, al moldear sus formas y optimizar sus metabolismos para demandas específicas (Tanaka *et al.*, 2006).

Estos compuestos están presentes a muy bajas concentraciones y actúan ya sea localmente, cerca del sitio de la síntesis, o en los tejidos distantes. Los reguladores del crecimiento son capaces de influir en el desarrollo de la planta, y dentro de sus características que las distinguen podemos mencionar que no siempre presentan un lugar específico para su síntesis (Kaldewey, 1984). Hoy en día se sabe que la mayoría de sistemas fisiológicos responden a más de una señal química, y cada compuesto puede afectar a muchos sistemas (Matthysse y Scott, 1984). También se conocen sistemas que responden de acuerdo al balance de compuestos que se encuentran en el tejido (Wareing, 1977), o por cambios espacio-temporal (gradientes) en la sensibilidad del tejido al compuesto (Trewavas, 1981). A través de los años el grupo de reguladores del

crecimiento ha ido creciendo, en la actualidad lo componen el ácido abscísico (ABA), las auxinas, los brasinoesteroides (BRs), las citocininas, el ácido giberélico (GA), el etileno, el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico, (Figura 1.1).

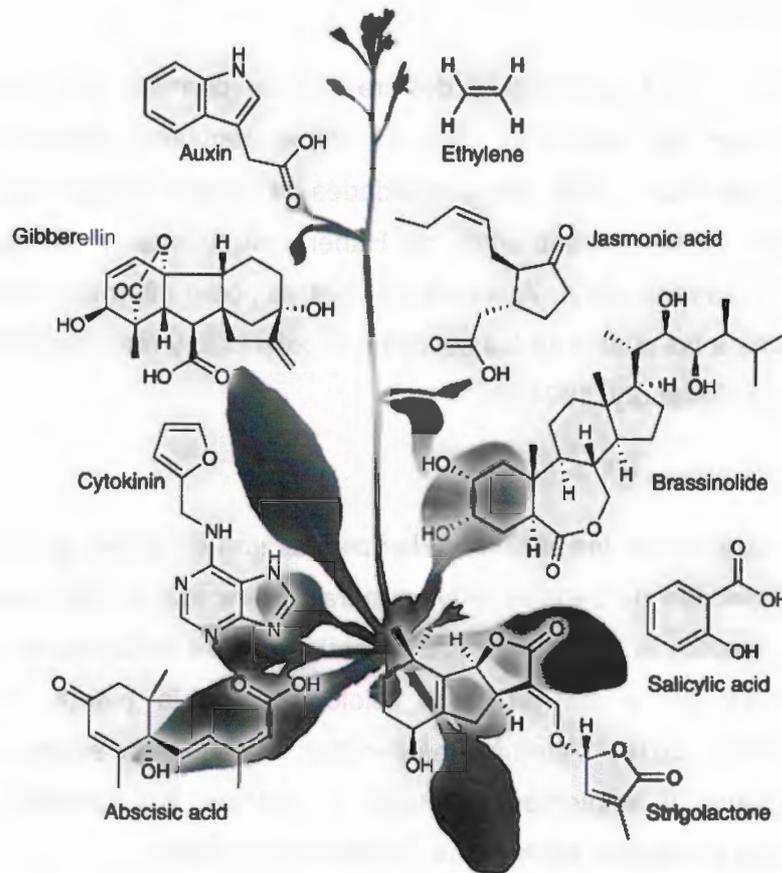


Figura 1.1 Las fitohormonas regulan todo el crecimiento y desarrollo de la planta.

Fuente: (Santner *et al.*, 2009)

En conjunto, estos compuestos regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Y sus niveles son muy regulados y responden cambios en el ambiente. Además, las plantas pueden utilizar varias moléculas peptídicas para regular diversas respuestas del crecimiento como las poliaminas.

1.5 ROL DE LAS AUXINAS DURANTE EL PROCESO EMBRIONARIO

Las auxinas, son moléculas señal que tienen una distribución diferencial en los tejidos

y están involucradas en muchos aspectos del desarrollo de la planta. La forma de la planta se encuentra en gran parte controlada por la auxina, AIA, que juega un papel muy importante durante todas las etapas de crecimiento y desarrollo de la planta, como patrones del embrión y de la raíz, especialización del crecimiento trópico, desarrollo vascular, iniciación de la raíz lateral, patrones de formación del embrión y raíz, también la dominancia apical y la formación de tejido vascular (Figura 1.2).

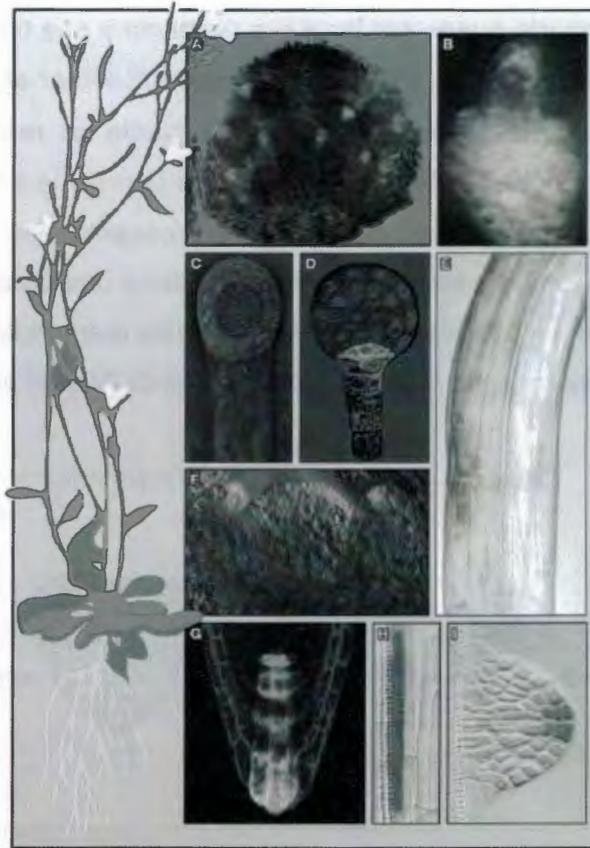


Figura 1.2 Patrones de distribución de la auxina durante el desarrollo de *Arabidopsis*. Fuente: (Petrášek y Friml, 2009)

Todas estas funciones se deben a su complejo control, que involucra la biosíntesis, el transporte y vía de señalización que desencadena (Tanaka *et al.*, 2006). El nivel de auxina es altamente regulado; se sabe que el AIA proviene del triptófano, y se le conocen al menos dos vías de síntesis, la vía de la triptamina y la del ácido índole 3 pirúvico, aunque se puede sintetizar AIA a partir de índole sin tener que pasar por triptófano. Estas

vías están reguladas por diferentes familias de genes, cuyos efectos pueden llegar a traslaparse (Santner *et al.*, 2009). Se piensa que las auxinas se sintetizan de manera localizada en las plantas, en regiones jóvenes de crecimiento, predominantemente en brotes apicales, hojas jóvenes y semillas en desarrollo (Ljung *et al.*, 2001; Normanly *et al.*, 1993), y casi todos los tejidos de la planta pueden responder en cierto momento al estímulo de la auxina (Davies, 2010).

Se conoce que su transporte puede ser local o a distancia y que tienen un papel esencial en muchos de los aspectos del crecimiento y desarrollo (Santner *et al.*, 2009). Por lo que, una vez sintetizada, su distribución a través de la planta se realiza por medio de un sofisticado sistema de transporte vía célula-célula, que permite la acumulación de auxinas en puntos localizados formándose gradientes de concentración en los tejidos. Este transporte polar es específico a las auxinas libres, y tiene una característica de moverse estrictamente unidireccional (Lomax *et al.*, 1995). De esta manera la misma toma parte en todos los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta (Vieten *et al.*, 2007).

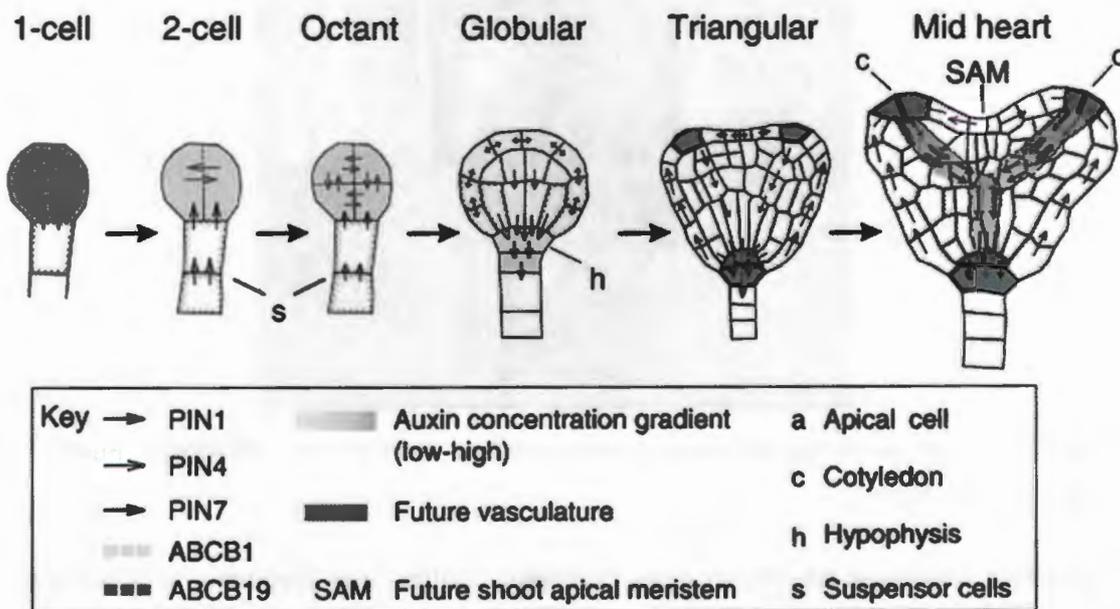


Figura 1.3 Representación gráfica de los gradientes de auxina y su transporte durante el proceso de embriogénesis. Fuente: (Petrášek y Friml, 2009)

Este transporte se ha estudiado durante las primeras divisiones celulares en el desarrollo

de la planta; la embriogénesis. En la Figura 1.3 se puede observar la importancia que tiene la auxina en los diferentes estadios. La distribución diferencial de la auxina controla importantes pasos del desarrollo de los embriones, como la diferenciación de los ejes apical y basal, y la formación de cotiledones. Se ha descrito la participación de los transportadores de salida de la auxina PIN1, PIN4 y PIN7 en la distribución diferencial de la auxina durante la embriogénesis, lo que sugiere que estas juegan un papel muy importante en los patrones de formación del embrión (Petrášek y Friml, 2009).

1.6 LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La ES no es un fenómeno artificial, se presenta de manera natural y espontánea en algunas especies vegetales como *Kalanchoe daigremontiana* (Figura 1.4), y constituye un tipo de apomixia (embrionía adventicia), descrito por primera vez por Strasburges en 1878 (Merkle *et al.*, 1995).

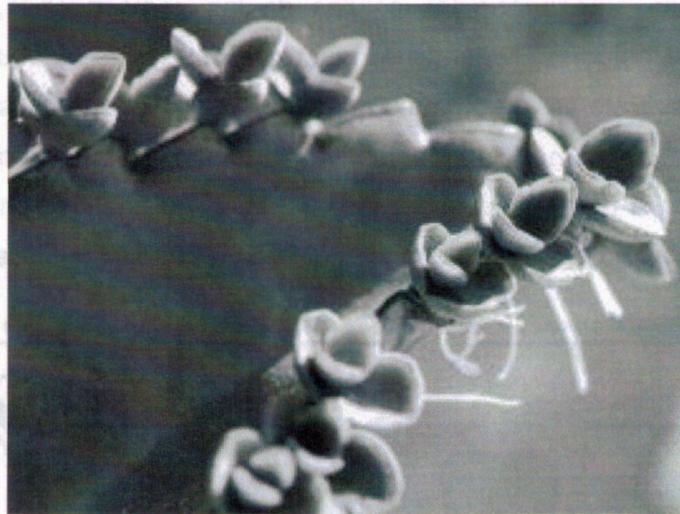


Figura 1.4 *Kalanchoe daigremontiana*, formación embriones adventicios.

Hace más de un siglo Haberlandt, pudo visualizar la capacidad que tienen las células vegetales para formar estructuras individuales que permitieran regenerarse a plantas completas, a esta capacidad la llamo totipotencia (Haberlandt, 1902). Con sus trabajos permitió que se fundara el cultivo *in vitro* de planta superiores (Härtel, 1999). A finales de los años 1950's este proceso fue reportado con el modelo de zanahoria, y se le dio el nombre de embriogénesis somática (ES), los grupos de trabajo estaban dirigidos por

Stewards y Reinert (Reinert, 1959; Steward *et al.*, 1958), actualmente a la ES se le describe como el proceso en el cual una célula somática cambia su conformación para formar una célula con capacidad embriogénica, estos involucran cambios bioquímicos y morfológicos, y los embriones formados tienen la capacidad de formar una planta completa.

Entre los eventos más representativos que ocurren durante la ES se encuentran; la dediferenciación celular, la activación de la división celular, la reprogramación en la expresión génica. Esto lleva a cambios fisiológicos y metabólicos importantes. Las arabinogalactano proteínas extracelulares que se producen como resultados de estos cambios pueden resultar de utilidad como indicador de competencia embriogénica (Yang y Zhang, 2010).

Durante el desarrollo embrionario las células de las angiospermas, éstas pasan por etapas transitorias o estadios, llegando a pasar por estructuras globulares, de corazón, torpedo y cotiledonal. Este es un proceso que simula la embriogénesis cigótica (EC), que ocurre a través de la fecundación de las células gaméticas (Figura 1.5). Cuando el desarrollo se efectúa a partir de una célula o conjunto de células somáticas y no por la fecundación de células gaméticas se conoce como ES (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002).

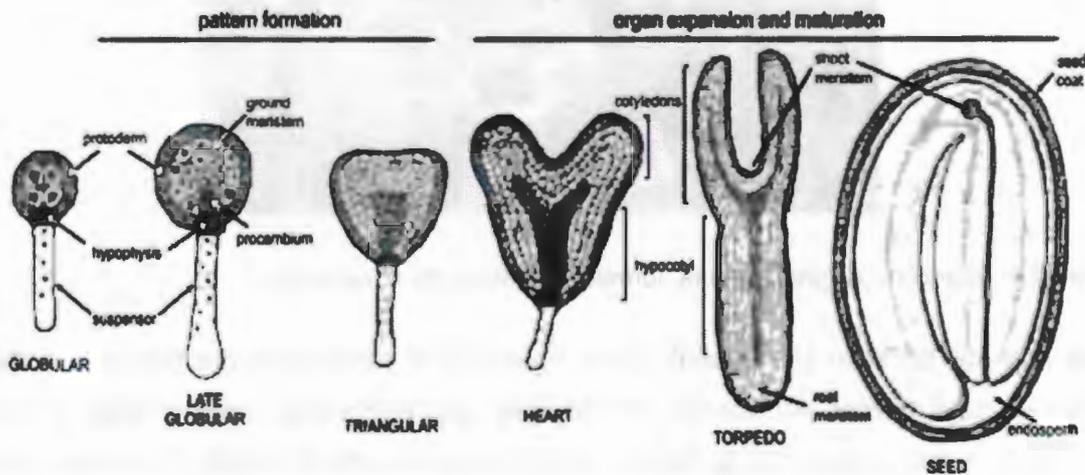


Figura 1.5 Representación esquemática del desarrollo embrionario en angiospermas. Fuente: (George *et al.*, 2008)

Se sabe que durante el desarrollo embrionario se establece el eje apical – basal, y se obtiene la simetría bilateral (De Smet *et al.*, 2010). En los estudios morfológicos efectuados en la EC de angiospermas, se ha observado que la primera división del cigoto se realiza de manera asimétrica dando lugar a una pequeña célula apical que dará origen al embrión y una célula larga basal que formara el suspensor. Esta división se debe a que existe una polaridad en la primera célula posteriormente. Divisiones posteriores específicas conducirán a la formación del embrión globular y su transición al estado cotiledonal, pasando por el estado corazón en donde ocurre la iniciación del primordio radicular, seguido por el primordio apical (Dodeman *et al.*, 1997), a partir de esta etapa el embrión pasa a la etapa de maduración.

1.7 EMBRIOGENESIS SOMATICA DIRECTA E INDIRECTA

Actualmente los protocolos de ES se pueden clasificar en embriogénesis somática directa e indirecta, dependiendo del grado de diferenciación que sufre el tejido de donde se desarrollan los embriones. De la misma manera en que son evaluados los otros procesos morfológicos en el cultivo *in vitro* (la organogénesis) Figura 1.6

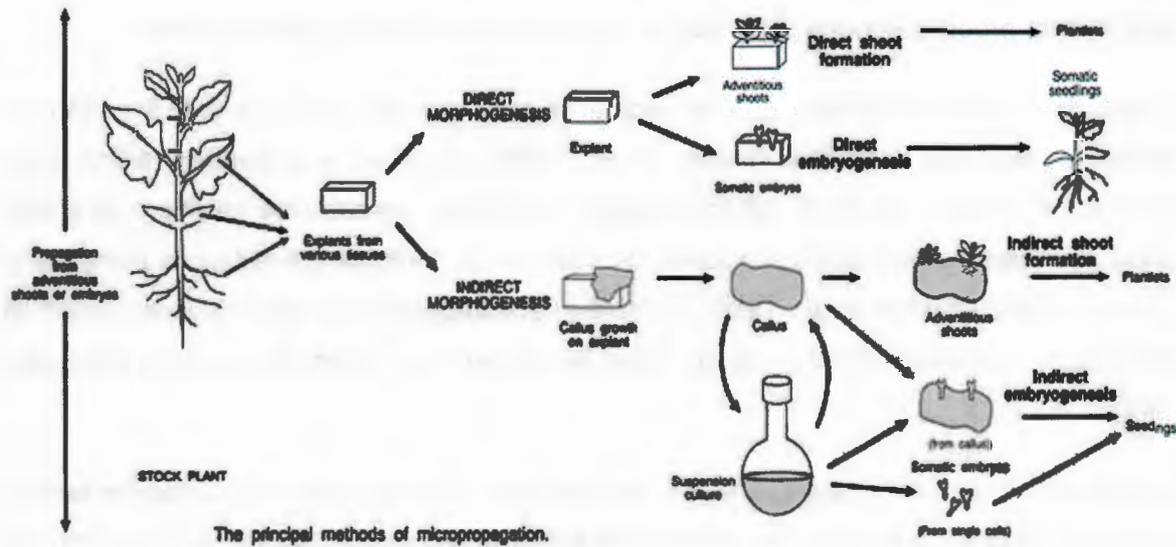


Figura 1.6 Principales métodos de propagación *in vitro*.

Fuente: (George *et al.*, 2008)

La embriogénesis somática directa, ESD, se conoce al proceso en el que desarrollo de los embriones se produce directamente sobre la superficie del explante. La desdiferenciación del tejido es mínimo (Maheswaran y Williams, 1986). La embriogénesis somática indirecta, ESI, implica que el tejido se desdiferencie por completo, con lo cual se forma un tejido calloso. A partir del mismo se empiezan a formar las estructuras bipolares. Este último proceso es el menos adecuado en los trabajos de micropropagación, al presentarse una mayor proporción de cambios genéticos y epigenéticos.

1.8 LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Aun cuando han transcurrido más de 50 años del estudio de la ES desde que se reportó por primera vez la ES en zanahoria (Reinert, 1959; Steward, 1958), poco se conoce sobre los procesos bioquímicos y moleculares que desencadenan el desarrollo embrionario. Las moléculas señales, en específico los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), han demostrado jugar un papel importante durante las diferentes etapas del desarrollo y formación del embrión (Dodeman *et al.*, 1997), como lo son las auxinas. Sin embargo, no se puede asumir que este es el único grupo de fitohormonas que participan durante éste proceso aunque si ha sido el más estudiada (Muller y Sheen, 2008).

Comúnmente las condiciones que se requieren para que se produzca la ES varían en diferentes especies vegetales (Henry *et al.*, 1994). Ésta va a depender, entre otros factores, del balance de RCV, las condiciones osmóticas, los cambios en el pH, el efecto de los aminoácidos, las concentraciones de sales, o los tratamientos térmicos (Armstrong y Green, 1985; Rhodes *et al.*, 1986). También va a depender de otros factores como: el genotipo, el explante o tejido y de su etapa de desarrollo o edad del explante (Carman, 1990).

Durante la ES se diferencian dos fases: la inducción y la expresión o histodiferenciación. Durante la fase de inducción las células somáticas diferenciadas adquieren competencia embriogénica, normalmente estas células forman parte del tejido parenquimático (Dodeman *et al.*, 1997).

Las auxinas y las citocininas han sido los RCV más utilizados para la inducción de la ES en plantas. Solo pocos sistemas de regeneración no requieren de RCV para su inducción.

En el trabajo realizado por Gaj en el 2004 quien evaluó 124 protocolos de ES existentes. Encontrando que solo el 7% de éstos no utilizaban RCV. Mientras que el 80% de los protocolos emplea auxinas solas o en combinación con citocininas. En el 65% de los protocolos adicionaban 2,4-D solo o en combinación con otro RCV (Gaj, 2004) (Figura 1.7).

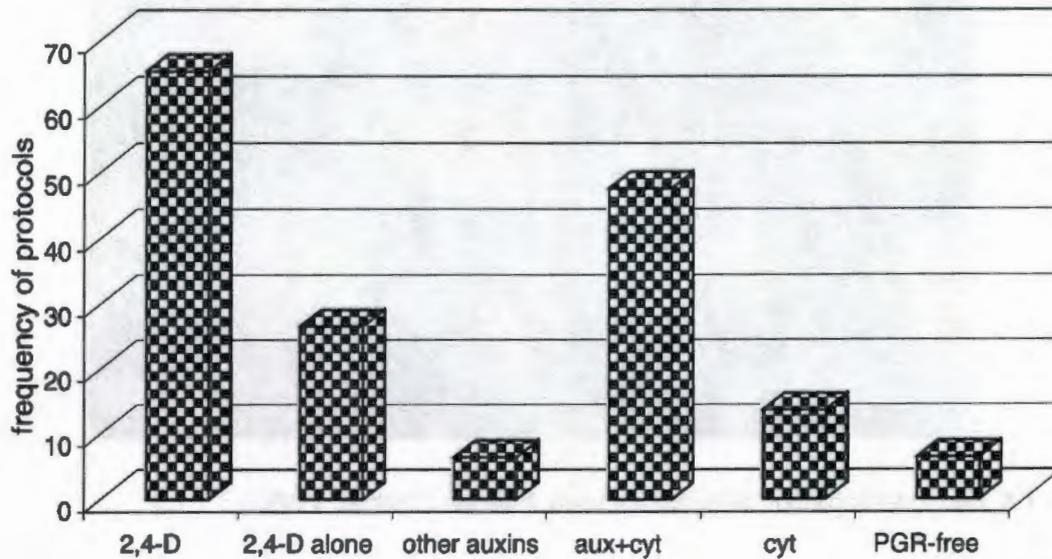


Figura 1.7 RCV empleados en medios de inducción de acuerdo a 124 protocolos de ES.

Fuente: (Gaj, 2004)

En el modelo clásico de ES en zanahoria, se emplea una concentración alta de la auxina ácido 2,4-dichlorofenoxiacético (2,4-D), para lograr la inducción a la ES (Dodeman *et al.*, 1997). Se puede considerar a las auxinas como el principal RCV implicado en la inducción de este proceso (Feher *et al.*, 2002). Sin embargo, aparte del rol de los RCV, se sabe que la ES también se puede desencadenar por cambios en condiciones de luz, asfixia, gradientes de calcio, o diversos factores relacionados con el estrés oxidativo.

1.9 LA HISTODIFERENCIACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Después de la inducción, la ES continua a la fase de histodiferenciación. Donde las células embriogénicas se diferencian para formar embriones somáticos (Jimenez, 2001). Dicha diferenciación transita por los diferentes estadios ontogenéticos similares a su contraparte cigótica. En dicotiledóneas corresponden a los estadios; el globular, corazón,

torpedo y cotiledonar, (Figura 1.8). En monocotiledóneas los embriones pasan por los estadios; globular, coleoptilar y de escutelo.



Figura 1.8 Histodiferenciación de la ES en soya. Fuente: (Thorpe, 1995)

Además, durante esta etapa se da inicio a la formación de órganos que hacen posible que el embrión en estado globular se desarrolle hasta alcanzar el estado cotiledonar (Carman, 1990). Se sabe que las manipulaciones del medio que tengan un efecto negativo durante esta etapa perjudica la conversión de estos ES a planta (Thorpe, 1995).

De manera general, para que la ES pueda continuar al proceso de histodiferenciación y permita la formación del estadio globular y su subsecuente maduración requiere que se suprima o al menos se reduzca la concentración de las auxinas, a un nivel que permita un apropiado desarrollo del embrión. Así como se esquematiza en la Figura 1.9.

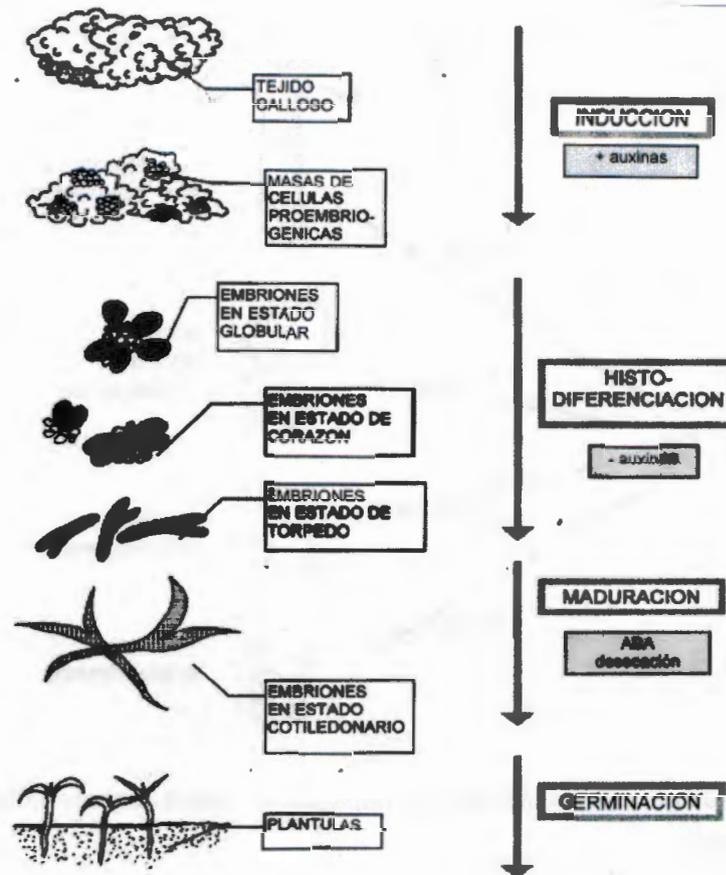


Figura 1.9 Proceso de la embriogénesis somática. Fuente: (Pérez Molphe Balch *et al.*, 1999)

Existen varios ejemplos de protocolos reportados en donde los ESs continúan desarrollándose bajo las mismas condiciones de la inducción. No obstante los embriones somáticos obtenidos tienen poca calidad (Caligo *et al.*, 1985; Fobert y Webb, 1988). En la mayoría de los protocolos los ESs son sometidos de manera rutinaria a auxinas durante el proceso de histodiferenciación. Sin embargo, la exposición de la auxina de manera continua resulta perjudicial para la adecuada histodiferenciación de los ESs (Figura 1.10).

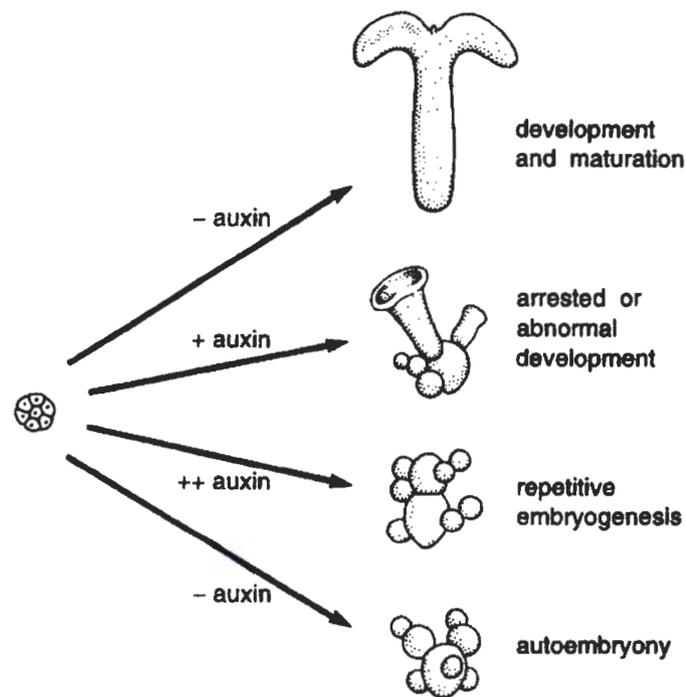


Figura 1.10 Representación esquemática del papel de la auxina durante la histodiferenciación.
Fuente: (Thorpe, 1995)

Halperin y Wetherell fueron los primeros en reportar que el mantenimiento de embriones somáticos en el estadio globular con 2,4-D provocaba una inhibición en su histodiferenciación o la presencia de anomalías en el desarrollo del meristemo apical (Halperin y Wetherell, 1964). Observaciones similares fueron reportadas en *Coronilla varia* L., y también durante el desarrollo de embriones somáticos de soya (Duškova *et al.*, 1990; Parrott *et al.*, 1988).

Otro ejemplo sobre el efecto que tienen las auxinas en la histodiferenciación es el reportado por Kamada en el modelo de zanahoria, al comparar la inducción a la ES con dos protocolos uno con Cadmio y el otro utilizando 2,4-D, constató una conversión a planta del 50% y un 15% de los embriones respectivamente, indicando que el uso de este regulador provocaba un alto número de deformaciones en los ESs formados (Kamada *et al.*, 1989).

El efecto negativo de las auxinas en el desarrollo del meristemo no es un fenómeno

extraño dado el papel que tienen las auxinas en la supresión de los meristemos laterales en la planta (Merkle *et al.*, 1995). Además muchos protocolos omiten la utilización de las auxinas durante esta fase de desarrollo, lo que sugiere que no son universalmente requeridas para el adecuado desarrollo de los embriones somáticos.

En la embriogénesis somática de abeto *Picea glauca* y *Picea engelmannii*, se precisa la adición al medio de ácido índole-3-butírico (AIB) en combinación con el ácido abscísico (ABA) para mejorar el desarrollo de los cotiledones y su morfología (Roberts *et al.*, 1990). Esto sugiere que algunas especies no cuentan con suficientes auxinas endógenas para continuar su desarrollo normal durante su histodiferenciación. Si este fuere el caso, la adición de auxinas, a una baja concentración, podría ser necesaria para el correcto desarrollo de los ESs en estas especies (Thorpe, 1995).

1.10 EMBRIOGENESIS SOMATICA EN EL GENERO *Capsicum*

Los avances en la elaboración de protocolos de regeneración del genero *Capsicum* ha avanzado lentamente, con respecto a otros miembros de la familia de las Solanáceas. Los diferentes estudios realizados han identificado algunos problemas relacionados con una naturaleza recalcitrante a la morfogénesis del género, como la formación de brotes en roseta, la ausencia del meristemo apical en ESs y la dependencia genotípica lo que han clasificado al género como recalcitrante (Kothari *et al.*, 2010).

En el año 1993 se reportó por primera vez la embriogénesis somática en *Capsicum* (Harini y Lakshmi Sita, 1993). En sus experimentos utilizaron como explante el embrión cigótico, y un medio de cultivo adicionado con 2,4-D y agua de coco. En el Cuadro 1.4 se presentan otros reportes de ES en *Capsicum annum* y *C. chinense*, donde se utilizan diferentes explantes (embrión cigótico, hipocótilo, cotiledón, hojas, anteras y micrósporas), y diversos reguladores de crecimiento. En la mayoría de los casos se ha utilizado una auxina como el 2,4-D en alguna parte del proceso (Avilés-Viñas *et al.*, 2013; Bárány *et al.*, 2005; Binzel *et al.*, 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Harini y Lakshmi Sita, 1993; Khan *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008; Koleva-Gudeva *et al.*, 2007; López-Puc *et al.*, 2006; Santana-Buzzy *et al.*, 2009; Steinitz *et al.*, 2003; Supena y Custers, 2011; Zapata-Castillo *et al.*, 2007).

En el trabajo realizado por Steinitz *et al.* (2003), se evaluó el efecto de 3 diferentes auxinas; 2,4-D, Centrofenoxina y Quinclorac, para la inducción de ESD en *C. annuum* a partir de embrión cigótico. Estos autores lograron la ES utilizando las tres auxinas; sin embargo la concentración requerida para ello varió considerablemente, 4.5 μM , 13 μM y 40 μM , respectivamente. Lo que sugiere variaciones en la eficiencia de estas auxinas para inducir este proceso.

Cuadro 1.4. Relación de trabajos de ES desarrollados en *Capsicum* spp.

Especie	Explante	Regulador	Referencias
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico inmaduro	10% CW, 2,4-D	Harini y Lakshmi Sita (1993)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico maduro	2,4-D	Buyukalaca and Mavituna (1996)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico inmaduro	2,4-D y TDZ	Binzel et al. (1996)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico	2,4-D y Centrofenoxina	Steinitz et al. (2003)
<i>C. annuum</i>	Micrósporas	2,4-D	Bárány et al. (2005)
<i>C. annuum</i>	Hipocótilos	TDZ y IBA	Khan et al. (2006)
<i>C. annuum</i>	Anteras	2,4-D y IAA	Koleva-Gudeva et al. (2006)
<i>C. annuum</i>	Micrósporas	Choque térmico	Kim, M., Jang, I. et al. (2008)
<i>C. annuum</i>	Micrósporas	AIA y Zea	Supena, E., y Custers, J. (2011)
<i>C. chinense</i>	Hoja, cotiledón, hipocótilo, embrión cigótico	2,4-D	López-Puc et al. (2006)
<i>C. chinense</i>	Hoja, cotiledón, hipocótilo, embrión cigótico	2,4-D	Zapata-Castillo et al. (2007)
<i>C. chinense</i>	Hipocótilos	2,4-D	Santana-Buzzy et al. (2009)
<i>C. chinense</i>	Hipocótilos	2,4-D	Avilés-Viñas et al. (2012)

Steinitz *et al.*, (2003) encontraron que durante el proceso de ES los ESs se desarrollan a partir de la epidermis y sub-epidermis del embrión cigótico (Figura 1.11). La eficiencia del proceso (número de embriones por explante) resultó baja. En promedio se formaron 6 embriones por explante. Una vez transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento se observaron deformaciones que no permitieron la conversión a planta. Alguno de estos

embriones carecían de meristemo apical, o bien tenían cotiledones fusionados, un solo cotiledón o no tenían cotiledones, o embriones fusionados. En las fotografías, se muestra el proceso utilizando Centofenoxina y Quinclorac. Pero no lo compara con el efecto del 2,4-D.

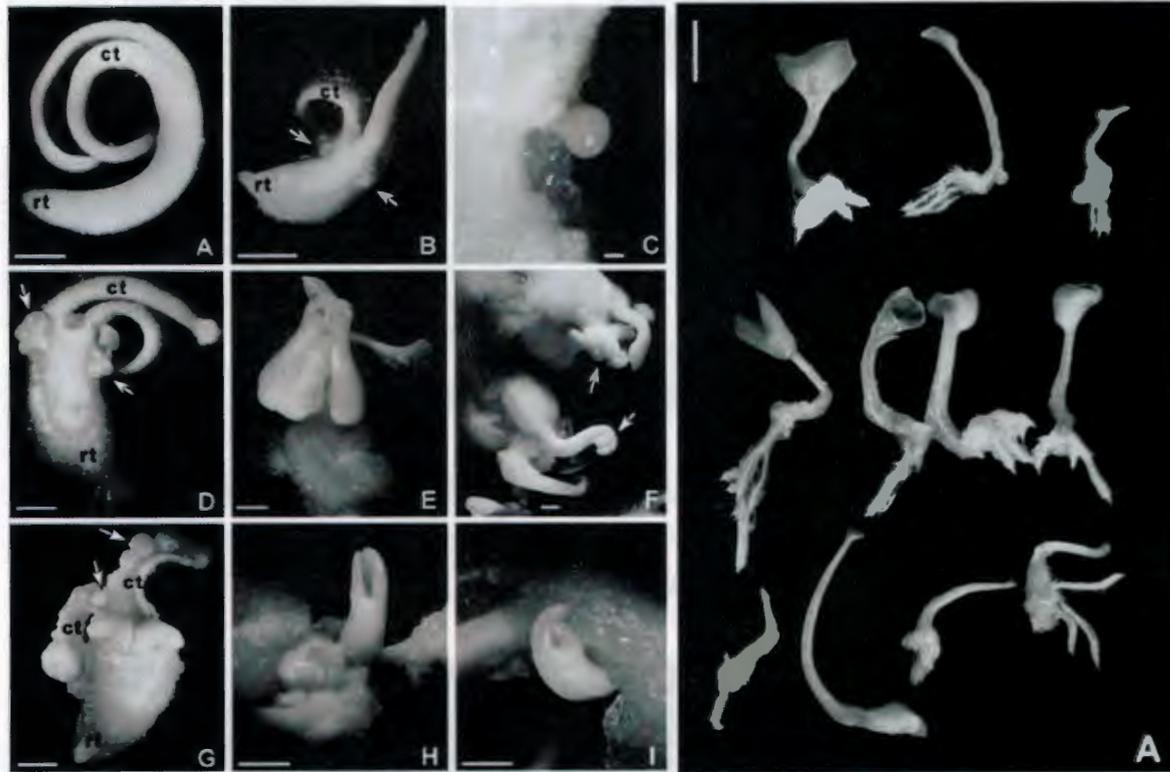


Figura 1.11 Estadios y desarrollo de la ES en *C. annuum* L. Fuente: (Steinitz *et al.*, 2003)

Existen pocos reportes relacionados con la ES en *C. chinense* Jacq. El primero fue realizado por López-Puc *et al* (2006). Uno de los objetivos de su trabajo era evaluar la eficiencia para que se desarrolle el proceso embriogénico implicando diferentes explantes (embrión cigótico, embrión cigótico germinado, hojas cotiledonares e hipocótilo) en donde se adiciono al medio 9.05 μM de 2,4-D para la inducción (Figura 1.12). Posteriormente evaluó 21 tratamientos durante la etapa de histodiferenciación, siendo el más efectivo el tratamiento de 2,4-D a 9.05 μM utilizando hipocótilo como explante (Figura 1.13). Una de las ventajas de este tratamiento es el alto número de embriones que se puede obtener por explante, en promedio 175 embriones.

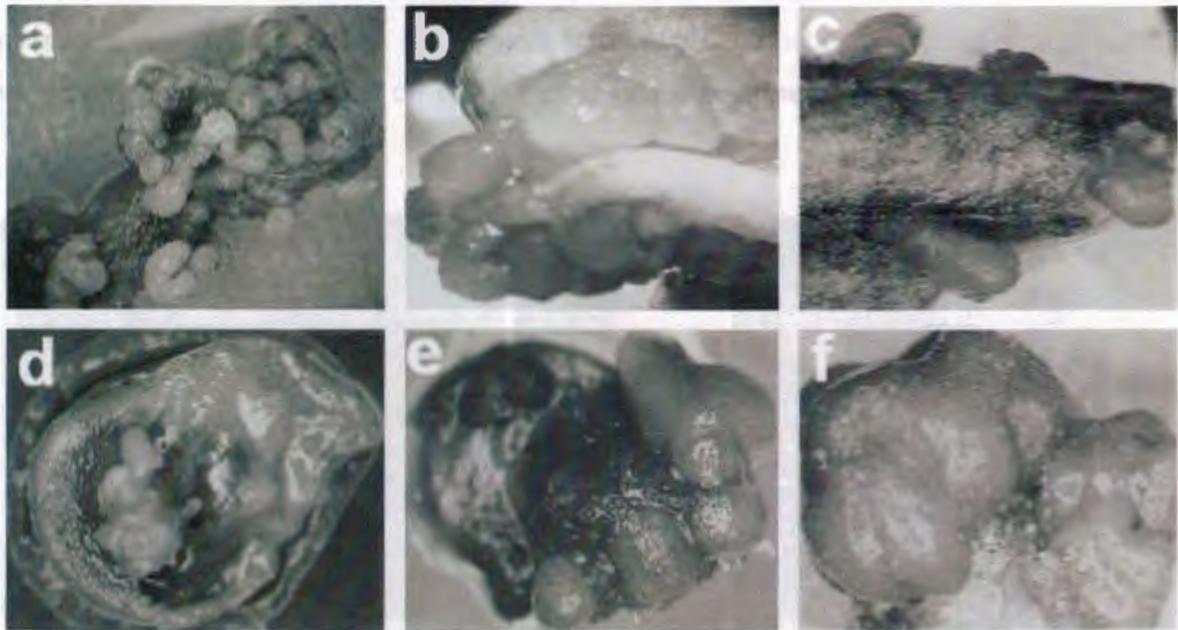


Figura 1.12 Embriogénesis somática directa inducida con medio MS adicionado con $9.05 \mu\text{M}$ de 2,4-D a partir de diferentes explantes: (a) Embrión cigótico, (b y c) Cotiledones y (d, e y f) Embrión cigótico inmaduro. Fuente: (López-Puc *et al.*, 2006).

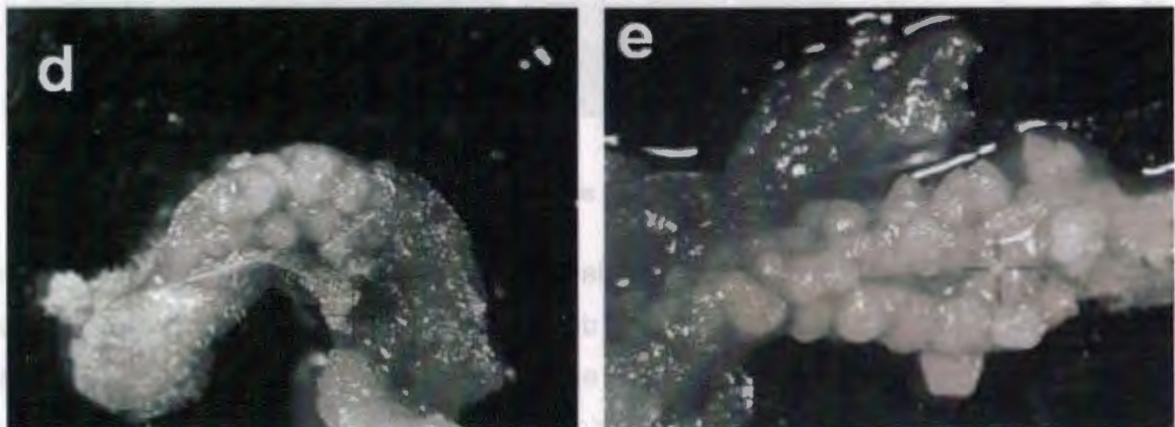


Figura 1.13 Embriogénesis somática directa inducida a partir de hipocótilo de Chile Habanero con medio MS adicionado con $9.05 \mu\text{M}$ de 2,4-D: (d y e) ESs formados de la parte interna del hipocótilo. Fuente: (López-Puc *et al.*, 2006)

En el trabajo reportado por Santana-Buzzy (Santana-Buzzy *et al.*, 2009), se describe detalladamente la ontogénesis de la ES en *C. chinense* utilizando el protocolo antes

mencionado. Estos autores descubren el gran número de deformaciones que se presentan durante la histodiferenciación de los ESs en esta especie (Figura 1.14).

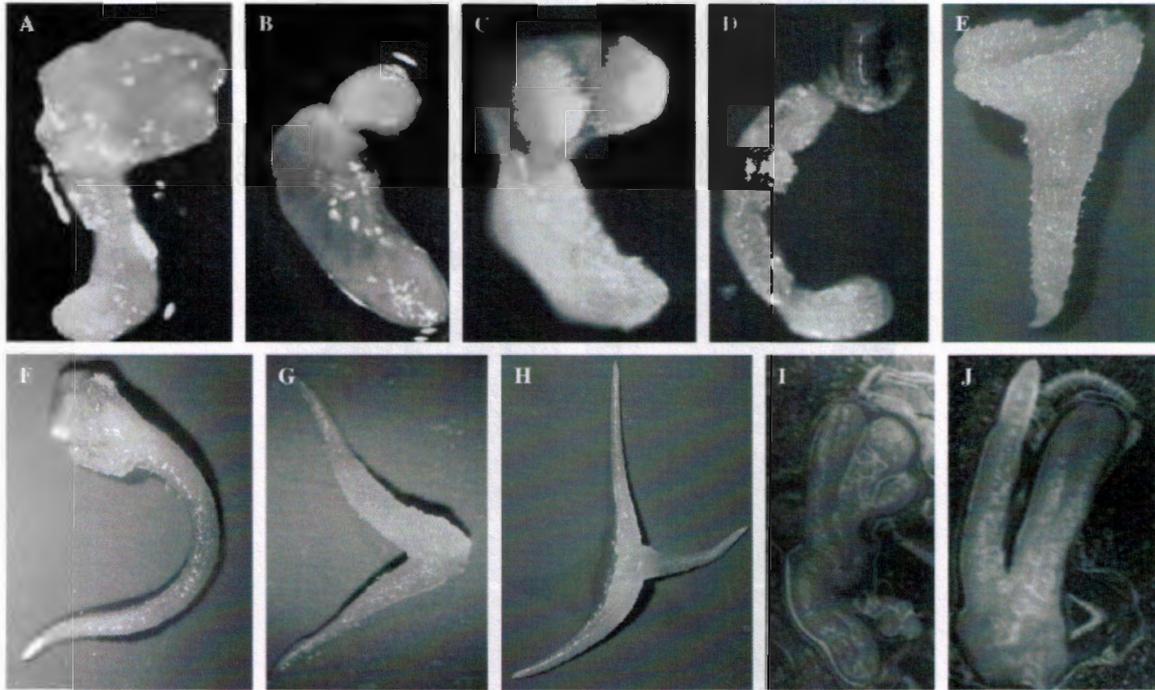


Figura 1.14 Anormalidades más frecuentemente observadas durante la histodiferenciación de ESs en *C. chinense*. Fuente: (Santana-Buzzy *et al.*, 2009)

El trabajo más reciente realizado sobre la ES en *C. chinense* es el de Avilés-Viñas *et al.* (2013). Estos autores evaluaron diferentes tiempos de exposición (30 días, 45 días y 60 días) y tres concentraciones ($0 \mu\text{M}$, $4.52 \mu\text{M}$, y $9.05 \mu\text{M}$) de 2,4-D, en medio sólido y líquido. Se logró una mejor armonía en la formación de ambos polos (apical y radicular), observándose un mayor desarrollo de la radícula. Sin embargo, a pesar de esta mejoría los ESs no desarrollan un adecuado meristemo apical por lo tanto no se convirtieron en planta (Figura 1.15).

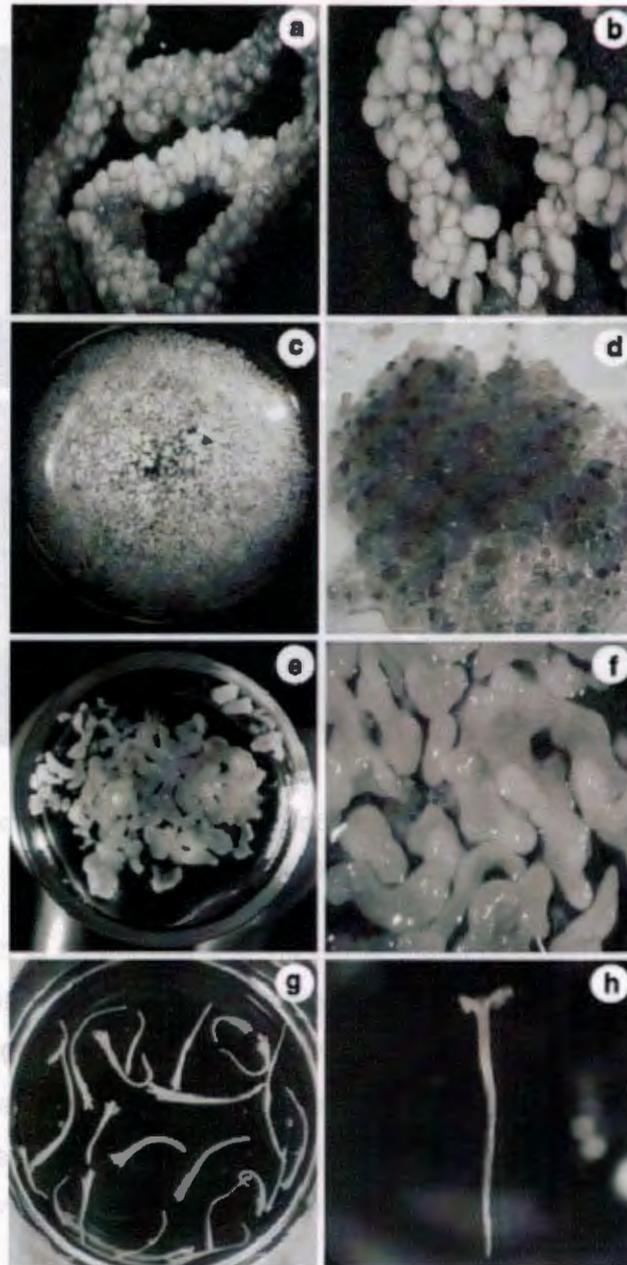


Figura 1.15 Embriogénesis somática en chile Habanero. Fuente: (Avilés-Viñas *et al.*, 2013)

HIPÓTESIS

Si el 2,4-D está relacionado con las deformaciones de los embriones somáticos formados en *Capsicum* spp., entonces es posible que la sustitución de éste por otra auxina podría mejorar el proceso de inducción e histodiferenciación de los embriones somáticos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de diferentes auxinas durante la histodiferenciación de los embriones somáticos de *C. chinense* Jacq. var. Mayan Ba' alché, y *C. annuum* L. var. California Wonder.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto de diferentes auxinas (2,4-D, Dicamba, Picloram, AIA) durante la histodiferenciación de los embriones somáticos de *C. chinense* y *C. annuum*.

Evaluar la capacidad de Picloram (9.05 μM) para inducir a la ES en *C. chinense*, sobre diferentes explantes (hoja, cotiledón, hipocótilo), y su continuidad durante la etapa de histodiferenciación (2.26, 4.52 y 9.05 μM).

Caracterizar histológicamente los embriones somáticos generados durante el proceso de histodiferenciación de *C. annuum* L.

JUSTIFICACIÓN

Los trabajos previos efectuados sobre la ES de *C. chinense* y validados en *C. annuum* evidencian la dependencia del uso del 2,4-D en el medio de cultivo en el proceso de inducción e histodiferenciación de la ES. Sin embargo este proceso se ha caracterizado por un alto índice de embriones deformados y por una baja tasa de germinación de los embriones. Dada la naturaleza mutagénica del 2,4-D, la exposición de los embriones durante la inducción e histodiferenciación pudiera ser una de las posibles causas de la alta frecuencia de embriones anormales formados. Por lo que existe la necesidad de establecer un sistema de regeneración en el cual la auxina 2,4-D pueda ser sustituida por otro regulador de crecimiento, al menos durante la fase de histodiferenciación.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el diagrama experimental (Figura 1.16) se muestra el procedimiento a seguir para estudiar el efecto de las auxinas durante la inducción e histodiferenciación de la embriogénesis somática de *Capsicum* spp.

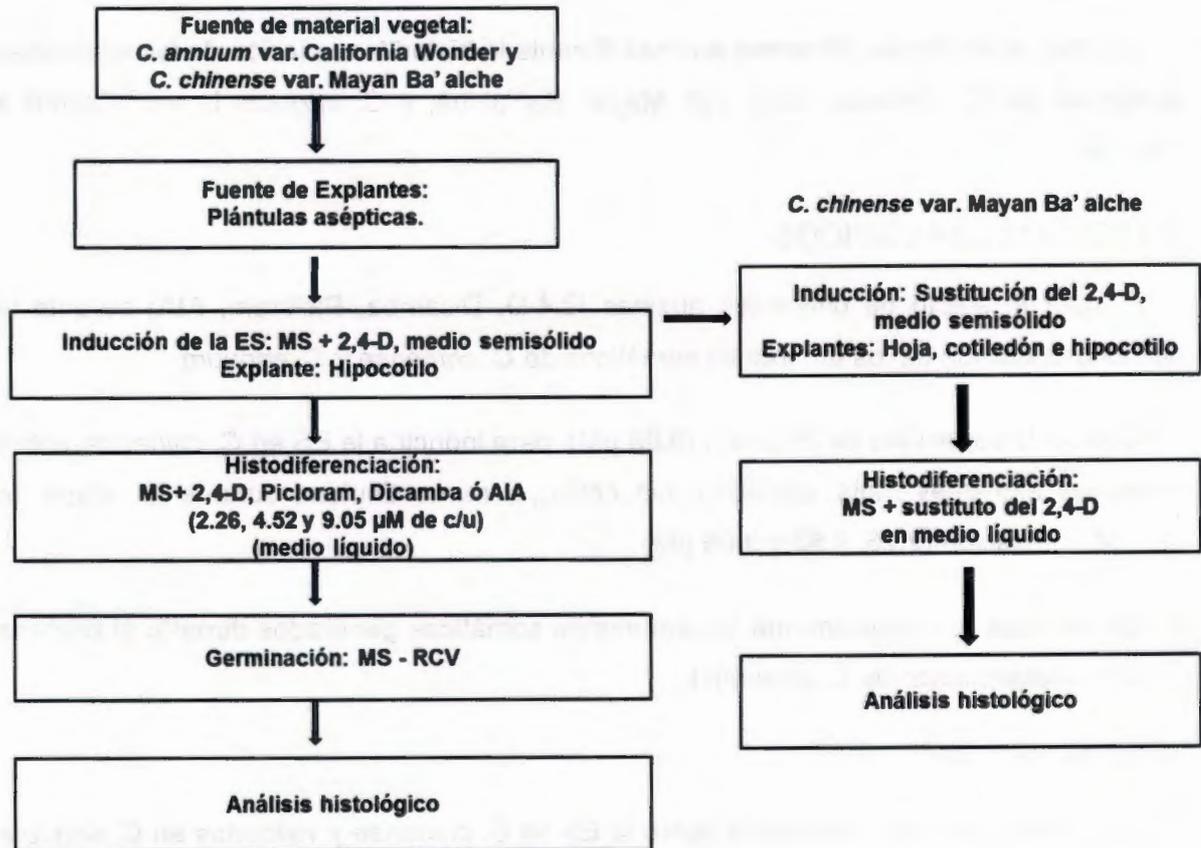


Figura 1.16 Diagrama experimental.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong C. L. y C. E. Green (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline, *Planta*, 164: 207-214.
- Avilés-Viñas S. A., C. A. Lecona-Guzmán, A. Canto-Flick, S. López-Erosa y N. Santana-Buzzy (2013). Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium, *Plant Biotechnology Reports*, 1-10.
- Bárány I., P. González-Melendi, B. Fadón, J. Mitykó, M. C. Risueño y P. S. Testillano (2005). Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development, *Biology of the Cell*, 97: 709-722.
- 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 Reports*, 15: 536-540.
- Buyukalaca S. y F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media, *Plant cell, tissue and organ culture*, 46: 227-235.
- Caligo M. A., V. Nuti Ronchi y M. Nozzolini (1985). Proline and serine affect polarity and development of carrot somatic embryos, *Cell differentiation*, 17: 193-198.
- Carman J. (1990). Embryogenic cells in plant tissue cultures: Occurrence and behavior, In *Vitro Cell Dev Biol*, 26: 746-753.
- Davies P.J. (2010). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*, Springer. 448 p.
- De Smet I., S. Lau, U. Mayer y G. Jurgens (2010). Embryogenesis - the humble beginnings of plant life, *Plant J*, 61: 959-970.
- DeWitt D. y P.W.Bosland (1993). *The pepper garden*, Ten Speed Press. 219 p.
- Dodeman V. L., G. Ducreux y M. Kreis (1997). Zygotic embryogenesis *versus* somatic

-
- embryogenesis , Journal of Experimental Botany, 48: 1493-1509.
- Duškova J., Z. Opatrný, M. Sovová y J. Dušek (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coronilla varia* L.(crownvetch) long-term tissue cultures, *Biologia plantarum*, 32: 8-13.
- Feher A., T. Pasternak, K. Otvos, P. Miskolczi y D. Dudits. (2002). Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review, *Section Botany*, 57.
- Fischer-Iglesias C., B. Sundberg, G. Neuhaus y A. M. Jones. (2001). Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat, *The Plant Journal*, 26: 115-129.
- Fobert P. R. y D. T. Webb (1988). Effects of polyamines, polyamine precursors, and polyamine biosynthetic inhibitors on somatic embryogenesis from eggplant (*Solanum melongena*) cotyledons, *Canadian journal of botany*, 66: 1734-1742.
- Gaj M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Growth Regulation*, 43: 27-47.
- George E.F., M.A.Hall y G.d.Klerk (2008). Plant propagation by tissue culture. Volume 1: the background, Springer-Verlag GmbH. 552 p.
- Haberlandt G. (1902). Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen, *Sber. Akad. Wiss. Wein.*, 111: 69-92.
- Halperin W. y D. F. Wetherell (1964). Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, *Daucus carota*, *American Journal of Botany*, 274-283.
- Harini I. y G. Lakshmi Sita (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.), *Plant Science*, 89: 107-112.
- Härtel O. (1999). HABERLANDT SYMPOSIUM ABSTRACTS-Symposium in Memory of the 100th Anniversary of the Foundation of Tissue Culture, *In Vitro-Cellular and*

Developmental Biology-Plant Section, 35: 157-181.

Heiser C. B. (1995). Peppers-*Capsicum* (Solanaceae). Smartt J. Simmonds NW. eds. Evolution of crop plants. Essex: Longman, 449-451.

Henry Y., P. Vain y J. Buyser (1994). Genetic analysis of in vitro plant tissue culture responses and regeneration capacities, *Euphytica*, 79: 45-58.

Ji A., X. Geng, Y. Zhang, H. Yang y G. Wu (2011). Advances in somatic embryogenesis research of horticultural plants, *American Journal of Plant Sciences*, 2: 727-732.

Jimenez V. M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13: 196-223.

Kaldewey H. (1984). Transport and other modes of movement of hormones (mainly auxins), en: *Hormonal Regulation of Development II*, Anonymous, Springer, 80-148.

Kamada H., K. Kobayashi, T. Kiyosue y H. Harada (1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production, *In vitro cellular & developmental biology*, 25: 1163-1166.

Khan H., I. Siddique y M. Anis (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*, *Biologia plantarum*, 50: 789-792.

Kim M., I. C. Jang, J. A. Kim, E. J. Park, M. Yoon y Y. Lee (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture, *Plant Cell Reports*, 27: 425-434.

Koleva-Gudeva L. R., M. Spasenoski y F. Trajkova (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media, *Scientia horticulturae*, 111: 114-119.

Kothari S. L., A. Joshi, S. Kachhwaha y N. Ochoa-Alejo (2010). Chilli peppers - a review on tissue culture and transgenesis, *Biotechnology advances*, 28: 35-48.

- Laimer M. y W.Rücker (2003). Plant tissue culture: 100 years since Gottlieb Haberlandt, Springer Verlag.
- Lakshmanan P. y A. Taji (2000). Somatic embryogenesis in leguminous plants, *Plant Biology*, 2: 136-148.
- Ljung K., A. Östin, L. Lioussanne y G. Sandberg (2001). Developmental Regulation of Indole-3-Acetic Acid Turnover in Scots Pine Seedlings, *Plant Physiology*, 125: 464-475.
- Lomax T. L., G. K. Muday, P. H. Rubery y P. J. Davies (1995). Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology, *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*.
- López-Puc G., A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, P. Zapata-Castillo, M. d. Montalvo-Peniche, F. Barahona-Pérez, N. Santana-Buzzy y L. Iglesias-Andreu (2006). Direct Somatic Embryogenesis: A Highly Efficient Protocol for In Vitro Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), *HortScience*, 41: 1645-1650.
- Maheswaran G. y E. G. Williams (1986). Primary and Secondary Direct Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryos of *Brassica campestris*, *Journal of plant physiology*, 124: 455-463.
- Matthysse A. G. y T. K. Scott (1984). Functions of hormones at the whole plant level of organization, en: *Hormonal Regulation of Development II*, Anonymous, Springer, 219-243.
- McLeod M. J., S. I. Guttman y W. H. Eshbaugh (1982). Early evolution of chili peppers (*Capsicum*), *Economic Botany*, 36: 361-368.
- Merkle S. A., W. A. Parrot y B. S. Flinn (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis, en: *In vitro embryogenesis in plants*, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 155-203.
- Muller B. y J. Sheen (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification

during early embryogenesis, *Nature*, 453: 1094-1097.

Namesny A. V. (1996) El pimiento en el mundo, Compendios de horticultura. Pimientos. Namesny AV (ed). Ed. Horticultura SL Reus, España, 13-20.

Normanly J., J. D. Cohen y G. R. Fink (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 10355-10359.

Ochoa-Alejo N. y R. Ramirez-Malagon (2001). In vitro chili pepper biotechnology, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37: 701-729.

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 cellular & developmental biology*, 24: 817-820.

Pérez Molphe Balch E. M., R. R. Malagón, H. N. Palenius y N. O. Alejo (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 179 p.

Petrášek J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development, *Development*, 136: 2675-2688.

Pickersgill B (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp, *Euphytica*, 96: 129-133.

Pierik R.L.M. y L.Ayerbe Mateo-Sagasta (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores, Mundi Prensa Libros SA. 326 p.

Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*, *Plant Cell Rep.*, 20: 1141-1149.

Raemakers C. J. J. M., E. Jacobsen y R. G. F. Visser (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding, *Euphytica*, 81: 93-107.

- Reinert J. (1959). Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten, *Planta*, 53: 318-333.
- Rhodes C. A., C. E. Green y R. L. Phillips (1986). Factors affecting tissue culture initiation from maize tassels, *Plant Science*, 46: 225-232.
- Roberts D. R., B. S. Flinn, D. T. Webb, F. B. Webster y B. Sutton (1990). Abscisic acid and indole-3-butyric acid regulation of maturation and accumulation of storage proteins in somatic embryos of interior spruce, *Physiologia plantarum*, 78: 355-360.
- Salisbury F. B., The role of plant hormones, *Plant Environment Interactions*. Ed. RE Wilkinson, 39-81, (1994).
- Santana-Buzzy N., G. López-Puc, A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, E. Balam-Uc, S. Aviles-Viñas, D. Solís-Marroquín, C. Lecona-Guzmán, J. J. Bello-Bello y E. Gómez-Uc (2009). Ontogenesis of the somatic embryogenesis of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), *HortScience*, 44: 113-118.
- Santner A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth, *Nature chemical biology*, 5: 301-307.
- Smith P. G. y C. B. Heiser Jr (1957). Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species, *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 413-420.
- 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 Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39: 296-303.
- Steward F. C. (1958). Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant, *Am. J. Bot.*, 45: 709-713.
- Supena E. D. J. y J. B. M. Custers (2011). Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annum* L.), *Scientia horticultrae*, 130: 769-774.

- Tanaka H., P. Dhonukshe, P. B. Brewer y J. Friml (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development, *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 63: 2738-2754.
- Thorpe T.A. (1995) *In vitro* embryogenesis in plants, Springer, 563p.
- Trewavas A. (1981). How do plant growth substances work?, *Plant, Cell & Environment*, 4: 203-228.
- Vieten A., M. Sauer, P. B. Brewer y J. Friml (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development, *Trends in plant science*, 12: 160-168.
- Wareing P. F. (1977). Growth substances and integration in the whole plant, en:337.
- Woodson R. E., R. W. Schery y W. G. D'Arcy (1973). Flora of Panama. Part IX. Family 170. Solanaceae, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 60: 573-780.
- Yang X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 29: 36-57.
- Zapata-Castillo P. Y., A. C. Flick, G. López-Puc, A. Solís-Ruiz, F. Barahona-Pérez, N. Santana-Buzzy y L. Iglesias-Andreu (2007). Somatic embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions, *HortScience*, 42: 329-333.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DEL EFECTO DE DIFERENTES AUXINAS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE *C. chinense* Jacq., Y *C. annuum* L

2.1 INTRODUCCIÓN

En el género *Capsicum* se han realizado diferentes estudios con la finalidad de poder obtener un protocolo de regeneración *in vitro*. Sin embargo, la mayoría de los estudios coinciden en la incapacidad que tienen los procesos de organogénesis como de embriogénesis somática para desarrollarse adecuadamente. A pesar de que se ha logrado una elevada eficiencia y reproducibilidad en el proceso de embriogénesis somática con el protocolo reportado por Avilés-Viñas *et al.* (2013) para *C. annuum* L. var. California Wonder y *C. chinense* jacq. var. Mayan Ba' alché, los embriones presentan una morfología anormal una vez que alcanzan los estadios más avanzados, por lo que no se convierten en plantas. Las causas que provocan este comportamiento aún se desconocen, pero se presume que se deba a la dependencia al 2,4-D a lo largo del proceso (inducción e histodiferenciación). Para evaluar la influencia que tiene el 2,4-D sobre la inducción e histodiferenciación de la ES en *C. chinense* y *C. annuum*, se sustituyó esta auxina con otro tipo de auxina (Picloram, Dicamba o AIA) durante la inducción e histodiferenciación. Por ser el 2,4-D, NAA, IAA, Picloram y Dicamba las auxinas más utilizadas para la obtención de la ES en diferentes especies (Raemakers *et al.*, 1995). Existen reportes en donde se corrobora que el tipo de auxina influye en la obtención de ESs con una morfología normal (Rodríguez y Wetzstein, 1998).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Fuente de explante

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron dos cultivares comerciales, Mayan Ba' alché de la especie *C. chinense* Jacq, y California Wonder (9288595) de la especie *C. annuum* L. Los explantes fueron tomados a partir de plántulas a los 30 días de germinar *in vitro*.

2.2.2 Establecimiento de plantas asépticas

Las desinfección de las semillas, se realizó de acuerdo con lo propuesto por Santana-Buzzy et al. (2005).

Para la germinación de las semillas se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con 1.1 μM GA₃, 3% (p/v) de sacarosa, 0.2% (p/v) de gelrite. El pH se ajustó a 5.8. Se colocaron 10 semillas por frasco y se mantuvieron en condiciones de oscuridad por 2 semanas hasta que las plantas emitieron las hojas cotiledonares. Posteriormente se pasaron a condiciones de fotoperiodo (8 horas luz/ 16 horas oscuridad) por 15 días.

El medio de cultivo y el material utilizado fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1.5 atm por 20 min.

Tanto el cuarto de oscuridad como el cuarto de fotoperiodo se mantuvieron a una temperatura de 25 \pm 2 °C.

2.3 ETAPA I: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES AUXINAS DURANTE LA HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs DE *C. chinense* Y *C. annuum*

Con la finalidad de evaluar el efecto de diferentes auxinas durante el desarrollo de los ESs, se realizó la inducción de la embriogénesis somática en ambas especies, siguiendo la metodología descrita por Avilés-Viñas (Avilés-Viñas *et al.*, 2013).

2.3.1 Etapa I: Inducción a la embriogénesis somática directa

Para la inducción de la ES se tomaron hipocotilos de 1 cm de longitud de plántulas con 15 días de desarrollo bajo condiciones de fotoperiodo. Estos se sembraron en medio MS semisólido suplementado con 2,4-D (9.05 μM), 3% (p/v) de sacarosa y 0.2% (p/v) de gelrite. Los medios se ajustaron a un pH de 5.8. Los explantes se mantienen en condiciones de luz continua por 30 días en los cultivares California Wonder y Mayan Ba' alché.

2.3.2 Etapa I: Efecto de diferentes auxinas durante el proceso de histodiferenciación

Una vez efectuada la inducción a la ES se retiró el tejido calloso de los hipocótilos, dejando al descubierto los haces vasculares como se muestra en las Figuras 2.1 y 2.2, antes de transferirlos al proceso de histodiferenciación, dado que esta práctica acelera el proceso. Durante el proceso de histodiferenciación se evaluaron el efecto de diferentes concentraciones (2.26 μM , 4.52 μM y 9.05 μM) de Dicamba, Picloram, AIA y 2,4-D como tratamiento testigo, como se muestra en el Cuadro 2.1. Se utilizó el medio MS líquido adicionado con 3% de sacarosa, y ajustando el pH a 5.8. Para lo cual se ocupó matraces Erlenmeyer de 250 ml en donde se vertió 50 ml del medio. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 100 rpm con una resiembra a los 15 días, y después los explantes se subcultivaron en medio MS líquido sin reguladores del crecimiento con una resiembra a los 15 días. Los cultivos se mantuvieron bajo luz continua a una intensidad lumínica de (40-50 $\mu\text{molm}^2/\text{s}$) y a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

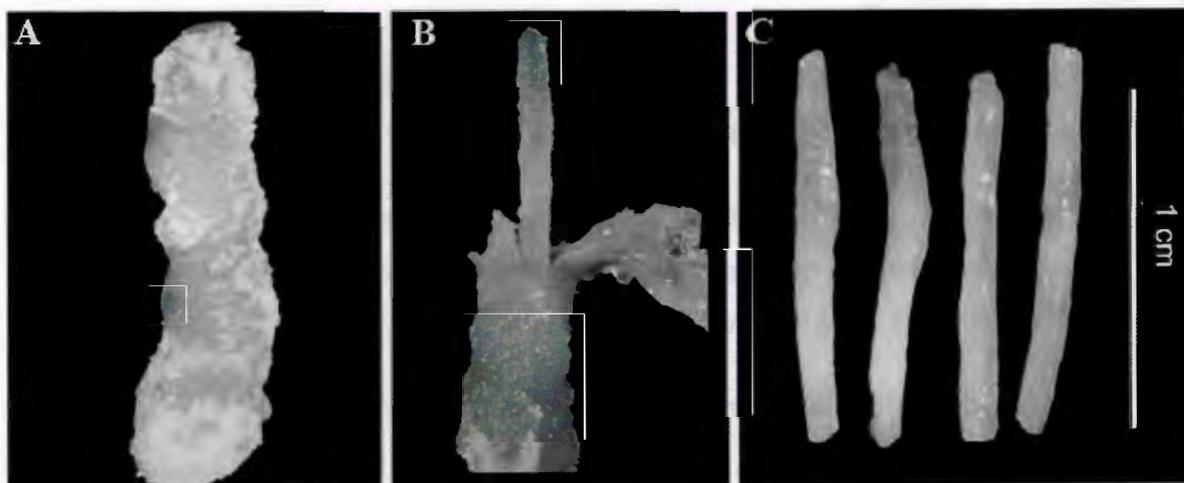


Figura 2.1 Segmentos de hipocótilo de *C. annuum* después de 30 días de inducción MS + 2,4-D (9.05 μM); (A) con epidermis, (B) durante la eliminación de la epidermis y (C) sin la epidermis.

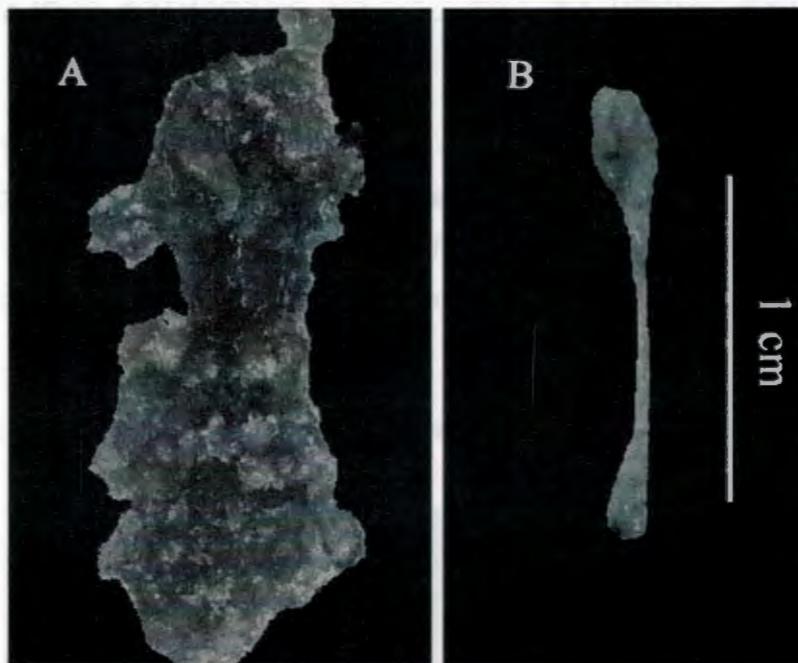


Figura 2.2 Segmentos de hipocótilo de *C. chinense* después de 30 días de inducción, MS + 2,4-D ($9.05 \mu\text{M}$); (A) con epidermis y (B) sin la epidermis.

Cuadro 2.1 Tratamientos evaluados durante el proceso de histodiferenciación de los ESs inducidos con $9.05 \mu\text{M}$ de 2,4-D.

Inducción 2,4-D	Histodiferenciación			
	2,4-D	Picloram	Dicamba	AIA
9.05 μM	2.26 μM	2.26 μM	2.26 μM	2.26 μM
9.05 μM	4.52 μM	4.52 μM	4.52 μM	4.52 μM
9.05 μM	9.05 μM	9.05 μM	9.05 μM	9.05 μM

2.4 ETAPA II: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PICLORAM DURANTE LA INDUCCIÓN E HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs EN DIFERENTES EXPLANTES DE *C. chinense* Jacq

Se seleccionaron diferentes explantes (hoja, cotiledón e hipocótilo) provenientes de plántulas de *C. chinense* Jacq. var. Mayan Ba' alché, que pasaron por la etapa de germinación (antes descrita). Se indujo a la ES con Picloram a 9.05 μM . Posteriormente, se evaluaron 3 concentraciones de Picloram (2.26, 4.52 y 9.05 μM) durante la etapa de histodiferenciación (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Tratamientos evaluados en la inducción e histodiferenciación de los ESs empleando Picloram y diferentes explantes.

Tratamientos evaluados en el proceso de ES	
Inducción	Histodiferenciación
Picloram	Picloram
9.05 μM	2.26 μM
9.05 μM	4.52 μM
9.05 μM	9.05 μM

2.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Durante el proceso de la ES, se tomaron muestras para efectuar los análisis histológicos. Las muestras fueron puestas en una solución fijadora (10 mL de formaldehído al 37%, 50 mL de alcohol al 96%, 5 mL de ácido acético al 100%, (FAA) aforada a 100 mL con agua destilada), las muestras se colocaron en una desecador al cual se aplicó vacío por 15 minutos y en donde se mantuvieron las muestras con la solución por 48 horas.

Después de fijadas, las muestras fueron deshidratadas mediante la exposición gradual a etanol (30%, 50%, 70%), durante una hora, (85%, 96%) por 2 horas y (100%) por una hora. Finalmente las muestras se colocaron en butanol (Sigma) al 100% pasando por dos

cambios cada 24 horas. Durante el segundo cambio se adicionan hojuelas de parafina (Paraplast plus, Sigma), y se colocaron en agitación toda la noche.

Para la inclusión, las muestras se colocaron en un horno de circulación forzada de aire (HCF-71, BG) a 60°C en donde se esperó a que se derrita la parafina (aproximadamente 2 horas). Una vez derretida la parafina se agregan más hojuelas de parafina cada 2 horas por 24 horas. Posteriormente se realizó un cambio de parafina líquida, desechando la mitad del volumen y se adicionó el mismo volumen con parafina líquida pura previamente colocada en el horno, se realiza 2 cambios por día durante 3 días.

El siguiente paso es colocar las muestras en el centro del molde de aluminio (histo base mold 15 x 15 x 5 mm, Fisher). El molde fue colocado previamente dentro de la estufa por lo menos 1 hora antes de utilizarlo. Las muestras son tomadas con pinzas y se colocan en el molde y se cubre con parafina líquida pura. Se coloca encima del molde un casete (Embedding cassettes M490-2, Simport). El molde con la muestra se sacaron de la estufa para que se enfriara a temperatura ambiente. Una vez que se endurece la parafina se retira el molde. A fin de realizar cortes de 5-8 μm en el micrótopo de rotación (Microtom HM 340E, MICROM International GmbH) utilizando la navajas Leica 818 High Profile (Leica Biosystems). Los cortes se montan en portaobjetos 25 x 75 (Corning). Y se hornearon a 42°C por 24 horas para que se fijaran. Seguidamente estos se trataron con un tratamiento de butanol al 100% por 10 min. Posteriormente se desparafinaron con ultraclear histograde (J.T. Baker) por 15 min. Se continuó con un proceso de hidratación mediante una exposición gradual de etanol (96%, 50% y 30% por 2 min). Se hornearon nuevamente a 37°C por 3 días. Pasado este tiempo, se tiñeron con azul de Toluidina al 0.05%.

Los cortes histológicos se observaron en un estereoscopio Leica (MZ FLIII, Leica). Las fotos fueron tomadas en la cámara de microscopio Leica DFC320 de 3.45 μm pixel (Leica Microsystems).

2.6 RESULTADOS

Durante el establecimiento del sistema de embriogénesis somática, según el protocolo reportado por Avilés-Viñas *et al.* (2013), fue ligeramente modificado en cuanto al tamaño del explante (de 3 cm a 1 cm), y la eliminación de la epidermis dejando al descubierto el tejido vascular, posterior a la etapa de inducción. Ambas modificaciones permitieron una respuesta más rápida. En la Figura 2.3 A se puede observar la formación de los embriones somáticos a lo largo del segmento de hipocótilo, a las 2 semanas de transferidos los explantes al medio de histodiferenciación, mostrando una alta eficiencia en cuanto el número de embriones formados por explante. En un acercamiento del explante (Figura 2.3 B), se pudieron observar embriones somáticos en estadios tempranos de su desarrollo (estadio globular), sin que se apreciara la formación de callo en el explante. A los 30 días de transferidos los explantes al medio de histodiferenciación para su desarrollo, se observaron embriones en estadios avanzados de su desarrollo (torpedo y cotiledonar) (Figura 2.3 C), los cuales se fueron desprendiendo del explante hipocótilo para concluir su desarrollo dispersos en el medio de cultivo (líquido) en agitación. En la Figura 2.3 D se muestra la presencia de unos diminutos embriones somáticos, formados probablemente a partir de células aisladas en la suspensión, durante la primera semana en el medio de desarrollo de los embriones.

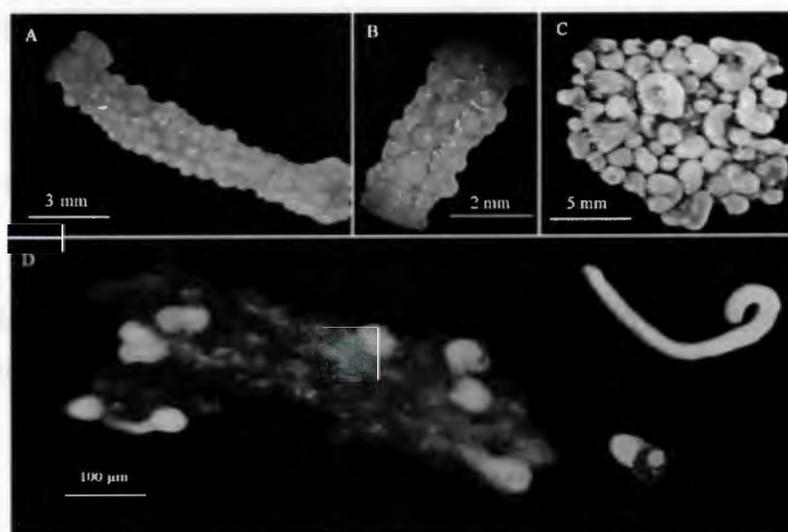


Figura 2.3 Embriogénesis somática de *C. annuum* obtenida a partir de segmentos de hipocótilo, sin la epidermis, en medio conteniendo $4.52 \mu\text{M}$ 2,4-D (Testigo).

En la Figura 2.4, se muestran los resultados del análisis histológico de los explantes de *C. annuum* L., durante en la etapa de histodiferenciación de los embriones somáticos, al día 30 de la transferidos al medio de desarrollo. En la Figura 2.4 A se puede apreciar que los embriones somáticos de *C. annuum* se originan en la zona más próxima a los haces vasculares, de manera similar a lo reportado por Santana-Buzzy *et al.* (2009) y Avilés-Viñas *et al.* (2013), donde se pueden apreciar embriones en estadios tempranos de su desarrollo (globular), así como embriones somáticos en estadios corazón, torpedo y cotiledonar (Fig. 2.4 B y C). En la Figura 2.4 D se aprecia la formación de tejido vascular en los ESs desde los primeros estadios, así como se evidencia su independencia del tejido materno. La Figura 2.4 E muestra la germinación (desarrollo de la radícula) en los ESs más avanzados y la estructura transversal de la radícula de un embrión somático avanzado en su desarrollo. Estos resultados corroboran que el protocolo de ES funciona para la especie *C. annuum* y el proceso de ES es igual al reportado por Avilés-Viñas *et al.*, (2013) para *C. chinense*. En el cuál los embriones se forman a partir de las células del procambium a partir del hipocótilo.

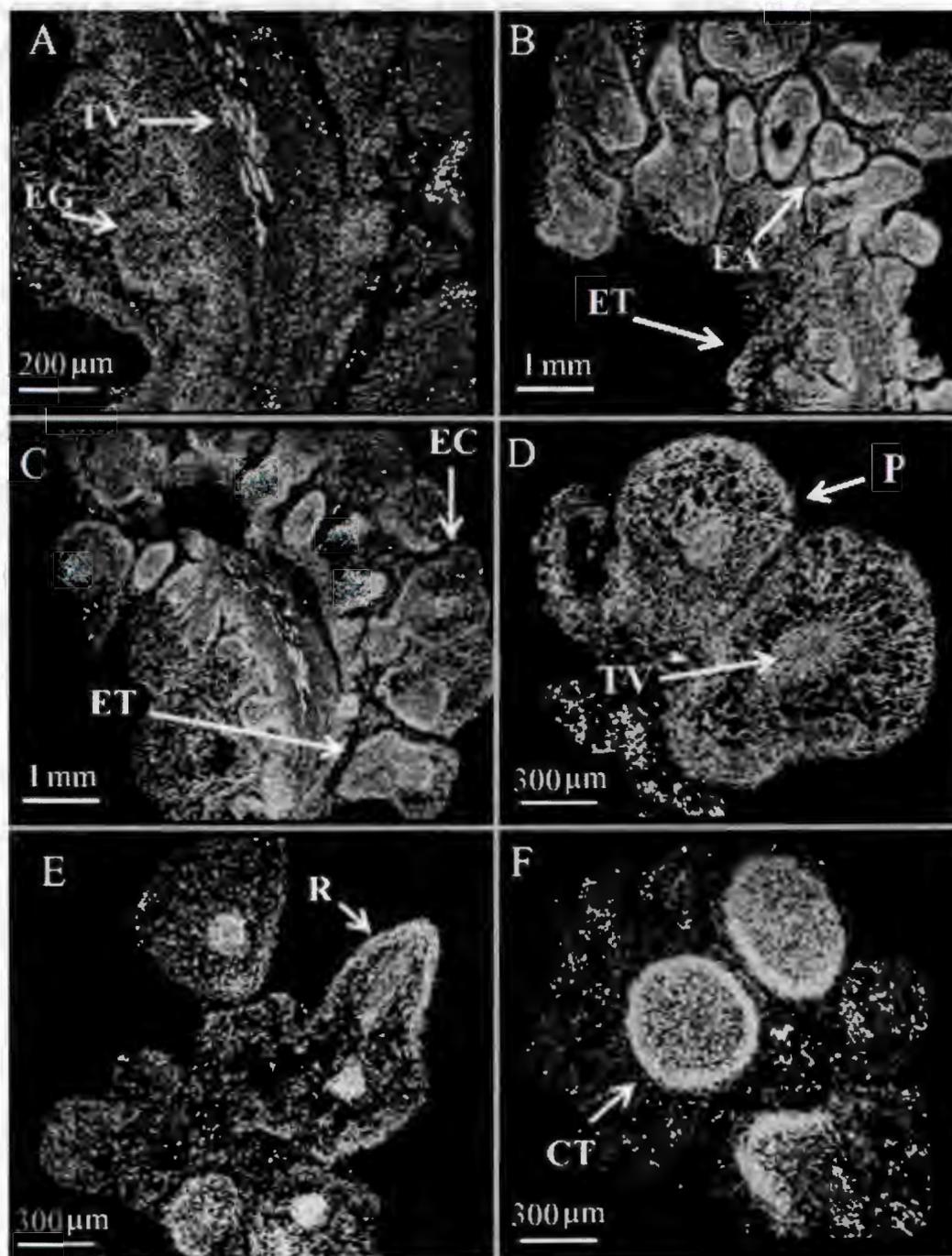


Figura 2.4 Caracterización histológica de la Embriogénesis Somática de *C. annuum* en medio con 2,4-D. TV; Tejido Vascular. EG; Embrión Globular. EA; Embrión Acorazonado. ET; Embrión torpedo. EC; Embrión Cotiledonar. P; Protodermis. R; Radícula. CT; Corte transversal.

2.7 ETAPA I: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES AUXINAS DURANTE LA HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs DE *C. chinense* y *C. annuum*.

Los resultados obtenidos mostraron que en ambas especies *C. chinense* (var. Mayan Ba' alché) y *C. annuum* (var. California Wonder) el explante respondió a la aplicación de diferentes concentraciones de auxinas 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA.

En la Figura 2.5, se puede apreciar las diferencias estadísticas en la variedad Mayan Ba' alché con respecto al número de embriones somáticos formados por explante durante el proceso de histodiferenciación implicando diferentes tratamientos de 2,4-D, Picloram, Dicamba, y AIA. Estos resultados indican que el tratamiento que generó más embriones por explante fue el 2,4-D a una concentración de 9.05 μM . Este tratamiento no difirió de manera significativa con los tratamientos empleados Dicamba y AIA a la misma concentración. El tratamiento de Picloram (2.26 μM) fue el que produjo menos embriones por explante.

En la Figura 2.6 se puede apreciar la respuesta obtenida en la variedad California Wonder. Contrastando con lo antes referido, el tratamiento que tiene un mayor número de embriones somáticos por explante fue el AIA (2.26 μM). Este resultó significativamente diferente al resto de los tratamientos evaluados. Los tratamientos que presentaron un menor número de embriones somáticos por explante fueron: Picloram (2.26 μM y 9.05 μM), y el tratamiento 2,4-D (9.05 μM), que no mostraron entre ellos diferencias significativas.

En las Figuras 2.8 y 2.9, se presentan las imágenes del efecto mostrado por el explante ante los diferentes tratamientos con auxinas. En la variedad Mayan Ba' alché, se puede apreciar una mejoría en la calidad de los ES utilizando AIA (Figura 2.8). Con este RCV la ES se presentó de forma más homogénea y los ESs alcanzaron un mayor crecimiento comparándolo con los tratamientos de 2,4-D, Picloram y Dicamba, siendo las concentraciones más elevadas las que presentaron un mejor desarrollo. Al igual con el tratamiento Picloram (4.52 μM) mostro ESs más definidos presentes a través de todo el explante. Sin embargo, a pesar de las diferencias obtenidas con las auxinas evaluadas los ESs en su mayoría carecen de la presencia de cotiledones.

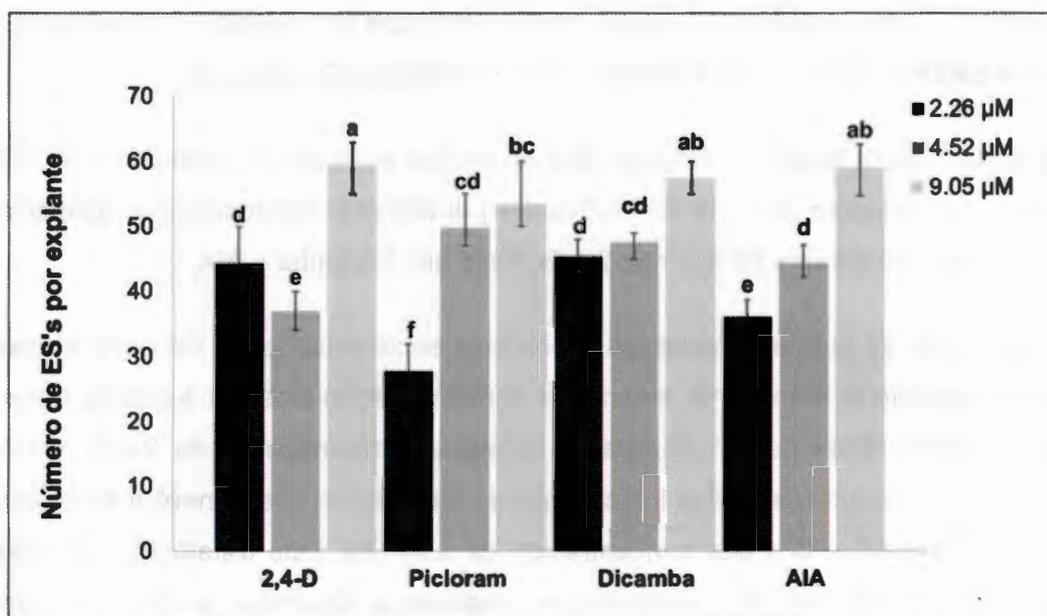


Figura 2.5 Variación en el número de embriones somáticos formados a los 30 días de cultivo en *C. chinense* en diferentes concentraciones de 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA. Análisis estadístico Tukey α 0.05.

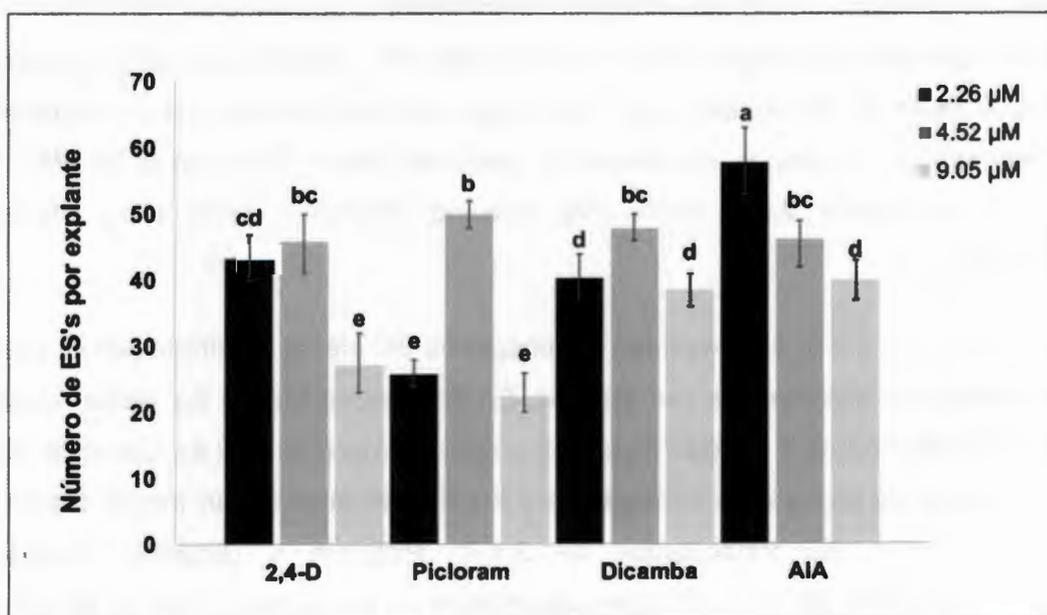


Figura 2.6 Variación en el número de embriones somáticos formados a los 30 días de cultivo en *C. annuum* en diferentes concentraciones de 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA. Análisis estadístico Tukey α 0.05.

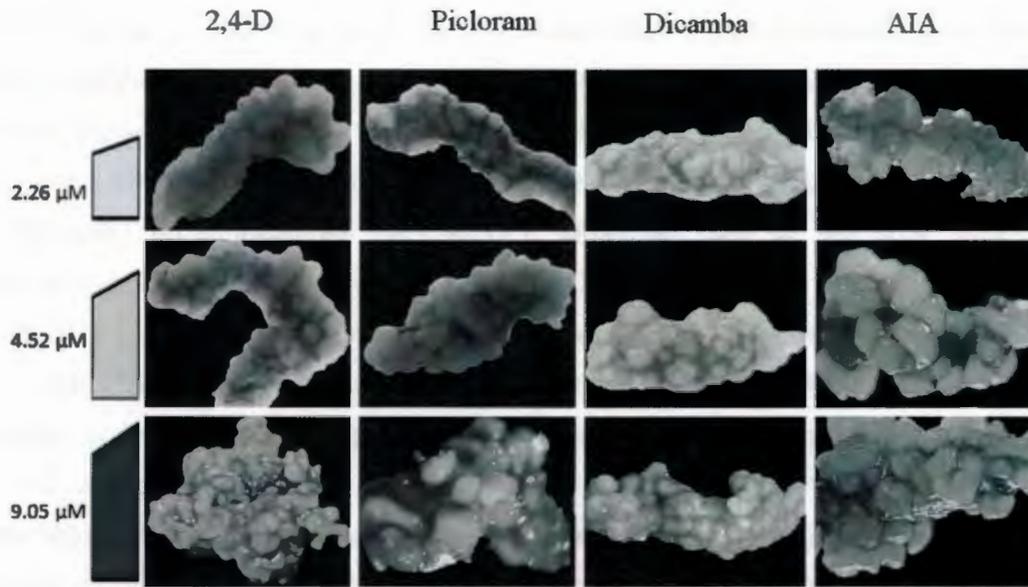


Figura 2.7 Efecto de diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA), durante el proceso de histodiferenciación en *C. chinense* (30 días de cultivo).

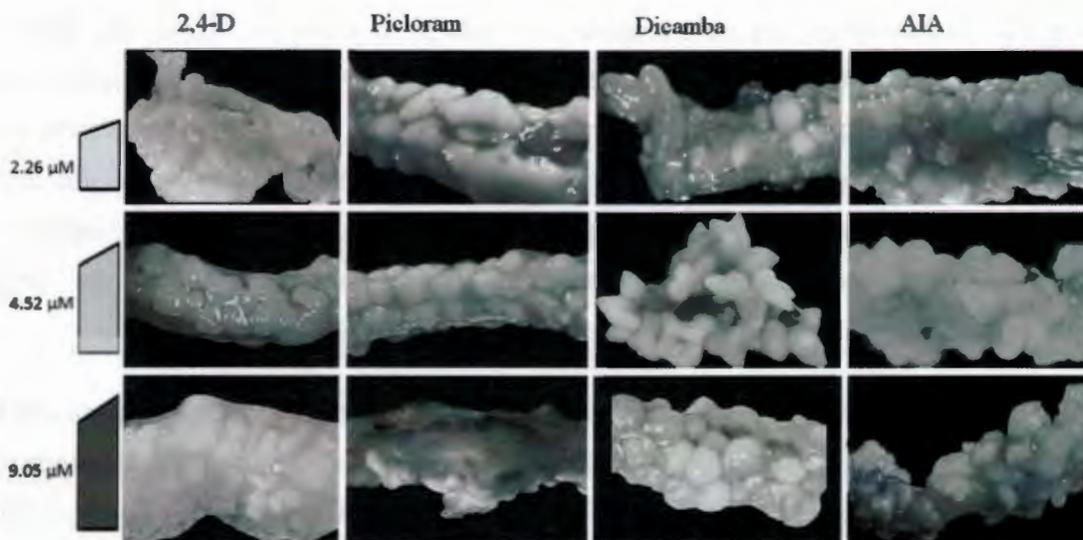


Figura 2.8 Efecto de diferentes concentraciones de auxinas (2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA), durante el proceso de histodiferenciación en *C. annuum* (30 días de cultivo).

Los resultados mostraron que el tratamiento de AIA (2.26 μM) con la variedad California Wonder, formaron ESs menos desarrollados ya que su mayoría permanecieron en estadio globular, (Figura 2.8). A pesar de que este fue el tratamiento en el que se forman más embriones por explante, (Figura 2.6). Se presentó un mejor desarrollo de los ESs al implementar 4.52 μM de este regulador (Figura 2.8). Se observó un comportamiento similar al emplear los reguladores 2,4-D y Picloram con las concentraciones evaluadas, (Figura 2.8): Al emplear 2.26 μM , el tamaño de los embriones fue mayor, a 4.52 μM en el explante se observó ESs en estadios iniciales bien definidos y a la concentración 9.05 μM se notó que la producción de ESs disminuyó y el tejido del explante se empieza a desdiferenciar. Los tratamientos con Dicamba fueron los que presentan un mayor desarrollo (Figura 2.8), a 2.26 μM los embriones empiezan a tornarse de color verde, a 4.52 μM el proceso se vuelve sincrónico, y a 9.05 μM los embriones incrementaron su tamaño, sin embargo no se desarrollan.

2.8 ETAPA I: GERMINACIÓN DE LOS ESs.

Los ESs formados en los tratamientos con AIA de la variedad Mayan Ba' alché (*C. chinense*) mostraron solamente el desarrollo de la radícula. No se observó la presencia de cotiledones, Pese a que fueron los ES que mostraron una mejora en su morfología con respecto a los ES formados con los otros reguladores evaluados. Resulto de interés observar que los ESs que provenientes del tratamiento AIA (2.26 μM) mostraron la presencia de cierta vellosidad en la epidermis de los embriones más avanzados, (Figura 2.9).

En la Figura 2.10, se muestra una representación del desarrollo y morfología de los ESs de *C. annuum* variedad California Wonder seleccionando la mejor respuesta para cada auxina, en donde se puede apreciar que los ESs provenientes de 2,4-D, (Figura 2.10 A); en donde se mostró diferentes estadios embrionarios, siendo que en los ESs más avanzados se desarrolló la radícula. Los ESs provenientes de esta auxina tienen un proceso lento comparado con el resto de los ESs con las otras auxinas. En la Figura 2.10 B; corresponde al tratamiento con Dicamba. En donde se mostró que el desarrollo de los ESs no transita por los diferentes estadios correspondientes a la ES. Sin embargo, encontramos un mayor desarrollo de la parte apical en alguno de ellos y otros con la

forma de alfiler, en estos ES's es característico la presencia de pubescencia. La Figura 2.10 C; nos muestra el tratamiento con Picloram, aquí se logró apreciar ESs en estadio cotiledonar. Los embriones que presentan esta morfología eran menos del 5% del total de ESs obtenidos. La morfología de ESs que se presentó con mayor frecuencia fue la de alfiler, cabe destacar estos embriones carecen de pubescencia. La Figura 2.10 D; son los ESs obtenidos con AIA. Los ES's de este tratamiento presentaron un buen desarrollo de la radícula desde los estadios iniciales, al igual que de los haces vasculares. Pero, al igual que los demás ESs obtenidos con las otras auxinas, carecen de un correcto desarrollo de la parte apical.

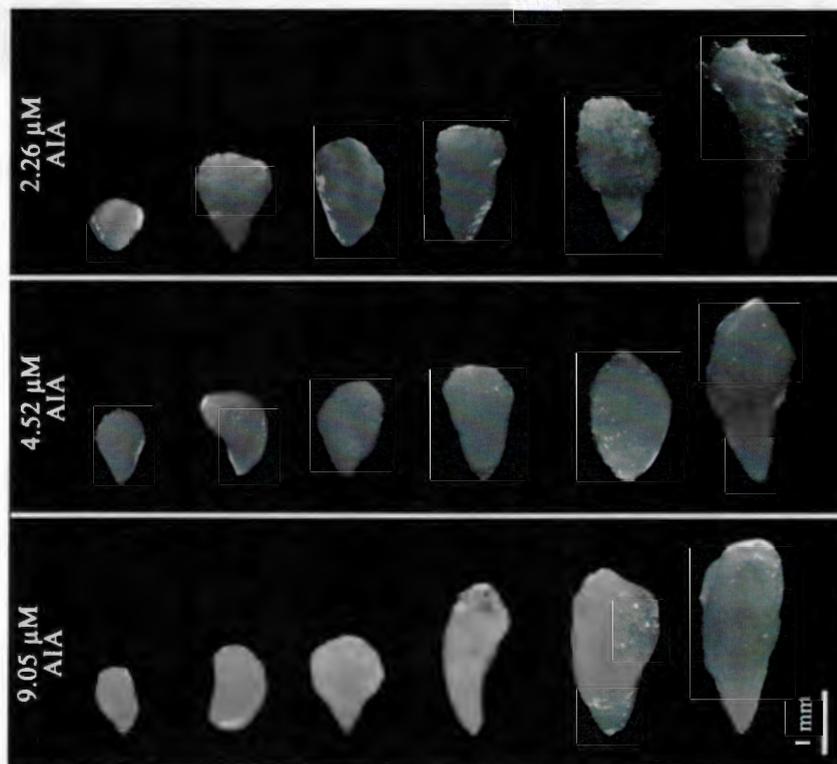


Figura 2.9 Desarrollo y morfología de los ESs de *C. chinense* var. Mayan Ba' aiché formados en presencia de AIA a diferentes concentraciones, (Transferidos a MS sin RCV).

En la Figura 2.11 se muestran ESs de *C. annuum* var. California Wonder provenientes del tratamiento Dicamba ($4.52 \mu\text{M}$) transferidos a medio MS sin RCV. En esta imagen se puede apreciar que los ES formados pudieron elongar la radícula a pesar de carecer de cotiledones y de meristemo apical. Este fenómeno se presenta en todos los tratamientos.



Figura 2.10 Desarrollo y morfología de los embriones somáticos de *C. annuum* formados en presencia de 2,4-D, Picloram, Dicamba y AIA, a diferentes concentraciones (Transferidos a MS sin RCV).

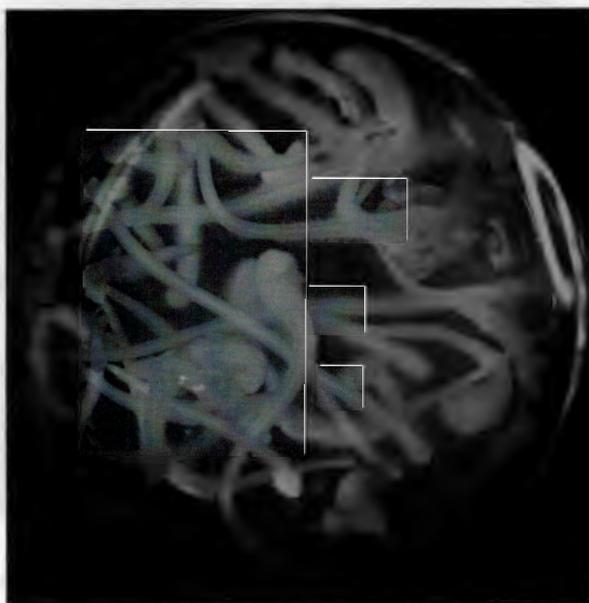


Figura 2.11 ES's en estadios de desarrollo avanzados del tratamiento Dicamba ($4.52 \mu\text{M}$) de *C. annuum* var. California Wonder (Transferidos a MS sin RCV).

2.9 ETAPA I: ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Los análisis histológicos se realizaron a los ESs obtenidos al emplear las auxinas

evaluadas en *C. annuum* var. California Wonder. En la Figura 2.12 se puede apreciar las deformaciones que se presentan en los ESs formados en diferentes auxinas. Los cortes longitudinales efectuados mostraron la presencia de haces vasculares en todos los ESs. Todos los ES formados contaron con la formación de un meristemo radicular. Los ESs obtenidos con AIA presentaron una morfología más completa dado que se apreció con claridad la cofia y la zona meristemática de la raíz; no obstante en la parte apical de estos ESs se observó que el desarrollo del tejido vascular está delimitado y no se observa el desarrollo de una zona meristemática en la parte caulinar del embrión. Una de las características que se puede apreciar fue la presencia de vellosidades observadas en el embrión somático proveniente del tratamiento de Dicamba. En general todos los ES's formados de meristemo apical. Ya que los ESs obtenidos con las diferentes auxinas presentaron deformaciones tipo alfiler, por carecer de meristemo apical como de cotiledones. Aunque mostraron un buen desarrollo de la radícula.

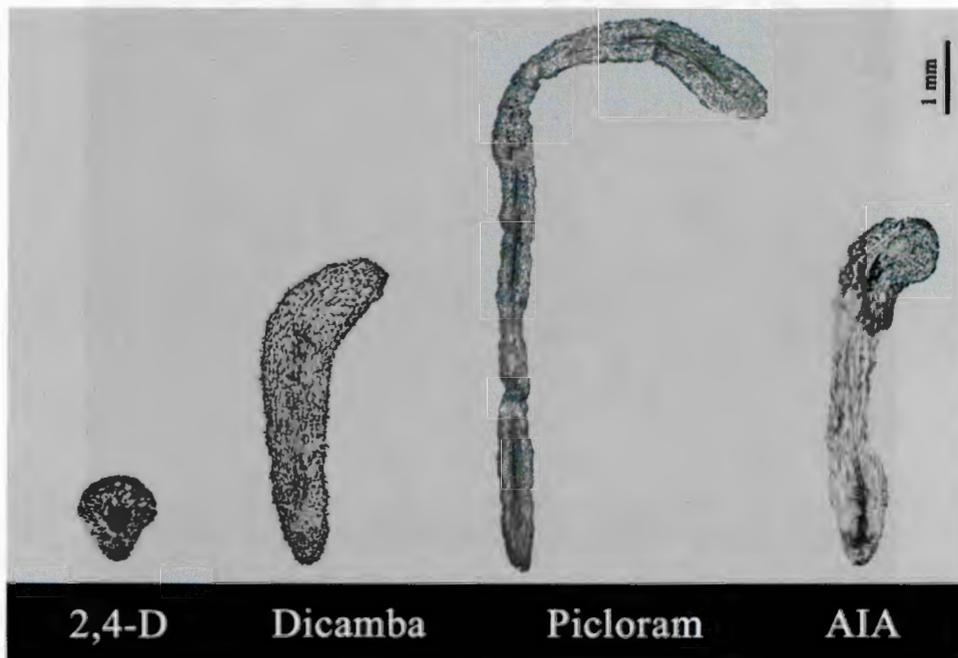


Figura 2.12 Corte longitudinal del embrión somático de *C. annuum* desarrollados en presencia de Picloram, Dicamba y AIA, en sustitución del 2,4-D.

En los cortes transversales efectuados en diferentes secciones de la parte apical de un embrión somático obtenido con Picloram (Figura 2.13), se puede apreciar la presencia de

la deformación tipo alfiler del embrión somático antes de realizarse los cortes histológicos. Se aprecian las secciones del embrión somático correspondiente a dichos cortes, así como los cortes longitudinales efectuados a un embrión somático proveniente del mismo tratamiento, (Figura 2.13).

Estos cortes revelan afectaciones en el tejido vascular del embrión somático puesto que este se reduce en la parte apical. En las otras secciones analizadas y especialmente en la parte media del embrión se pudo distinguir un mejor desarrollo del haz vascular.

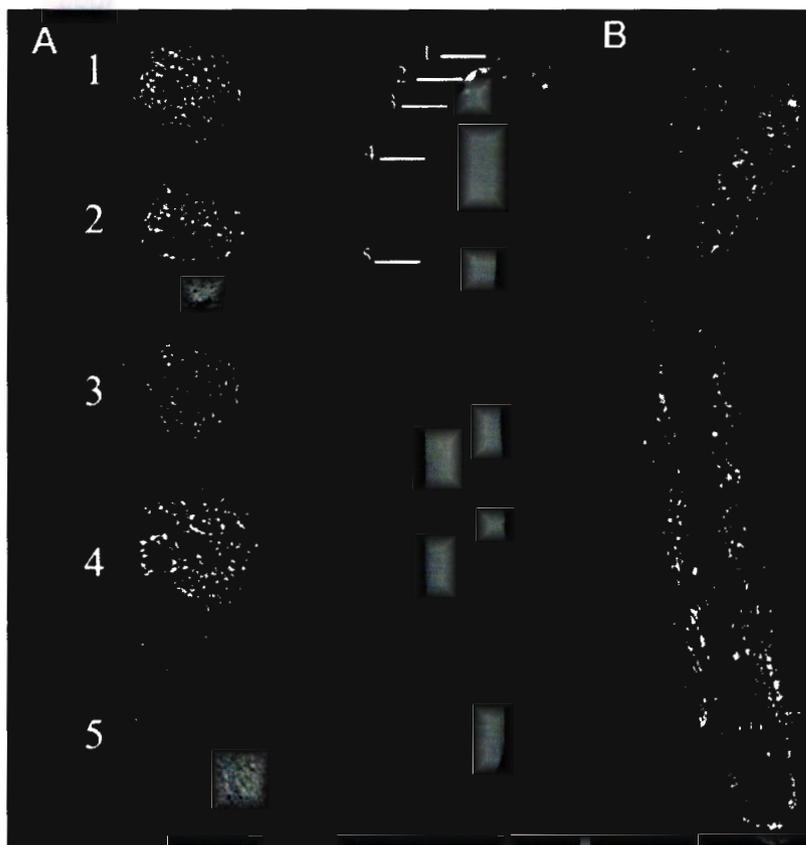


Figura 2.13 Embrión somático avanzado mostrando la deformación tipo “alfiler” (“pin”), (Tratamiento: Picloram 2.26 μ M, *C. annuum* var. California Wonder). (A) Disección transversal de la parte superior al centro (1-5) y (B) longitudinal del embrión, donde se pueden apreciar los tejidos vasculares.

En la Figura 2.14, se puede apreciar un embrión proveniente de un tratamiento con Dicamba durante la histodiferenciación, donde se observa una mejoría en el desarrollo de

los cotiledones. Este fue colocado en el medio de cultivo utilizado para germinar las semillas por una semana en donde enraizó. Posteriormente se realizaron los cortes histológicos, pero no se constató el desarrollo de hojas verdaderas. Lo que significa que aun estos embriones no pueden convertirse en una planta completa.



Figura 2.14 Embrión somático (*C. annuum* var. California Wonder) germinado en medio MS - RCV, proveniente del medio MS + Dicamba (2.26 μ M).

2.10 ETAPA II: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PICLORAM DURANTE LA INDUCCIÓN E HISTODIFERENCIACIÓN DE LOS ESs DE *C. chinense* Jacq.

Los resultados obtenidos mostraron la efectividad del empleo de Picloram durante la inducción e histodiferenciación de los ESs de *C. chinense* var. Mayan Ba' alché, (Figura 2.15 y 2.16). Se constató la tendencia de diferencias significativas en el número de ESs formados en 3 tipos de explantes (Figura 2.15).

El hipocótilo fue el explante donde se formó un mayor número de embriones por explante en todas las concentraciones de Picloram evaluadas. El tratamiento de Picloram (2.26 μ M) fue el más eficiente. En las hojas y cotiledones se formaron embriones en el haz o en la cara superior de dichos tejidos pero no en el envés. Aunque en estos explantes la producción ESs rebasó los 30 embriones por explante, no superó al número de ESs formados a partir de hipocótilo (Figura 2.15).

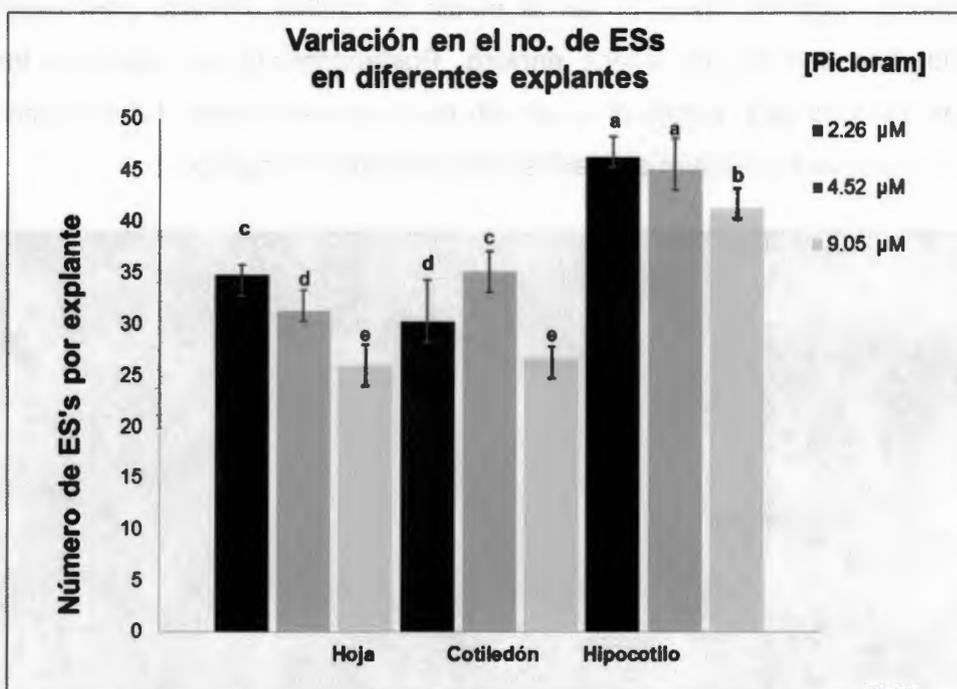


Figura 2.15 Variación en el número de embriones formados en diferentes tipos de explantes (provenientes de medio de inducción MS + 9.05 μM de Picloram), empleando diferentes concentraciones de Picloram.

En la Figura 2.16; se corrobora la eficiencia que tiene esta auxina para la ES en *C. chinense* var. Mayan Ba' alché en diferentes explantes, también se puede observar que no existen diferencias marcadas entre los embriones formados en los diferentes explantes, sin embargo si existe un mayor desarrollo al utilizar la concentración de 2.26 μM de Picloram durante la histodiferenciación.

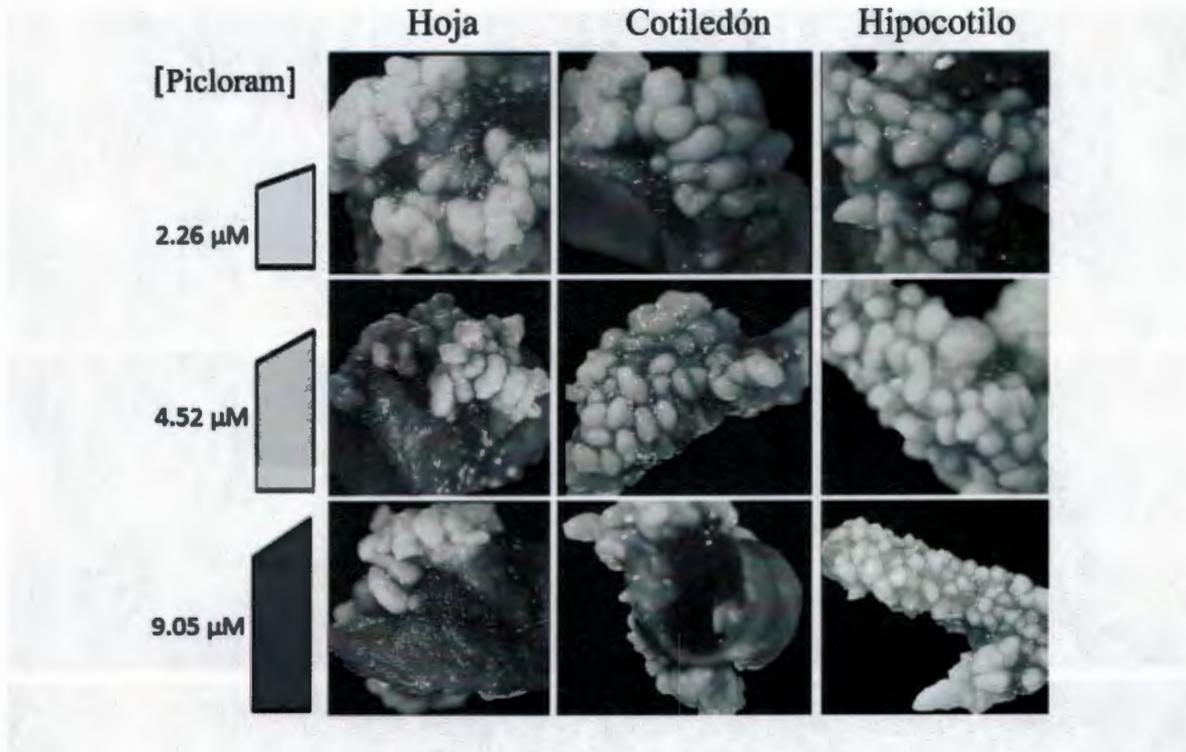


Figura 2.16 Respuesta a la formación de embriones de diferentes tipos de explantes a diferentes concentraciones de Picloram, provenientes de medio MS + 9.05 μM de Picloram (inducción).

2.11 ETAPA II: ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Siendo el proceso de hipocótilo semejante al que se obtiene con el RCV 2,4-D se optó por realizar análisis de un explante diferente que para este trabajo se tomó la ES de hoja proveniente de 2.26 μM de Picloram, que es la concentración en donde tienen un mejor desarrollo y produce mayor número de ESs por explante.

En la Figura 2.17; se muestra cortes histológicos de todo el explante el cual paso por 30 días de histodiferenciación, en todos los cortes podemos distinguir aun el tejido foliar de la hoja, lo que nos indica que la ES es directa y no se produce tejido calloso. Entre los embriones que se forman podemos distinguir embriones en estadios; globular, torpedo y cotiledonar, sin embargo la mayoría de los embriones no tienen una forma definida por lo que se le considero como embriones deformados. Es importante mencionar que no se pudieron distinguir haces vasculares en ninguno de los embriones analizados

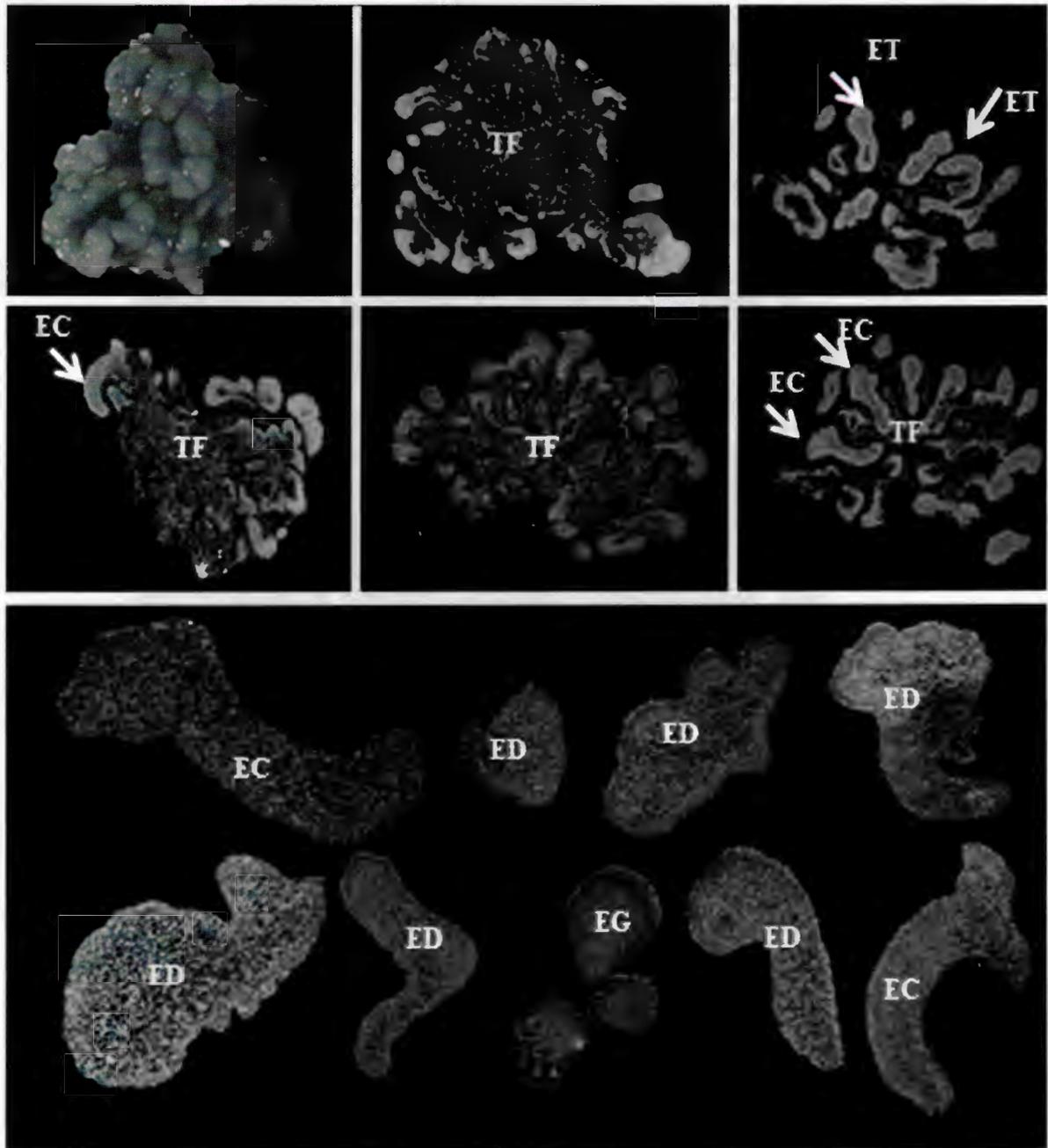


Figura 2.17 Análisis histológico de la embriogénesis somática a partir de explantes de hoja en medio MS + Picloram ($2.26 \mu\text{M}$) durante la histodiferenciación. TF: Tejido Foliar, ET: Embrión Torpedo, EC: Embrión Cotiledonar, EG: Embrión Globular, ED: Embrión Deformado.

DISCUSIÓN

Existen trabajos que evidencian cómo está implicada la auxina en el desarrollo embrionario, a través de los patrones de formación del embrión, obtenido de las mutantes en donde se puede observar la ausencia de la parte basal o la fusión de los cotiledones (Mayer *et al.*, 1993). Estos mismos patrones de formación se han observado en embriones somáticos y embriones cigóticos expuestos a inhibidores del transporte de auxina, como TIBA o NPA, o al recibir una señal auxínica, en las que la deformación o el poco desarrollo del embrión son claramente observadas. Esto se está muy bien evidenciado en el trabajo de Hadfi (Hadfi *et al.*, 1998) en donde se observan dichas deformaciones (Figura 2.18).

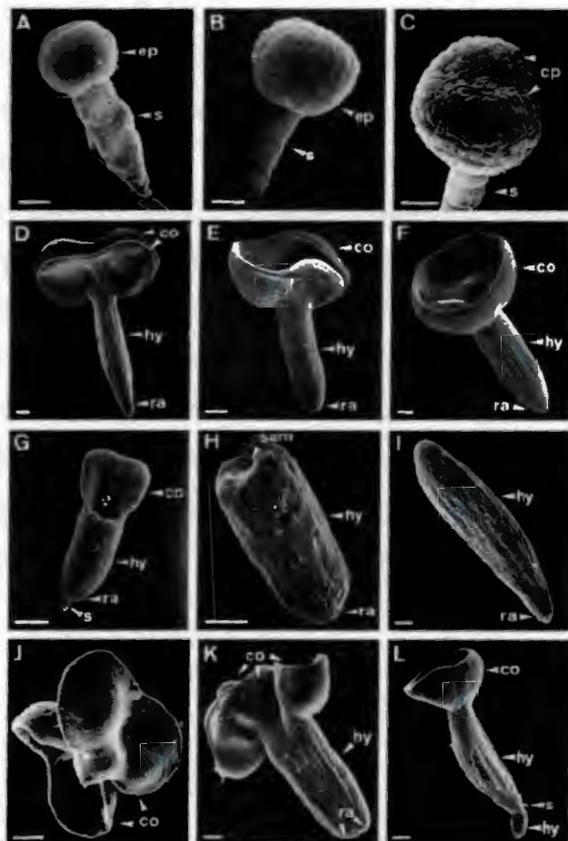


Figura 2.18 Micrografía electrónica de embriones de la especie *Brassica juncea*. (A) Globular temprano; (B) globular tardío; (C) Corazón. (D) Embrión maduro in vitro sin reguladores. (E) Embrión con cotiledones fusionados (25 μ M PCIB). (F) Embrión en forma de copa (1 μ M NPA). (G) Embrión con un solo cotiledón (100 μ M PCIB). (H) Embrión sin cotiledones (50 μ M PCIB). (I) Embrión tipo alfiler (3 μ M IAA). (J) Embrión sin hipocotilo y radícula (25 μ M PCIB). (K) Embrión con doble raíz (0.5 μ M NPA). (L) cotiledones fusionados en forma de copa unido a otro embrión en forma de huevo (0.5 μ M NPA). Fuente: (Hadfi *et al.*, 1998)

Existen reportes de inducción de la embriogénesis somática utilizando diferentes auxinas. Rodríguez y Wetzstein (1998) utilizando 2,4-D y ANA obtuvieron embriones somáticos en *C. annuum*. Sin embargo, al utilizar 2,4-D los embriones mostraron menor desarrollo y la

mayoría carecieron de meristemas apical, mientras que con ANA los embriones mostraron un desarrollo normal y pudieron convertirse en plantas. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente estudio en el que se pudo observar que el explante puede responder a un estímulo diferente al 2,4-D, con una consiguiente mejoría en la calidad de los embriones obtenidos, aun cuando durante la etapa de inducción estuvo presente el 2,4-D, en ambas especies (*C. annuum* var. California Wonder y *C. chinense* var. Mayan Ba' alché.). Los embriones somáticos desarrollados en los diferentes tratamientos, mostraron diferencias morfológicas, lo que evidencia la sensibilidad de la especie, así como el rol que pueden jugar estos reguladores del crecimiento durante esta etapa de la embriogénesis somática. Se pudo observar una mejoría notable de los embriones somáticos desarrollados, cuando se utilizó una auxina diferente al 2,4-D, resultando Dicamba la más adecuada para *C. annuum* var. California Wonder, y Picloram para *C. chinense* var. Mayan Ba' alché con AIA. Resultó interesante observar que fue posible inducir la embriogénesis somática con Picloram en sustitución del 2,4-D. El efecto inductor del Picloram fue corroborado utilizando diferentes explantes (hoja, cotiledón e hipocótilo) lo que permite asegurar que la especie no es dependiente del 2,4-D para que ocurra la embriogénesis somática y que la incapacidad a la germinación no está asociada a la presencia del 2,4-D. Estos resultados representan un avance importante en las investigaciones que se realizan a fin de entender y/o mejorar la severa recalcitrancia a la conversión en plantas, que afecta a los embriones somáticos del género *Capsicum*. Por otro lado, abre nuevas alternativas hacia el desarrollo de un sistema que permita regenerar plantas completas a partir de embriones somáticos en algunas especies de este género.

CONCLUSIONES

El presente estudio se realizó en un contexto de crisis económica y social, lo que puede haber influido en los resultados obtenidos. Se recomienda que futuras investigaciones consideren el impacto de estos factores en el comportamiento de los consumidores.

Los resultados obtenidos sugieren que los consumidores prefieren productos que sean percibidos como más saludables y sostenibles. Esto puede ser una oportunidad para las empresas que buscan mejorar su imagen y atraer a un segmento de consumidores más conscientes.

En conclusión, el estudio demuestra que los consumidores están cada vez más interesados en productos que sean percibidos como más saludables y sostenibles. Esto puede ser una oportunidad para las empresas que buscan mejorar su imagen y atraer a un segmento de consumidores más conscientes.

Los resultados obtenidos sugieren que los consumidores prefieren productos que sean percibidos como más saludables y sostenibles. Esto puede ser una oportunidad para las empresas que buscan mejorar su imagen y atraer a un segmento de consumidores más conscientes.

En conclusión, el estudio demuestra que los consumidores están cada vez más interesados en productos que sean percibidos como más saludables y sostenibles. Esto puede ser una oportunidad para las empresas que buscan mejorar su imagen y atraer a un segmento de consumidores más conscientes.

Los resultados obtenidos sugieren que los consumidores prefieren productos que sean percibidos como más saludables y sostenibles. Esto puede ser una oportunidad para las empresas que buscan mejorar su imagen y atraer a un segmento de consumidores más conscientes.

CONCLUSIONES

- Fue posible por primera vez, sustituir el 2,4-D por otras auxinas (Dicamba, Picloram y AIA) durante la etapa de histodiferenciación, en la embriogénesis somática de *C. chinense* y *C. annuum*.
- Se logró sustituir el 2,4-D por Picloram durante la etapa de inducción de la embriogénesis somática en *C. chinense* a partir de diferentes tipos de explantes.
- Se demostró que no existe dependencia del género por 2,4-D y que las deformaciones y la incapacidad de los embriones somáticos de ambas especies para la conversión en plantas, no son atribuibles a la presencia de esta auxina en el medio de cultivo.
- Se corroboró que el origen de los embriones somáticos de *C. annuum* está en la zona perivascular del hipocótilo, de manera similar a *C. chinense*.
- La deformación más frecuente en *C. annuum* fue la tipo alfiler o "pin", lo que sugiere que la recalcitrancia del género pudiera ser de naturaleza genética.
- AIA resultó la auxina que favoreció el desarrollo de los embriones somáticos de *C. chinense* mientras que para *C. annuum* la más adecuada fue Dicamba.

PERPECTIVAS

El presente trabajo de ES en las especies *C. annuum* variedad California Wonder y *C. chinense* variedad Mayan Ba'alché representa una importante contribución a un mejor entendimiento sobre el papel de las auxinas en la recalcitrancia a la morfogénesis *in vitro* del género *Capsicum*. En este estudio se cierran dos importantes capítulos de las investigaciones que se han venido desarrollando sobre este tema. Por un lado, se demostró que es posible sustituir el 2,4-D por otras auxinas, no sólo durante la histodiferenciación, sino desde el inicio del proceso (inducción), dependencia que había caracterizado los protocolos previamente desarrollados en *C. chinense*. Por otro lado, quedó demostrado que las deformaciones de los embriones somáticos no son atribuibles a la presencia del 2,4-D en el medio de cultivo. En este contexto las perspectivas de este estudio son continuar estudiando otros factores involucrados en el fenómeno de la recalcitrancia en plantas, prestando especial atención a todos aquellos genes que regulan el proceso de crecimiento y desarrollo durante la embriogénesis somática de los chiles *in vitro*, con el propósito de lograr embriones somáticos normales que se conviertan en plantas completas. Cuando esta dificultad pueda ser superada, probablemente *Capsicum* pueda ser reconocido como uno de los género con mayor potencial morfogenético de todas las plantas en las que se cuenta hasta hoy con sistemas de regeneración de plantas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Avilés-Viñas S. A., C. A. Lecona-Guzmán, A. Canto-Flick, S. López-Erosa y N. Santana-Buzzy (2013). Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium, *Plant Biotechnology Reports*, 1-10.
- Hadfi K., V. Speth y G. Neuhaus (1998). Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos, *Development*, 125: 879-887.
- Mayer U., G. Buttner y G. Jurgens (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene, *Development*, 117: 149-162.
- Murashige T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15: 473-497.
- Raemakers C. J. J. M., E. Jacobsen y R. G. F. Visser (1995). Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding, *Euphytica*, 81: 93-107.
- Rodríguez A. P. y H. Y. Wetzstein (1998). A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid, *Protoplasma*, 204: 71-83.
- Santana-Buzzy N., A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M. C. Montalvo-Peniche, P.Y. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldívar-Collí, O. Gutiérrez-Alfonso y M.L. Miranda-Ham (2005). Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience* 40, 1829-1831.
- Santana-Buzzy N., G. López-Puc, A. Canto-Flick, F. Barredo-Pool, E. Balam-Uc, S. Avilés-Viñas, D. Solís-Marroquín, C. Lecona-Guzmán, J. J. Bello-Bello y E. Gómez-Uc (2009). Ontogenesis of the somatic embryogenesis of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), *HortScience*, 44: 113-118.

