



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES NUTRIMENTALES
QUE MODULEN LA ORGANOGÉNESIS *IN VITRO* DE
CHILE SERRANO (*Capsicum annuum* L.)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

GABRIELA LEÓN GARCÍA



Ciudad Universitaria Cd.Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

VOCAL: Profesor: José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Profesor: Teresa de Jesús Olivera Flores

1er SUPLENTE: Profesor: José Ignacio Páramo Ramírez

2° SUPLENTE: Profesor: Claudia Teresa Tovar Palacio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 116, dpto.
Bioquímica, Facultad de Química. UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Teresa de Jesús Olivera Flores

SUPERVISOR TÉCNICO:

Aracely Arandal Martínez

SUSTENTANTE:

Gabriela León García

Índice

Índice de figuras.....	6
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 El chile serrano	14
2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica.	15
2.1.2 Origen y distribución del chile serrano.....	16
2.1.3 Importancia económica	18
2.1.4 Usos de chile serrano.....	20
2.1.5 Bioactivos de interés del chile serrano.....	21
3. EL CULTIVO DE TEJIDOS	22
3.1 Factores que modulan la morfogénesis <i>in vitro</i>	23
3.1.1 Medios de cultivo.....	23
3.1.2 Hormonas y reguladores de crecimiento	24
3.1.4 Meristemos.....	27
3.1.5 Condiciones de incubación	28
3.2 Vías regenerativas	29
3.2.1 Embriogénesis somática.....	29
3.2.2 Organogénesis.....	29
3.2.3 Cultivo de tejidos del Chile	30
3.2.4 Regeneración <i>in vitro</i> del chile serrano	31
3.3 Transformación genéticas de cultivos celulares.....	33
3.3.1 Sistemas de transformación	34
3.3.1 Construcción de plásmidos	36

3.3.1.1 Promotores	37
3.3.2 Proteínas Fluorescentes	38
3.3.3 Genes reporteros	39
3.3.3.1 Agentes de selección	39
3.3.4 Transfomación genética de cultivos celulares de chile serrano	40
4. OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo general	42
4.2 Objetivos particulares	42
5. HIPÓTESIS.....	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1 Material biológico.....	44
6.2 Método de desinfección de semillas.....	44
6.3 Preparación de medios de cultivo	45
6.4 Condiciones de incubación y subcultivo.....	48
6.5 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos.....	48
6.6 Ensayo 1. Inducción de la organogénesis directa e indirecta	48
6.8 Ensayo 3. Inducción de la organogénesis directa	51
6.9 Enraizamiento de brotes adventicios y aclimatación de plantas regeneradas.....	53
6.10 Transformación genética de nudos.....	54
6.10.1 Ensayo de expresión transitoria GUS.....	57
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
7.1 Germinación de semillas y obtención de plantas donadoras de explantes	59
7.2 Ensayo 1. Inducción de la organogénesis directa e indirecta	63
7.3 Ensayo 2. Inducción de la organogénesis directa e indirecta	69

7.4 Ensayo 3. Inducción de la organogénesis directa	76
7.5 Enraizamiento de brotes adventicios y aclimatación de plantas regeneradas	85
7.6 Transformación genética de nudos.....	89
8. CONCLUSIONES.....	94
9. PERSPECTIVAS	95
ANEXO 1.....	102
ANEXO 2.....	105
ANEXO 3.....	106
BIBLIOGRAFÍA	96

Índice de figuras

Figura 1. Principales áreas de estudio del cultivo de Chile.	15
Figura 2. Mapa diversidad de chiles en México (SNICS, 2015).	17
Figura 3. Panorama del cultivo de Chile (SAGARPA, 2010).	18
Figura 4. Estadísticas FAO exportaciones 1993-2013. (FAOSTAT, 2017).	19
Figura 5. Estadísticas FAO importaciones 1993-2013. (FAOSTAT, 2017).	20
Figura 6. Respuesta morfogénica de cultivos vegetales <i>in vitro</i> (Roca y Mroginski, 1991).	23
Figura 7. Desarrollo de plantas dicotiledóneas (Curtis <i>et al.</i> , 2006).	27
Figura 8. Factores abióticos que afectan el cultivo de <i>Capsicum</i> (Kothari <i>et al.</i> , 2010).	30
Figura 9. Inserción de fragmentos de ADN en plásmidos (Sadava, 2008).	37
Figura 10. Diagrama de flujo con metodología para regeneración y transformación <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i> L.	43
Figura 11. Protocolo de desinfección de semillas para <i>Capsicum annuum</i> L.	45
Figura 12. Plántulas con 15 días de germinación, con más de tres nudos y hojas verdaderas para disección.	49
Figura 13. Explantes tomados de plantas de tres semanas de edad. A. Planta con raíz, hoja cotiledonaria, hojas verdaderas (peciolo y láminas foliares) y nudo. B. Segmentos de hojas verdaderas con lámina foliar y peciolo.	50
Figura 14. Explantes provenientes de plantas de 2 semanas de edad utilizados en el establecimiento de los cultivos <i>in vitro</i> . A. Peciolo. B. Nudos. C. Segmentos de hojas cotiledonarias.	50
Figura 15. Disección de nudos para el ensayo 2.	51
Figura 16. Elongación de brotes adventicios.	52
Figura 17. Diagrama de flujo para aclimatización de plántulas regeneradas.	54
Figura 18. Metodología para verificación de integridad de plásmido.	55
Figura 19. Preparación de material biológico.	56
Figura 20. Bombardeo de material biológico.	56
Figura 21. Determinación de la actividad de β -gus por método histoquímico.	58

Figura 22. Formación de puntos de regeneración y brote adventicio proveniente del ensayo 1, A. Puntos regenerativos del tratamiento COR1A. B. Brote adventicio obtenido en el medio COR1A.....	65
Figura 23. Presencia de oxidación de explantes provenientes de medios de cultivo con Coctel 20 a partir del segundo subcultivo (4 semanas).	66
Figura 24. Repetición COR1A. a) y b) Formación de callo (7 días) , c) oxidación y pérdida de puntos de regeneración (3 meses).	68
Figura 25. Formación de brotes adventicios en tratamiento COR6 (15 días).....	71
Figura 26. Oscurecimiento de explantes y medio de cultivo de ensayo 2. a) COR6 (30 días), b) COR5 (15 días).	72
Figura 27. Raíces provenientes de explante en tratamientos COR 3A Y COR1A.	75
Figura 28. Medios de cultivo con nudos, oxidación de explantes (15 días).....	75
Figura 29. Explantes provenientes de plantas germinadas con dos semanas y cotiledones. A. Nudos con pérdida total de clorofila. B. Cotiledones de semilla....	78
Figura 30. Peciolos en medio de cultivo COR7 en el tercer subcultivo, a) Peciolos con 3 semanas de incubación sin tejido oxidado. b) Peciolos con 12 semanas de incubación con más del 50 % del tejido oxidado.	81
Figura 31. Hojas cotiledonarias en medio de cultivo COR7 en el tercer subcultivo, a) hojas cotiledonarias con 3 semanas de incubación con más del 50 % del tejido oxidado. b) hojas cotiledonarias con 12 semanas de incubación totalmente oxidada.	82
Figura 32. Formación de brotes adventicios provenientes de nudos.	83
Figura 33. Proliferación de brotes adventicios y formación de raíces a las seis semanas.....	83
Figura 34. Proliferación de brotes adventicios, explantes provenientes de entrenudo con 12 semanas.	84
Figura 35. Explante del grupo control de COR7 sin reguladores de crecimiento a las 12 semanas de edad posteriores a la disección.....	85
Figura 36. Aclimatación y pase a suelo. a) Plantas regeneradas <i>in vitro</i> , b) soluciones agrimycin-benomil y solución micorrízica, c) plantas de diferentes	

tamaños en recipientes con domo, d) plantas después de 30 días de ser trasplantadas sin domo, e) Plantas con fruto después de 60 días <i>ex vitro</i>	86
Figura 37. Multiplicación de brotes adventicios tras seis meses de aclimatización a) Multiplicación de brotes adventicios en tratamiento de solución micorrízica, b) multiplicación de brotes adventicios en tratamiento de solución Agrimycin-Benomil, c) Formación y maduración de frutos, solución micorrízica, d) Formación de frutos, de solución Agrimycin-Benomil.	88
Figura 38. Gel de agarosa al 1% del plásmido pEarly 100-GFP-GUS. Carril 1: marcador molecular de 1Kb, carril 2, 3 y 4: dilución 1:100 del plásmido, carril 5, 6 y 7: dilución 1:1000.	90
Figura 39. Explantes bombardeados teñidos en prueba de β -Glucoronidasa. a) Explante bombardeado 6 cm, b) Explantes bombardeado a 9 cm, c) Explante bombardeado a 12 cm, d) Explante control.....	93

Abreviaturas

l	Litro
ANA	Ácido 1-naftalenacético
AIA	Ácido indol-3-acético
AG ₃	Ácido giberélico
AgNO ₃	Nitrato de Plata
BA	6-bencil aminopurina
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
EtOH	Etanol
g	Gramo
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
mM	Milimolar
mg	Miligramo
MS	Medio Murashige y Skoog
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
¹ O ₂	Oxígeno singulete
pH	Potencial de hidrógeno
PPM	Plant Preservative Mixture
PVP	Polivinilpirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNS	Especies reactivas de nitrógeno

RESUMEN

La obtención de compuestos provenientes del género *Capsicum* ha sido vital para el desarrollo de productos de primera necesidad para diferentes industrias, la naturaleza de algunas moléculas contenidas en el fruto ha abierto líneas de investigación para tener una mayor comprensión del metabolismo de las mismas, mejoramiento genético de las especies, entre otras. Sin embargo, es necesario para todas ellas contar con un gran número de plantas en el menor tiempo posible. En el presente trabajo se planteó como objetivo determinar las condiciones nutrimentales bajo las cuales es posible modular la organogénesis *in vitro* de *Capsicum annum* (chile serrano) seleccionando el mejor explante y los componentes del medio de cultivo adecuados para obtener plantas completas y seleccionar las condiciones para la transformación de nudos mediante biobalística utilizando el plásmido pEarly101-AtPPiAsa4-GFP-GUS.

Se estableció un método de desinfección de semillas para la obtención de plantas *in vitro* probando la acción de los agentes desinfectantes EtOH al 70%, NaClO al 30% por 1 min, Tritón 100x (0.5%) por 15 min y presencia/ausencia del antibiótico Cefotaxime® (250 mg.l) en remojo por 24h.

Posteriormente se probaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (Ba) en las concentraciones $0.6 \frac{mg}{l}$, $1.2 \frac{mg}{l}$, $1.8 \frac{mg}{l}$ y $5 \frac{mg}{l}$ y AIA ($1 \frac{mg}{l}$) en tres ensayos para inducir la organogénesis con diferentes explantes incluyendo peciolos, láminas foliares, hojas cotiledonarias, nudos y cotiledones para seleccionar aquel en el que hubiera una respuesta favorable siendo el nudo. Una vez seleccionado el nudo como el mejor explante se hicieron las modificaciones pertinentes, es decir, el aumento de la concentración de ácido cítrico y ascórbico a $150 \frac{mg}{l}$, cisteína $100 \frac{mg}{l}$, adición de CuSO₄, AgNO₃ y $5 \frac{mg}{l}$ de Ba. Con estas modificaciones se lograron regenerar hasta 4 plantas por nudo. Para el pase a suelo se tomaron 50 plantas regeneradas y se aclimatizaron bajo condiciones de invernadero colocando el 50% con una solución de micorrizas y el otro 50% en una solución Agrimycin-Benomil al 4%. obteniendo un porcentaje de

multiplicación de brotes adventicios del 192% en el caso de aquellas plantas con solución micorrízica y 185 % en aquellos sumergidos en la solución Agrimycin-Benomil, en ambos casos se logró la fructificación.

Ya establecido el protocolo de regeneración, se realizó una transformación genética utilizando el plásmido pEarly101-AtPPiase4-GFP-GUS en nudos, probándose diferentes distancias (6,9 y 12 cm) utilizando micropartículas de tungsteno de 5 M (0.04 μ m) y realizando dos disparos en grupos de 4 explantes. Al evaluar la expresión transitoria del gen GUS a través de pruebas histoquímicas, no se logró determinar la transformación ya que los controles también presentaron expresión transitoria.

1. INTRODUCCIÓN

La población mundial aumenta día a día lo cual implica una demanda cada vez mayor de alimentos, fármacos y otros productos indispensables para los humanos. Los cultivos y métodos de cultivo tradicionales ya no son suficientes para abastecer las demandas de la población, por ello es necesario emplear estrategias nuevas para agilizar la producción y lograr un óptimo abastecimiento.

El surgimiento de la biotecnología ofrece opciones para agilizar procesos naturales con resultados reproducibles y a gran escala tal como lo es el cultivo de tejidos vegetales que mediante una serie de técnicas *in vitro* hace posible la reproducción de plantas con un objetivo fisiológico y genético deseado. Sin embargo, es necesario contar con plantas modelo (modelos biológicos) para agilizar estudios a diferentes niveles (fisiológico, bioquímico, molecular); estas plantas son especies que han sido ampliamente estudiadas dada su facilidad de cultivo, sobrevivencia, transformación, entre otras características que las vuelven muy accesibles y útiles para la investigación con aplicaciones biológicas, fisiológicas, bioquímicas, biotecnológicas, genéticas, etc. (Nature, 2017). El modelo biológico más estudiado es *Arabidopsis thaliana*, la cual es una planta con un ciclo de vida corto, cuyo genoma fue secuenciado totalmente, es utilizada en un gran número de experimentos genéticos ya que es de tamaño pequeño, autopolinizable y produce un gran número de semillas (Koornneeff y Meinke, 2010). Otro modelo ampliamente utilizado es tabaco, con el cual se han realizado un número amplio de investigaciones en el campo de la fisiología vegetal, así como a nivel molecular. Sin embargo, algunos modelos biológicos tienen la limitante de no ser especies alimenticias por lo que, en muchas ocasiones limita su aplicación a especies agronómicas.

Tanto la industria farmacéutica como la alimentaria, demandan la rápida obtención de compuestos provenientes de plantas tales como las capsaicinas, metabolito secundario proveniente del género *Capsicum* cuya producción es complicada en

cultivos celulares debido a que existe muy poca información al respecto, por ello es que *Capsicum annuum* (chile serrano) pudiera ser un candidato como modelo biológico y para ello surge la necesidad de establecer protocolos tanto para cultivos de callos como células en suspensión, así como la regeneración vía organogénesis o embriogénesis somática para lograr la obtención de transgénicos o cisgénicos y con ello tener un modelo caracterizado.

2. ANTECEDENTES

2.1 El chile serrano

El chile serrano (*Capsicum annuum* L.) es un fruto originario del continente americano, en México es la segunda variedad más representativa después del chile jalapeño, ya que la producción anual para el año 2009 fue de 216 mil toneladas en 2009 (SAGARPA, 2010). Además de tener una importancia cultural en el país, tiene múltiples aplicaciones a nivel industrial tales como producción de condimentos, extracción de capsaicinas, aplicaciones en farmacia, entre otras.

El cultivo de *Capsicum annuum* L. requiere de temperaturas que van desde los 15° hasta los 27°C, además requiere de condiciones específicas para el desarrollo de la planta tales como un pH de 5.5 – 7. Un exceso de riego puede causar la pérdida de hojas en la planta, y el tiempo aproximado para la obtención del fruto varía debido a condiciones ambientales, sin embargo, se obtiene entre los 120 a 150 días (FAO, 2013). La obtención de plantas sin fruto tiene lugar a las dos semanas máximo cuatro a partir de la germinación de semillas (SAGARPA, 2014).

Existen algunos problemas asociados al cultivo de esta especie como se presenta en la figura 1 donde se exponen algunas de las áreas de estudio más significativas del género *Capsicum* las cuales afectan significativamente la calidad y cantidad de los cultivos, por ello, es importante establecer protocolos para remediar problemáticas y favorecer el cultivo.

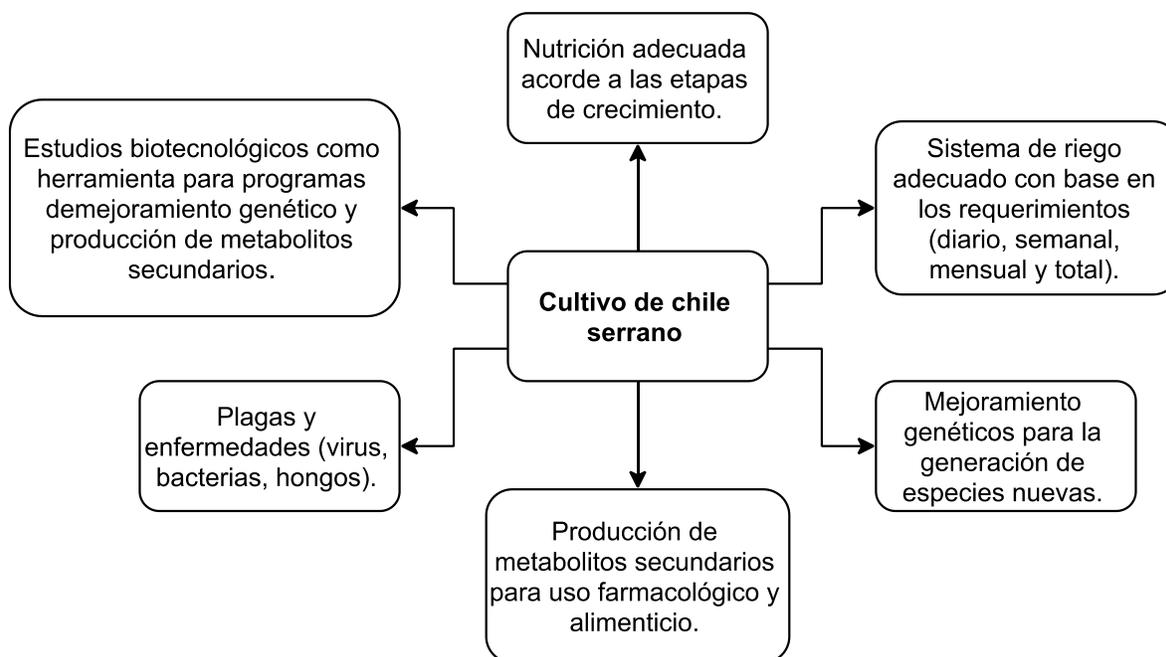


Figura 1. Principales áreas de estudio del cultivo de chile.

2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica.

El chile es una planta que taxonómicamente pertenece a la familia de las Solanaceae la cual consta de aproximadamente 80 géneros y 3000 especies. Dentro de la cual se encuentran otros cultivos de gran importancia como papa jitomate (tabla 1) (Kothari *et al.*, 2010). Botánicamente *Capsicum annum* es una planta herbácea anual, que se desarrolla en forma de semiarbusto o hierba dependiendo de la variedad de la que se trate y de otras condiciones de desarrollo tales como manejo y cuidados además de las condiciones climáticas de la zona de cultivo. Posee un tipo de reproducción autógama ya que tiene ambos sexos, es capaz de auto fecundarse, aunque existe la posibilidad de que una planta vecina pueda fecundarla (CONABIO, 2017; Barioglio, 2006).

La planta crece en forma de tallos con una altura variable, son erectos y ramificados de forma cilíndrica, las ramas que genera son pseudodicotómicas que llegan a tener una altura máxima de 4 m. Las hojas suelen crecer de forma única o en pares a partir de nudos con forma ovalada y de una longitud de hasta 10 cm. Presenta flores

en las axilas de las hojas y suelen ser curvadas, poseen un cáliz acampanado y son de color blanca o verde con cinco pétalos dando una forma acampanada (P&C Maderas, 2014).

Los frutos son bayas cuya constitución anatómica está formada por semillas y pericarpio, es decir, son lóbulos dentro de los cuales se encuentran la placenta y pared interior; suelen tener forma redonda, cónica, globosa o rectangular dependiendo de la especie de la que se trate al igual que el color que varía a lo largo de la vida del fruto los cuales son carnosos o secos. Las semillas se localizan adheridas al centro del fruto, son planas, lisas, blanquecinas o amarillentas y de un diámetro aproximado de 3 mm, el tiempo de vida útil promedio es de 4 a 5 años dependiendo de las condiciones en las que sean almacenadas (P&C Maderas, 2014; CONABIO, 2017).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del chile serrano (*Capsicum annum* L.). (CONABIO, 2017)

Clasificación taxonómica de chile serrano	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i> L.
Especie	<i>annuum</i> L.
Variedad	Tampiqueño 74

2.1.2 Origen y distribución del chile serrano

De acuerdo con varios autores, el origen del chile serrano es en el continente americano con una mayor concentración en zonas tropicales y subtropicales

2.1.3 Importancia económica

Al ser una planta cultivada en todo el mundo y con múltiples aplicaciones, tiene gran importancia comercial dentro y fuera del país. A nivel mundial la producción anual es de alrededor de 19 millones de toneladas (FAO, 2015) mientras que en México tiene lugar una gran producción de una amplia variedad de chiles, siendo de mayor relevancia 22 especies de chiles verdes y 12 de chiles secos que a su vez son clasificados en dulces y picantes.

El chile serrano es el segundo con mayor importancia comercial por debajo del jalapeño siendo los principales estados productores en el país Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco y el Estado de México (SAGARPA, 2010). En 2009 se obtuvo un volumen de 216 mil 717 toneladas producidas en Tamaulipas y Sinaloa conformando dos terceras partes de la producción con 38.7 y 30.9%, respectivamente (SAGARPA, 2010). Como se presenta en la figura 3.

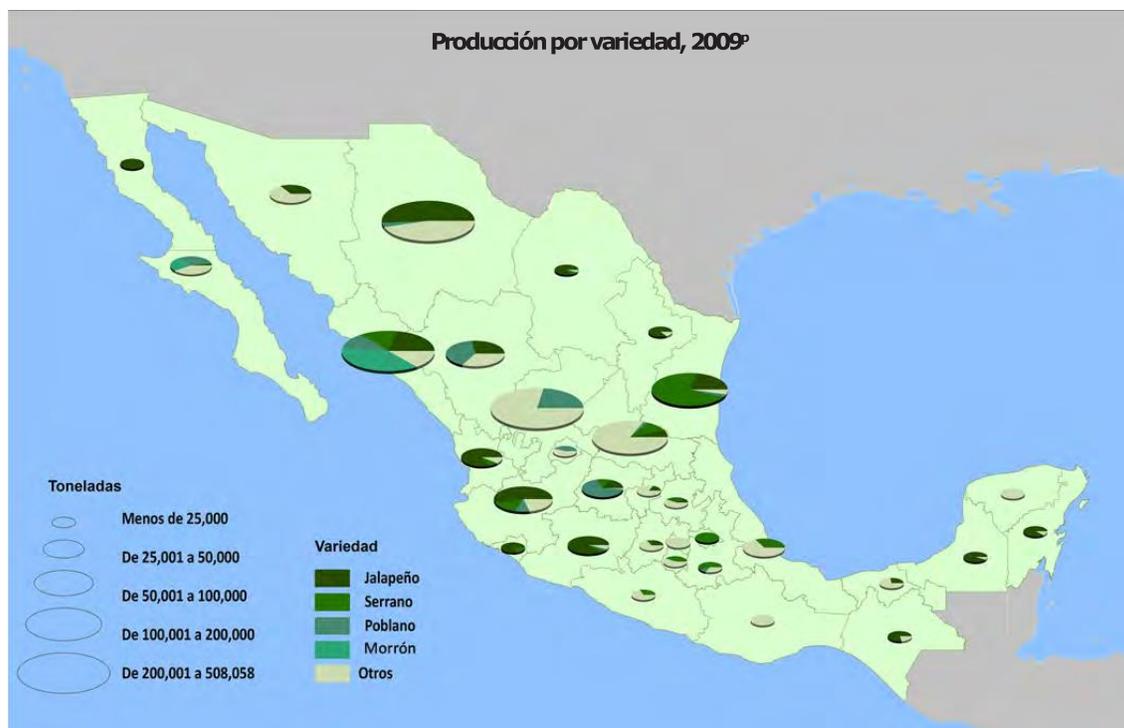


Figura 3. Panorama del cultivo del chile (SAGARPA, 2010).

A nivel mundial México es una potencia para la exportación de chiles y de acuerdo a estadísticas (FAO, 2017) y como se muestra en la figura 4, hasta el año 2013, es el principal país exportador de chiles verdes, pimientos picantes y pimientos verdes.



Figura 4. Estadísticas FAO exportaciones 1993-2013. (FAOSTAT, 2017).

A pesar de ser nuestro país el primer exportador a nivel mundial, como se muestra en la figura 5, algunas especies de chile deben ser importadas para abastecer las necesidades de la población ya que algunas especies del género *Capsicum* no han sido domesticadas para su cultivo en el país como *C. baccatum* que de acuerdo al Instituto Nacional de Antropología e Historia hasta el año 2009 no había sido comercializada dentro del territorio nacional (Long 2009).

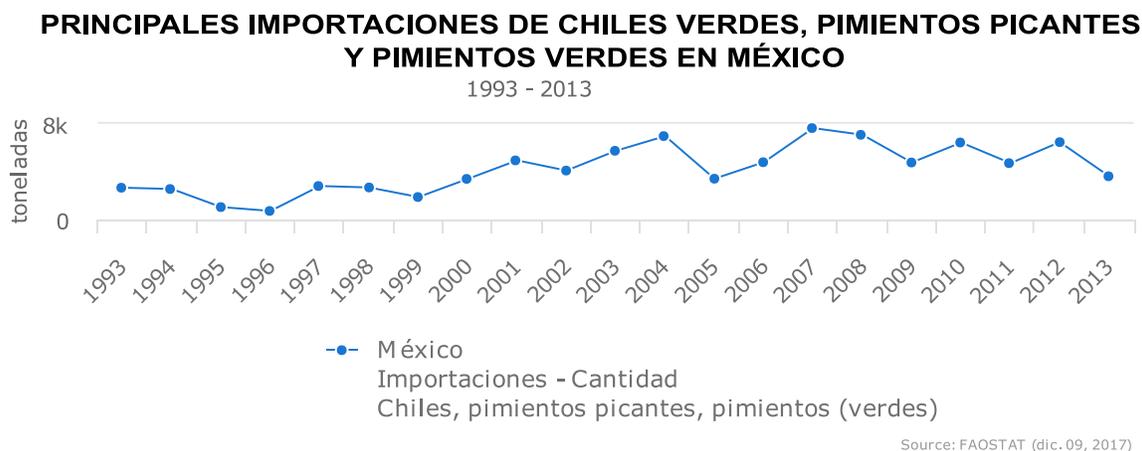


Figura 5. Estadísticas FAO importaciones 1993-2013. (FAOSTAT, 2017).

2.1.4 Usos de chile serrano

El chile serrano y en general el género *Capsicum* tiene muchas aplicaciones en la industria alimentaria ya que es un colorante y saborizante con múltiples aplicaciones tanto en la cocina casera como en el desarrollo de nuevos productos alimenticios y es aprovechado totalmente, desde las semillas hasta la piel.

Desde su aparición y domesticación 5000 años a. C (Long, 2009), ha tenido un papel crucial en la vida cotidiana, en aquellos años, era utilizado como parte del trueque juntos con otros alimentos de gran relevancia en la época como el cacao y el maíz. Además, era ofrendado como tributo a Moctezuma II y desde entonces era un complemento a la dieta del pueblo proporcionando sabores distintos a la comida junto con variedad en cuanto coloración y pungencia.

Su pungencia, también ha sido utilizado como un tipo de arma en civilizaciones antiguas (Long, 2009). Actualmente, esta actividad ha sido sustentada por la ciencia como su uso antimicrobiano natural en el crecimiento de la bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* utilizando extractos de *Capsicum annum* (Acero et al., 2003).

Por su aporte a la dieta, es un nutraceutico, ya que posee un alto contenido de ácido ascórbico con un aporte de vitamina C mayor al otorgado por una naranja, es rico

en minerales como manganeso, molibdeno, folatos, contiene tiamina además de otras vitaminas como la A, E y el complejo B (Kothari *et al.*, 2010).

En la industria farmacéutica se le han atribuido efectos terapéuticos ante ciertos padecimientos como reumatismo, cólicos, diarrea, asma, dolores musculares y de dientes, siendo su principal uso contra escarlatina maligna, entre otros. En la industria cosmética también es utilizado por su pigmento para la fabricación de lápices labiales y polvos (Kothari *et al.*, 2010; UNAM, 2017.a.).

2.1.5 Bioactivos de interés del chile serrano

Las características sensoriales del género *Capsicum* no son lo único que es aprovechado para ser tan comercializado, a nivel industrial existen muchos compuestos químicos de interés, entre ellos, se encuentran los responsables de la coloración. Estos son una mezcla de carotenoides entre los cuales se encuentran capsorubina, ésteres de capsantina, zeaxantina, critoxantina y los betacarotenos que además de aportar colores rojizos-violetas tienen un efecto antioxidante amortiguando y disminuyendo el efecto de las reacciones de radicales libres, son utilizados para la coloración de algunos embutidos, quesos, condimentos y postres (Kothari *et al.*, 2010).

Los compuestos responsables de la pungencia y picor son los capsaicinoides pertenecientes al grupo de los alcaloides, siendo la capsaicina ($C_{18}H_{27}NO_3$) el principal responsable del picor ha sido ampliamente estudiado. Este, es un producto de la condensación de 3-hidroxi, 4-metoxi benzil amino y el ácido decilénico y además de ser muy utilizado para la fabricación de salsas y condimentos, posee propiedades medicinales.

3. EL CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas mediante las cuales un explante, es decir, una porción de la planta (células o tejidos) es cultivada en condiciones asépticas en un medio de cultivo con una composición química específica (vitaminas, aminoácidos, sales, etc.) en un ambiente controlado de luz y temperatura dando como resultado una planta completa con las características morfogénicas idénticas a la planta madre como se presentan en la figura 6 (Roca y Mroginski, 1991; George, 2008).

Este conjunto de técnicas tiene una amplia gama de campos para su aplicación, entre ellos están incrementar la variabilidad genética de especies, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, obtención de líneas celular puras, producción de compuestos de interés (metabolitos secundarios), propagación a grande escala de plantas, transformaciones genéticas para resistencia de plantas ante compuestos químicos o plagas, entre otros (Roca y Mroginski, 1991). De esta manera, las diversas aplicaciones benefician tanto a productores como a la investigación científica haciendo de este conjunto de técnicas una buena herramienta para lograr diversos fines. Así para lograr determinado objetivo, es importante establecer las condiciones adecuadas, es decir, los estímulos y pasos a seguir para cada procedimiento es diferente para cada objetivo morfológico y a su vez no todas las plantas tienen respuestas iguales a los mismo estímulos e incluso existen plantas que algunas veces responden a los estímulos con dificultad y en ocasiones no responder a pesar de existir un antecedente de su eficacia, a esto en CTV se le conoce como recalcitrancia y se da en muchas especies del género *Capsicum* incluyendo *Capsicum annuum* L. (Roca y Mroginski, 1991).

Una de las principales aplicaciones del CTV es la micropropagación, gracias a la cual es posible agilizar procesos y reducir tiempos de cosecha al obtener plantas completas con características morfogénicas deseadas. A partir de un protocolo de micropropagación reproducible es posible realizar mejoras genéticas dando resistencia ante fertilizantes y fármacos que resultan agresivos para las plantas.

3.1 Factores que modulan la morfogénesis *in vitro*

Como se ha mencionado la respuesta morfogénica en CTV, depende de varios factores tanto intrínsecos del explante (genotipo, tipo de tejido, estacionalidad, posición del órgano dentro de la planta, etc.) así como factores externos o exógenos, tales como: medio de cultivo, reguladores de crecimiento, temperatura, fotoperiodo, humedad relativa, etc. Como se observa en la figura 6, dependiendo de la efectividad de estos estímulos, las células vegetales tendrán o no una respuesta recalcando la importancia de establecer las condiciones específicas para cada especie vegetal.

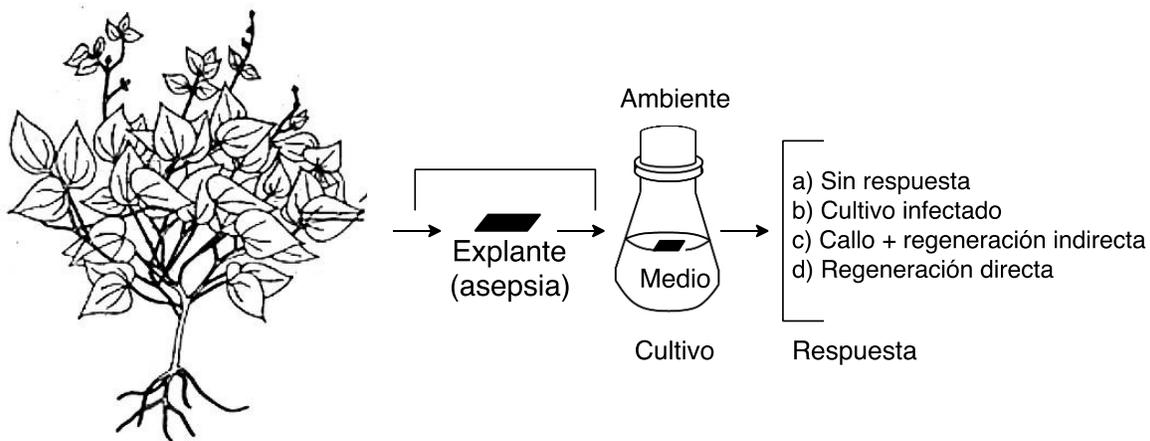


Figura 6. Respuesta morfogénica de cultivos vegetales *in vitro* (Roca y Mroginski, 1991).

3.1.1 Medios de cultivo

Todos los organismos requieren de distintas sustancias para cumplir sus requerimientos nutricionales de manera óptima. Sin embargo, al ser cada especie diferente, no todas tienen los mismos requerimientos y de acuerdo al objetivo morfogénico deseado puede variar la formulación ya que no es lo mismo mantener un cultivo no diferenciado o un cultivo diferenciado, algunos requerirán la adición de vitaminas o antibióticos que quizás otras especies no y pueden ser sólidos o líquidos.

Existen diferentes formulaciones de medios de cultivos utilizados en CTV, pero a pesar de que las formulaciones varían entre especies, suelen tener elementos en común como una fuente de carbono que a menos que sean cultivos autótrofos requieren de azúcar como sacarosa, glucosa o mioinositol que son los más utilizados por su alto desempeño en CTV, vitaminas, compuestos minerales que son generalmente nitratos, fosfatos, y sulfatos, agentes gelificantes que dependiendo de la cantidad de agua que requiera el explante deberá seleccionarse la concentración y el agente que comúnmente suelen ser agar, fitagel, gelzán, entre otros. También requieren de reguladores de crecimiento dependiendo del objetivo morfogénico del estudio y otros compuestos tales como aminoácidos esenciales, fuentes de nitrógeno, soluciones antioxidantes, entre otros (Roca y Mroginski, 1991).

3.1.2 Hormonas y reguladores de crecimiento

Se conoce como hormonas vegetales a los compuestos orgánicos que se son producidos durante el metabolismo, son sintetizados en la planta y trasladados a órganos en los que generan una respuesta fisiológica a concentraciones muy bajas, mientras que aquellos compuestos que son sintetizados químicamente y generan respuestas fisiológicas similares se les conoce como reguladores de crecimiento. (Salisbury y Cleon, 1992). Naturalmente, la concentración de hormonas y reguladores de crecimiento es crítica, ya que se ha demostrado que al disminuir concentraciones tienen un efecto estimulante y al estar en concentraciones mayores tienen efectos inhibitorios, para establecer la concentración adecuada, es necesario determinar el objetivo a seguir y realizar una serie de experimentos. De acuerdo al objetivo a seguir, es necesario seleccionar los reguladores de crecimiento adecuados ya que cada uno tiene una función específica y existe una clasificación de acuerdo a la respuesta generada tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Reguladores de crecimiento, síntesis, precursores y funciones principales (Peter, 2004).

Regulador de crecimiento	Precursor	Sitios de biosíntesis	Transporte	Efectos
Giberelinas	Gliceraldehído-3-fosfato.	Cloroplastos y membranas citoplasmática.	Vía floema y xilema.	Elongación de tallo. Inducción de germinación de semillas. Producción de enzimas durante germinación. Desarrollo de frutas. Inducción de masculinidad en flores dioicas.
Auxinas	Triptófano	Primordios foliares de plántulas hojas jóvenes de plántulas	Cambium vascular, cadenas pro cambiales y células epidérmicas. El transporte a la raíz implica el floema.	Alargamiento celular. Elongación de tallo. División celular. Diferenciación de tejido vascular. Estimulación de raíces. Retraso en senescencia de hoja. Floración.
Citocininas	Adenina	Raíces y semillas en germinación.	Vía xilema de ápices de raíces	División celular. Morfogénesis. Crecimiento de brotes adventicios. Expansión de hojas. Retraso en senescencia de hoja. Mejora de apertura estomática en algunas especies. Desarrollo de cloroplastos.
Etileno	Metionina	Tejidos en maduración y en senescencia (Por crecimiento o por respuesta a estrés).	Difusión desde el sitio de síntesis.	Disminución de alargamiento del tallo. Engrosamiento de tallo Crecimiento lateral. Estímulo de respuesta ante heridas. Crecimiento y diferenciación de brotes y raíces. Formación de raíces adventicias. Abscisión de hojas y frutos. Inducción de floración. Inducción de femineidad en plantas dioicas. Maduración de fruto. Senescencia de flores y hojas.

3.1.3 Tipo y edad del explante

El tipo de explante que será utilizado dependerá del objetivo a seguir. Como se ha mencionado, cada especie es distinta y no todos los explantes responden de la misma manera ya que son muy dependientes del genotipo, por ejemplo, en cultivos de yuca y chile al ser sometidos a las mismas condiciones (ambientales y tipo de medio de cultivo utilizado) la respuesta *in vitro* de los explantes no es igual.

Es recomendado usar explantes provenientes de plántulas jóvenes ya que los meristemas presentan mayor actividad y los explantes son menos propensos a oxidarse. Existen muchos segmentos de la planta que pueden ser disectados para utilizarse como explante (ver figura 10), desde yemas apicales hasta raíces han sido objeto de estudio para *Capsicum annuum* con el fin de regenerar plantas tal como se muestra en la Tabla 1. Donde se observa que la mayoría de los explantes utilizados provienen de cotiledones e hipocótilos (ver figura 7), que al ser disectados durante las primeras etapas de la vida de la planta tienen zonas meristemáticas muy activas favoreciendo la división celular y la diferenciación celular (Roca y Mroginski, 1991).

El tamaño del explante también tiene efectos los cultivos *in vitro*, para la inducción de callos (cúmulo de celular vegetales no diferenciadas) es muy común utilizar explantes grandes, sin embargo, el utilizar explantes de grandes tamaños tiene un riesgo más alto de contaminación. Los explantes más pequeños suelen requerir de medios de cultivo con mayor complejidad, así que tampoco es muy adecuado utilizarlos, sin embargo y como se ha mencionado con anterioridad, el tipo, edad y tamaño del explante dependerán de la especie que será utilizada y del objetivo morfogénico buscado (Roca y Mroginski, 1991; Sanatombi y Sharma, 2008).

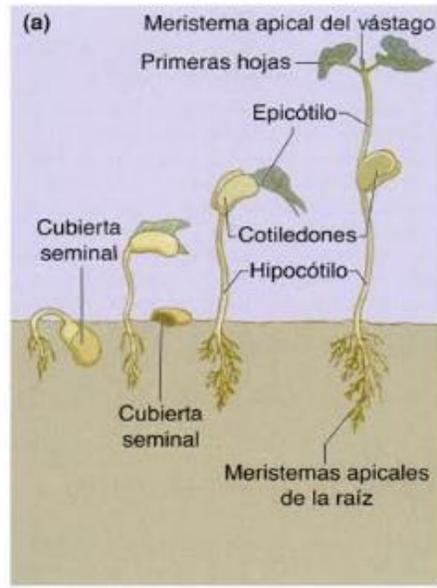


Figura 7. Desarrollo de plantas dicotiledóneas (Curtis *et al.*, 2006).

3.1.4 Meristemos

A diferencia de los animales, las plantas no limitan su división celular a las etapas embrionarias y de desarrollo ya que tienen la capacidad de desarrollarse ilimitadamente dependiendo del tipo de planta del que se trate, por ejemplo, los perennes pueden vivir por miles de años, mientras que las plantas anuales y bienales tiene un ciclo de vida limitado a uno y dos años respectivamente. Esta capacidad de mantener latente la división celular, se debe a que existen tejidos en los que las células embrionarias permanecen latentes y se les conoce como meristemos (Campbell, 2005). Existen dos tipos de meristemos, laterales y apicales, ambos cumplen con distintas funciones en cuanto al tipo de crecimiento de la planta tales como se muestran en la tabla 3 (Raven, 1992; George, 2008).

Tabla 3. Diferencias y funciones de meristemos (Campbell, 2005)

Meristemo	Tipo de crecimiento	Sitio activo	Función
Apical	Primario	Extremos de tallos, raíces y brotes	Extensión del cuerpo vegetal. Aumento de exposición a luz y CO ₂ . Formación de tallos, raíces, yemas, nudos y hojas.
Lateral	Secundario	Cilindros de células en división presentes en tallos y raíces.	Aumento de la circunferencia en tallos y raíces. Formación de floema y xilema

3.1.5 Condiciones de incubación

Las condiciones de incubación deben asemejar las condiciones naturales de cultivo, es decir, hay cultivos que crecen en climas cálidos mientras que otros lo hacen en climas fríos, así, en las cámaras de incubación la temperatura debe de estar en un rango adecuado para favorecer el crecimiento de los cultivos *in vitro*. Para lograrlo es necesario contar con un buen sistema de ventilación y controles de temperatura. La humedad relativa suele estar en un rango de 70-80% (Roca y Mroginski, 1991; SAGARPA, 2010).

La luz también es un factor importante ya que, en condiciones normales, las plantas suelen tener periodos de luz y oscuridad, mismos que son acondicionados y alternados en cuartos de incubación los cuales son de 18 horas luz con 6 de oscuridad a excepción de aquellos explantes en los que la oscuridad favorece el crecimiento (SAGARPA, 2010).

3.2 Vías regenerativas

Para obtener plantas completas provenientes de cultivos *in vitro*, se recurren a las dos vías morfogenéticas, la organogénesis o la embriogénesis somática, ambas vías pueden seguir una vía directa o indirecta; ésta última a través de un paso previo que es la formación de callos, lo cual es definido como una masa amorfa de células no diferenciadas. El tipo de vía seleccionada dependerá de algunos factores como la recalcitrancia del cultivo y el objetivo deseado.

3.2.1 Embriogénesis somática

Es el proceso mediante el cual se forma un embrión proveniente de células somáticas que no provienen de la fusión de gametos. Estos embriones poseen características que los diferencian de embriones cigóticos como la no unión vascular del embrión con tejido materno, eje radical-apical, posible fusión de cotiledones, entre otros. Además, la embriogénesis somática puede dar de dos maneras, directa e indirectamente; es decir, que puede darse la regeneración de plantas completas a partir de los embriones somáticos o desarrollar callos (conjunto de células no diferenciadas) respectivamente (Abdelnour y Vincent, 1994).

3.2.2 Organogénesis

Es el proceso fisiológico en el cual los meristemas son capaces de diferenciarse y formar órganos, este proceso es posible gracias a la totipotencialidad de las células vegetales, es decir, de la capacidad de tener las células vegetales para diferenciarse y diferenciarse para regenerar plantas completas idénticas a la planta madre tanto genética como fenotípicamente. El proceso de regeneración de la planta es mediado por algunos factores como las condiciones de incubación, factores ambientales, tipo de explante y estímulos celulares específicos como los generados por la acción de reguladores de crecimiento y hormonas (Abdelnour,

1994; Azcon, *et al.*, 2008). Al igual que la embriogénesis somática, la organogénesis puede darse por dos vías directa e indirecta.

La organogénesis directa se da cuando la formación de órganos y brotes adventicios proviene directamente del explante mientras que en la organogénesis indirecta la formación de órganos se da con un paso intermedio dado por la formación de callos.

3.2.3 Cultivo de tejidos del Chile

A últimas fechas, se ha buscado la obtención de cultivos *in vitro* de chile serrano para estudiarlo desde diferentes puntos de vista, pero existen algunos limitantes, como se observa en la figura 8, donde se exponen algunos de los principales problemas que existen respecto al género *Capsicum*.

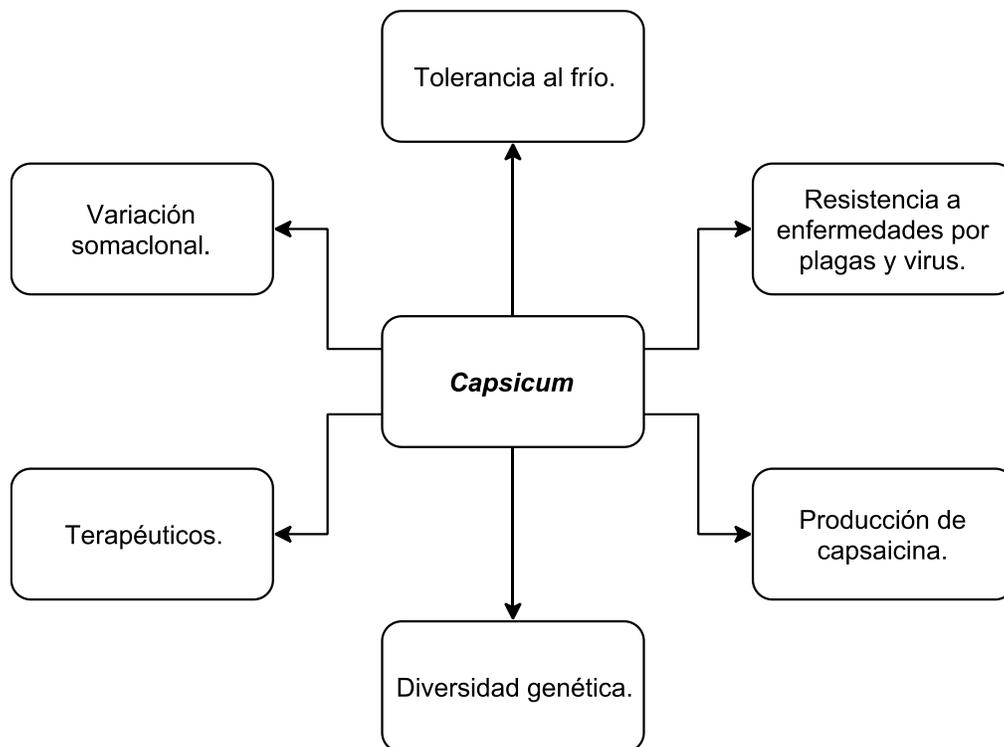


Figura 8. Factores abióticos que afectan el cultivo de *Capsicum* (Kothari *et al.*, 2010).

Por ello se ha planteado como una alternativa la regeneración de cultivos *in vitro* de chile serrano a partir de la organogénesis directa o indirecta, así como la

embriogénesis somática, directa e indirecta, de esta manera, es posible estudiarlo de una manera más profunda y rápida para encontrar soluciones a estos problemas.

3.2.4 Regeneración *in vitro* del chile serrano

El género *Capsicum* como se ha mencionado anteriormente pertenece a la familia de las Solanaceae al igual que otros cultivo de gran interés comercial miembros de la misma familia como la papa y la berenjena, sin embargo en términos de biotecnología de plantas, la respuesta de *Capsicum* no es siempre la deseada, esto es por la naturaleza recalcitrante en términos de cultivo de tejidos vegetales el cual a través de una serie de factores entre ellos la dependencia genotípica en la (Kehie, *et al.* 2012).

En tabla 4 se muestra una recopilación de los experimentos realizados por varios autores en los cuales se ha reportado la regeneración de plantas del género *Capsicum*.

Tabla 4. Revisión bibliográfica, regeneración vía Organogénesis de *Capsicum annuum*. Tomado de Kothari *et al.*, 2010

Especie	Tejido	Vía de regeneración	Concentraciones de hormonas y reguladores de crecimiento.	Autor/ año de publicación
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA (8.88 µM) + IAA (2.85–5.71 µM)	Gunay and Rao (1978)
<i>C. annuum</i>	Embrión cigótico	Organogénesis	BA (22.2 µM)	Agrawal and Chandra (1983)
<i>C. annuum</i>	Explante de plántula	Organogénesis	BA (2.22–44.4 µM)	Phillips and Hubstenberger (1985)
<i>C. annuum</i>	Hipocótilo, cotiledón, tallo, hoja, raíz, embriones	Organogénesis	BA (22.2 µM) + IAA (2.85–5.71 µM)	Agrawal <i>et al.</i> (1989)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón, hipocótilo	Organogénesis	BA(2.22, 4.40, 8.90 µM) + IAA(0.57, 5.71 µM)	Arroyo and Revilla (1991)
<i>C. annuum</i>	Explante de plántula	Organogénesis	BA (22.2 µM) + NAA (0.54 µM)	Ebida and Hu (1993)
<i>C. annuum</i>	Semillas maduras	Organogénesis	MS sin reguladores de crecimiento	Ezura <i>et al.</i> (1993)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA (8.88 µM) + IAA (2.85 µM) +	Hyde and Phillips (1996)
<i>C. annuum</i>	Hipocótilo	Organogénesis	AgNO ₃ (5.85 µM) BA (13.3 µM) + IAA (5.71 µM) BA(44.4 µM) BA (22.2 µM)	Christopher and Rajam (1996)
<i>C. annuum</i>	Hipocótilo	Organogénesis	MS Sin reguladores de crecimiento	Ramírez-Malagón and Ochoa-Alejo (1996)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	–	BA (13, 35 µM) + IAA (3.4–5.9 µM) + EBr (0.1 µM)	Franck-Duchenne <i>et al.</i> (1998)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA (22.2–31 µM) + PAA (14.7 µM)	Husain <i>et al.</i> (1999)
<i>C. annuum</i>	Embriones cigóticos	Organogénesis	BA (22.2 µM) + NAA (5.37 µM)	Arous <i>et al.</i> (2001)
<i>C. annuum</i>	Explantos embrionarios	Organogénesis	TDZ (4.5–9 µM)	Dabauza and Pena (2001)
<i>C. annuum</i>	Hoja, cotiledón	Organogénesis	TDZ (4.5–13.5 µM)	Venkataiah <i>et al.</i> (2003)
<i>C. annuum</i>	Cotiledón	Organogénesis	BA (22.2 µM) + PAA (14.7 µM)	Joshi and Kothari (2007)
<i>C. annuum</i>	Hoja	Organogénesis	BA (8.8 µM) + IAA (11.4 µM)	Sanatombi and Sharma (2008)

3.3 Transformación genética de cultivos celulares.

Desde que la humanidad comenzó a domesticar plantas e incorporarlas a sistemas de cultivo hace aproximadamente 10,000 años fue posible realizar cruza entre ellas con el fin de obtener las mejores características obteniendo así un mejoramiento genético de especies, esto es posible ya que existe variabilidad genética, es decir, que los caracteres deseables de expresar pueden incorporarse mediante la reproducción sexual. Sin embargo, existe una limitante en este método debido a que existe un número finito de cruza debido a barreras de cruzabilidad (Gutiérrez, 2003; Díaz, 2004, Renneberg, 2008).

Actualmente se cuenta con herramientas biotecnológicas que permiten no sólo la incorporación de genes deseados de la misma planta, sino que es posible introducir genes de otras especies vegetales sin importar que tan cercanas o lejanas sean a la especie a modificar, de esta manera la transformación genética en plantas hace posible la producción de genotipos de interés mediante la adición de genes foráneos con funciones estables y específicas que se expresarán en plantas transformadas, reproducibles sin alterar el fondo genético original (Gutiérrez, 2003; Díaz, 2004; Chaparro, 2012).

Para realizar una transformación genética existen requerimientos que deben cumplirse sin importar la especie de la que se trate, estos son: establecimiento de un protocolo de cultivo de tejidos para regeneración *in vitro* de plantas completas y fértiles, un vector de transferencia adecuado que permita la transferencia y clonación del gen de interés, definir un protocolo de transformación *in vitro* y contar un método de análisis para poder determinar la presencia del gen en la planta (Díaz, 2004; Chaparro, 2012).

3.3.1 Sistemas de transformación

Como medida de protección ante agentes indeseables, las plantas cuentan con paredes y membrana celulares los cuales implican un obstáculo para la transferencia de material genético, por ello es necesario contar con un método para lograr la entrada de manera exitosa y puede hacerse de manera directa e indirecta (Gutiérrez, 2003; Díaz, 2004; Chaparro, 2012).

La forma indirecta de realizar una transformación genética consiste en utilizar vectores biológicos mediante la patogenicidad en plantas con virus y bacterias con el fin de introducir satisfactoriamente los genes de interés en el material biológico. A continuación, se describe el método indirecto más utilizado en gran diversidad de especies vegetales:

Virus: Los virus que han mostrado tener una efectividad alta para estos propósitos son *Geminivirus* y *Caulimovirus*, ambos virus de DNA. Al utilizar un virus para la transferencia de material genético se asume que habrá mayor eficacia debido a que estos microorganismos tienen alta patogenicidad e infectan plantas de manera homogénea, rápidamente, alta producción de proteínas y expresividad. Sin embargo, al tratarse de virus, la cantidad de material genético puede verse reducida y la probabilidad de infección al grado de dañar irreversiblemente a la planta es muy alto.

Agrobacterium spp. Consiste en aprovechar la transferencia horizontal de material genético de bacterias hacia plantas. El método consiste en una serie de pasos que incluyen hacer herida en las células del material biológico para facilitar la adherencia de la bacteria, periodos de cocultivo para asegurar la transferencia de T-DNA a células vegetales y finalmente debe combatirse la infección mediante el uso de antibióticos para eliminar la bacteria y regenerar la planta transgénica. Este método es de los más utilizados dada la simplicidad de los materiales utilizados y la efectividad de la infección y se han desarrollado algunos otros métodos que combinan el uso de *Agrobacterium* con virus. Sin embargo, existe el mismo riesgo que al utilizar virus, ya que puede expandirse la infección a un punto en el que el

explante no pueda recuperarse o que la bacteria no sea afín al hospedero, pero con modificaciones en el método pueden evitarse este tipo de contratiempos.

La manera directa implica la utilización de métodos físicos para la transferencia del material genético, algunos de ellos se describen a continuación:

Transferencia por protoplastos: Con este método es posible permitir el paso de ADN mediante la inducción de permeabilidad en la membrana utilizando polietilenglicol (PEG), poly-L-ornitina y Fosfato de Calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), los cuales transforman protoplastos (célula vegetal sin pared celular).

Microinyección: Método para insertar material genético utilizando microcapilares, microagujas y micro manipulador junto con técnicas de microscopía que hace posible la inyección de ADN y otros compuestos en células u órganos seleccionados haciendo más segura y precisa la entrada de material genético.

Electroporación: Método que permite entrada de material genético mediante el aumento de la conductividad eléctrica de las membranas generado por un campo eléctrico, para la generación de poros reversibles por los cuales es posible introducir macromoléculas en un lapso corto bajo condiciones definidas de tiempo y voltaje.

Fibras de silicón carbonadas: Método que introduce ADN a células mediante fibras de silicón carbonadas de una longitud 10- 80 μm contenidas en un medio de cultivo con células en suspensión en presencia ADN plasmídico, se realiza agitación violenta en la que las fibras de silicón a altas velocidades se tornan en micro agujas que introducen el material genético en poros celulares.

Biobalística: Es el método de transformación genética más utilizado, el cual consiste en el bombardeo de material vegetal utilizando balas de oro o tungsteno cubiertos del material genético deseado a altas velocidades atravesando pared y membrana celular sin dañar letalmente el material biológico utilizado.

Las balas utilizadas tienen un tamaño de 0,4 a 3 μm y son disparada mediante el impulso de descargas eléctricas o por la presión de gas, particularmente Helio

directo al material vegetal utilizado que comprende desde células, meristemos, callos, órganos y tejidos hasta plantas completas (Díaz, 2004).

El proceso se lleva a cabo en una cámara de Biobalística conectada a una bomba de vacío conectada a su vez a un tanque de gas, la presión es regulada por una membrana de ruptura que al romperse deja pasar el aire a presión hacia una membrana que contiene balas cubiertas de ADN que llegan directo al material biológico y se incorporan de manera azarosa atravesando membrana y pared celular (Gutiérrez, 2003).

Después de la transformación, se realiza un cultivo en el que se transfiere al medio que propicie la regeneración para obtener una planta completa (Díaz, 2012). Durante el proceso de regeneración se realizan pruebas para detectar la presencia del gen en el tejido vegetal mediante pruebas histoquímicas o incorporación de antibióticos para seleccionar aquellas plantas que hayan sido transformadas exitosamente (Gutiérrez, 2003; Díaz, 2012;)

3.3.1 Construcción de plásmidos

Para llevar a cabo transformaciones genéricas, es necesario utilizar un vector que contenga a los genes que se desean transmitir y generalmente estos vectores son plásmidos o cósmidos (Gutiérrez, 2003).

Los plásmidos poseen características especiales que los hacen aptos para transformaciones genéticas ya que tienen secuencias pequeñas como los plásmidos provenientes de *E. coli*, que tienen de 2000 a 6000 pares de bases en comparación de cualquier cromosoma que suele tener millones de estas. Al tener un tamaño pequeño, las enzimas de restricción que son utilizadas para hacer cortes haciendo más fácil el proceso ya que al volver el plásmido una secuencia lineal se forman extremos cohesivos que se pueden aparear con extremos cohesivos de fragmentos de ADN formando un plásmido circular con información genética conocida como se muestra en la figura 9. Además, tienen un origen de replicación conocido como “*ori*”

que permite la replicación del plásmido independiente del cromosoma del hospedero (Sadava, 2008).

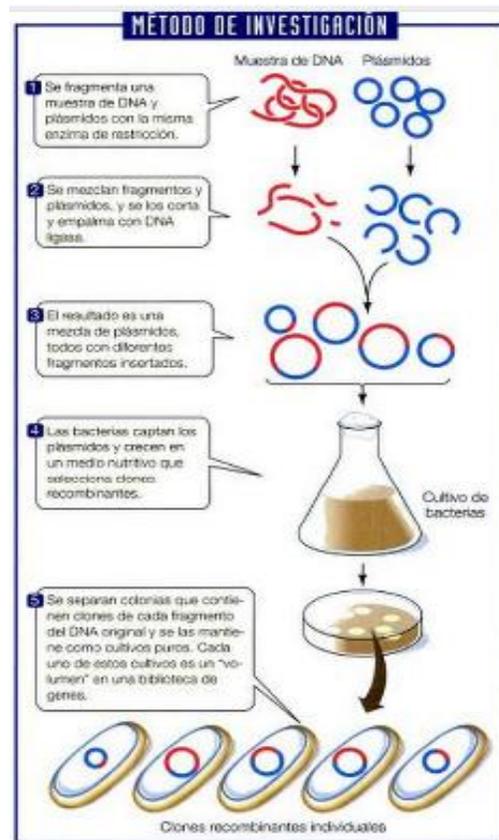


Figura 9. Inserción de fragmentos de ADN en plásmidos (Sadava, 2008).

3.3.1.1 Promotores

Una vez insertado el material genético, es de vital importancia que los genes insertados tengan expresión estable, esta expresión está determinada por secuencias promotoras las cuales regulan la expresión de secuencias de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) adyacente y funcional que se traduce en proteínas. En biotecnología es un tema muy estudiado ya que el estudio de promotores ha permitido incrementar la actividad transcripcional y disminuyen la probabilidad de presentar silenciamiento genético. Existen diferentes tipos de promotores, los principales son constitutivos, tejido-específicos, estadio-específicos, sintéticos e inducibles diferentes entre sí por el funcionamiento, y nivel de expresión genética.

Los promotores constitutivos son aquellos que promueven altos niveles de expresión transgénica sin importar el tejido u órgano en el que haya sido introducido de material genético, por lo cual han sido muy utilizados en transformación de mono y dicotiledóneas intensificando la regulación de la expresión genética. Los promotores inducibles son aquellos que son activados mediante estímulos controlados ya sean físicos, químicos o endógenos; tienen control temporal, espacial con mucha precisión, los tejido-específicos o estadio-específicos son activos en etapas específicas del desarrollo de la planta y en tejidos particulares. Ya que son inducidos por factores endógenos y exógenos, se considera que forman parte de los promotores inducibles mientras que los sintéticos permite el control transcripcional de múltiples transgenes modificando patrones de expresión genética a conveniencia según sea el objetivo biotecnológico a seguir. (Guglielmo y Fernández, 2016).

3.3.2 Proteínas Fluorescentes

Para la detección de proteínas en tejidos era muy común utilizar herramientas como microscopía, la cual requiere utilizar material biológico muerto, dificultando la detección y el seguimiento de su localización en tejidos vegetales. Para ello existe un grupo de proteínas que tienen como función facilitar el rastreo de otras proteínas en células y organismos *in vivo*, conocidas como proteínas fluorescentes.

Fueron identificadas en medusas provenientes del Pacífico que son capaces de emitir luces por un proceso de bioluminiscencia (UNAM, 2017.b.), como *Aequorea victoria* que emite luz verde debido a la presencia de la proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) que posee propiedades útiles para su uso en biología molecular como la ausencia de cofactores para su funcionamiento, plegamiento espontáneo, no toxicidad, resistencia a cambios de pH, temperatura y concentraciones diversas en el medio de cultivo

Con el paso de los años, se realizaron modificaciones de aminoácidos en GFP como la sustitución de treonina 203 por tirosina generando fluorescencia amarilla y nombrada YFP. De igual manera, con otra serie de sustituciones surgió la BFP con

fluorescencia azul (Sánchez, 2013; UNAM, 2017.b.). También se han descubierto otras proteínas fluorescentes tales como la DsRed, proteína que emite fluorescencia roja proveniente de la anémona *Discosoma striata*.

Estas proteínas tienen la capacidad de mezclarse con otras en las que se tiene cierto interés y por ello son útiles como marcadores de plegamiento tridimensional y rastreo óptico en células vivas utilizando microscopía de fluorescencia (Sánchez, 2013), por estas razones las proteínas fluorescentes son muy útiles durante las transformaciones genéticas ya que permiten el rastreo de las proteínas de interés y permiten reconocer si se ha llevado a cabo una transformación o no y en qué sitios se dio lugar en tejidos vivos.

3.3.3 Genes reporteros

Los genes reporteros han sido utilizados por la ingeniería genética para detectar si el gen de interés ha sido transferido e integrado al genoma deseado, forma parte del vector de transformación (Gutiérrez, 2003).

Muchos plásmidos contienen genes capaces de dar resistencia a ciertos antibióticos y funcionan como genes reporteros o marcadores genéticos (Sadava, 2008). Estos, están compuestos por secuencias de genes que codifican para enzimas que son fácilmente analizables, entre las más comunes están la β -glucoronidasa (GUS) acetiltransferasa (CAT), luciferasa bacteriana, entre otras.

Los genes reporteros se usan para monitorear la función de secuencias reguladoras, promotores y su uso se ha incrementado en investigación por la utilidad que tienen además en ensayos transitorios (Miles, 1998).

3.3.3.1 Agentes de selección

Para poder demostrar la eficacia de una transformación genética es necesario identificar a las células que han incorporado el material genético de interés de aquellas que no mediante un proceso de selección en el cual se favorece el desarrollo de las células transformadas y es inhibido el de las células no

transformadas. Para esto, es necesario que en el material genético de interés sean introducidos genes de resistencia a determinados compuestos tales como antibióticos o herbicidas. Entre los agentes de selección más comunes se encuentran Higromicina, Blastidina, Zeocina entre otros (Chávez, 2001, IBIAN, 2017). En el caso de los herbicidas, son necesarios en la industria agropecuaria ya que confieren resistencia a malezas indeseables las cuales han fortalecido su metabolismo en algunos casos y la absorción por plantas se ve disminuida. Entre los más comunes se encuentra el glufosinato de amonio comercialmente conocido como Basta® o Finale® el cual impide la síntesis de L-glutamina, la cual es fundamental en la formación de proteínas, asimilación de amonio y regulación de nitrógeno en plantas (Valenzuela, 2000; FAO, 2017, Larran et. al, 2017).

3.3.4 Transformación genética de cultivos celulares de chile serrano

Desde de las primeras transformaciones genéticas en *Capsicum annuum* utilizando *Agrobacterium spp.* Se han desarrollado otras técnicas y se ha variado el material biológico con el fin de optimizar los métodos como se muestra en la tabla 5 donde se observa que a pesar de utilizar métodos directos de transformación, los indirectos también han arrojado resultados positivos y transformaciones exitosas, y aunque en método de Biobalística no está presente en la mayoría de los estudios realizados es posible que bajo las condiciones adecuadas se obtengan resultados favorables y metodologías exitosas.

Tabla 5. Transformación genética en *Capsicum annuum* con distintos vectores. Tomado de Kothari *et al.* 2010

Especie	Sistema de transformación	Tejido	Resultados	Autor/ año de publicación
<i>C. annuum</i>	<i>Agrobacterium</i> cepa A282,C58: pCV 3850 (nptII, gus)	Hipocótilo, cotiledón y hoja,	GUS positivo	Liu <i>et al.</i> (1990)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i> cepa LBA 4404, p5T35 AD (gen aceloacetato sintasa (ALS), gus, pSLJ 1911, (npt II, gus), pWTT2039 (hpt, gus).	Cotiledón	Tejido transformado GUS positivo	Engler <i>et al.</i> (1993)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i> cepa LBA 4404, pROK1/105 (CMV I17 N- RNA Satelite).	Cotiledón	4% de plantas transformadas	Lee <i>et al.</i> (1993)
<i>C. annuum</i>	nptII <i>A. tumefaciens</i> cepa GV 3III-SE, (CMV-CP, npt II)	Hojas jóvenes	Plantas transgénicas con gen (CMVCP) expresado	Zhu <i>et al.</i> (1996)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i>	Hojas jóvenes	Líneas transgénicas	Kim <i>et al.</i> (1997)
<i>C. annuum</i>	pROK1/105 (cmv. RNA Satélite, nptII)	Cotiledón	Plantas transgénicas	Manoharan <i>et al.</i> (1998) Jayashankar <i>et al.</i> (1997)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i> cepa EHA 105, (pBI 121)(npt II, gus)	Tejidos heridos	Raíces pilosas	Li <i>et al.</i> (2003)
<i>C. annuum</i>	<i>A. rhizogenes</i> strain K 599(gus)	Hipocótilo Cotiledón	40.8% de plantas transgénicas	Hyde and Phillips (1996)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i> cepa LBA 4404(nptII) <i>A. tumefaciens</i> cepa EHA 105, LBA	Cotiledón Hipocótilo	Plantas transformadas con fase de callo	Lee <i>et al.</i> (2004) (1996)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i> cepa C58 <i>A. tumefaciens</i> cepa A281	Cotiledón	14-47% de transformación en callo con cepa C58	Dabauza <i>et al.</i> (2010)
<i>C. annuum</i>	<i>A. tumefaciens</i> cepa 4404,pCAMBIA 2300(TMV-CP,PPI1)	Hipocótilo	Brotos transformados	Delis <i>et al.</i> (2005)
<i>C. annuum</i>	Transformación mediada por PEG, LBA4404, pBI121(nptII) pCAMBIA::Ac(hpt, gus)	Protoplastos mesofílicos	Expresión transitoria y transformación eficiente	Jeon <i>et al.</i> (2007)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Establecer un protocolo de regeneración vía organogénesis de *Capsicum annum L.* y de transformación genética mediante biobalística.

4.2 Objetivos particulares

- Seleccionar el mejor explante para la regeneración *in vitro* de plantas.
- Establecer las condiciones nutrimentales que se requieren para la regeneración *in vitro* de *Capsicum annum L.*
- Enraizar y aclimatar plantas regeneradas.
- Determinar las condiciones para la transformación de plantas mediante biobalística utilizando el plásmido pEarly101-AtPPiase4-GFP-GUS.

5. HIPÓTESIS

1. Si la regeneración *in vitro* depende del tipo de explante, el medio de cultivo y las condiciones de incubación entonces la adecuada selección del medio de cultivo y el tipo de explante garantizarán la regeneración de *Capsicum annum L.*
2. Si la transformación genética de cultivos *in vitro* depende del tamaño de bala, la concentración del agente selectivo, así como de la distancia del disparo, entonces la selección adecuada de estos factores garantizará la transformación de *Capsicum annum L.*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. El desarrollo de la parte experimental se llevó a cabo en diferentes ensayos como se presentan a continuación en el diagrama de flujo (figura 10).

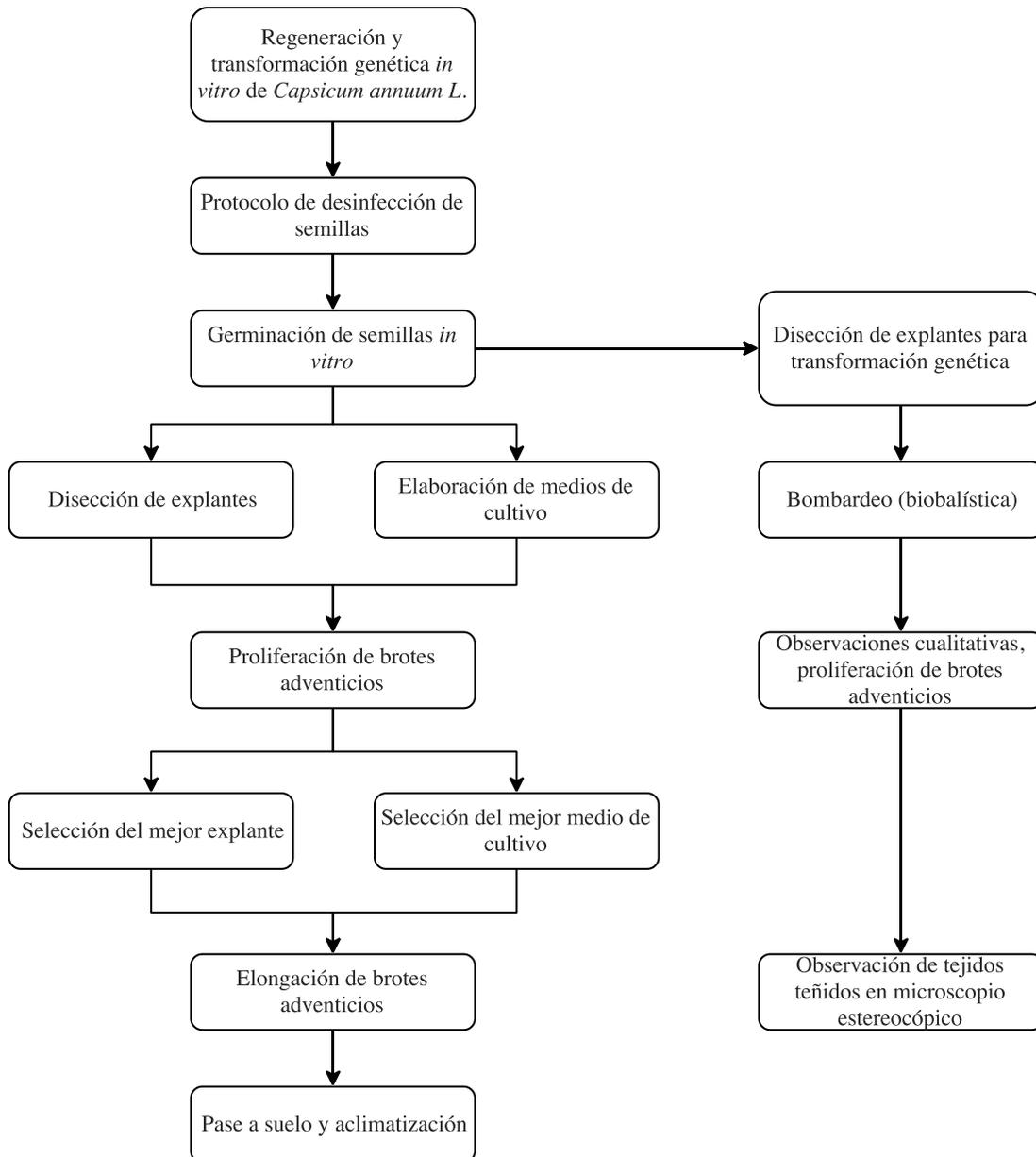


Figura 10. Diagrama de flujo con metodología para regeneración y transformación *in vitro* de *Capsicum annuum* L.

6.1 Material biológico

El material biológico utilizado fueron semillas de chile serrano (*Capsicum annuum*. Var. Tampiqueño 74), obtenidas en una comercializadora de semillas en la Ciudad de México.

6.2 Método de desinfección de semillas.

Las semillas fueron sometidas a cuatro métodos de desinfección para determinar y seleccionar aquel que redujera el tiempo de germinación y aumentara el porcentaje de germinación de las mismas. Los métodos se basaron en un protocolo de desinfección realizado previamente en el laboratorio por Zaragoza (2017) al cual se le realizaron algunas modificaciones que son mencionadas a continuación.

En tabla 6 se muestran los diferentes métodos de desinfección que se probaron durante el desarrollo del presente trabajo. Cabe mencionar que se utilizaron dos lotes de semillas como se presenta en la misma tabla. Se puede observar que en los dos métodos de desinfección se aplicaron EtOH al 70% como desinfectante y solubilizador de compuestos no deseados, NaClO al 30% como desinfectante, Tritón 100X como tenso activo, además en el segundo método las semillas se sometieron a un remojo en Ácido giberélico (AG3) para promover la germinación y Cefotaxime como antibiótico por 24 horas para eliminar cualquier patógeno antes de realizar la siembra de semillas. El proceso de desinfección se muestra en el siguiente diagrama de flujo mostrándose los pasos para lograr la desinfección de la semilla.

Tabla 6. Protocolo de desinfección *in vitro* de semillas de *Capsicum annuum* L.

Sustancias/Método de desinfección (1 l)	DC I		DCII	
Lote de semilla	1 y 2		1	
EtOH al 70%	X	1 min	X	1 min
NaClO al 30%	X	1 min	X	1 min
NaClO al 30% + Tritón 100x (0.5%)	X	15 min	X	15 min
AG3 + Cefotaxime® (250 mg/l)			X	24 h

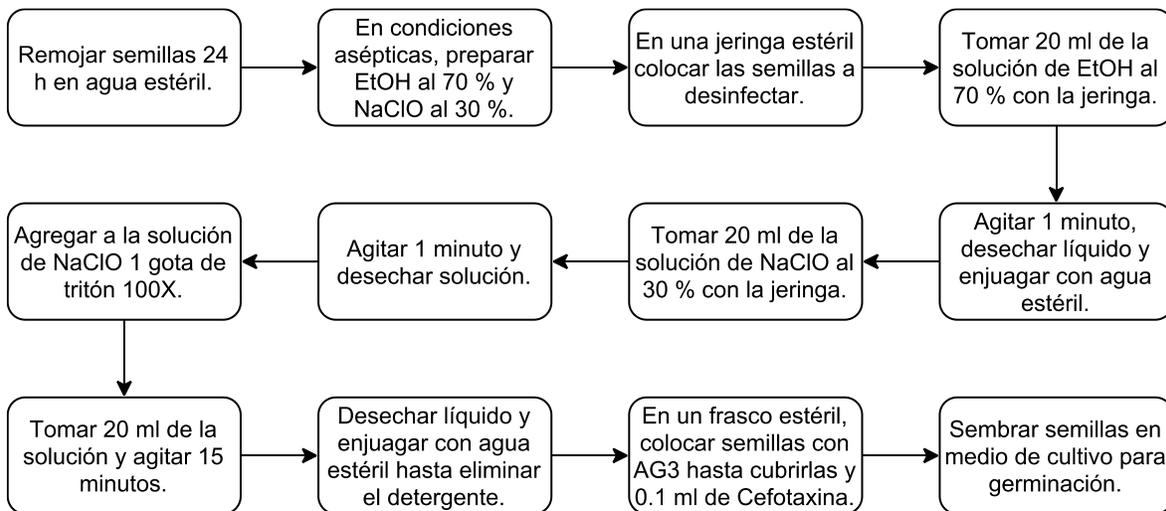


Figura 11. Protocolo de desinfección de semillas para *Capsicum annuum* L.

6.3 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas (100X) utilizando las sales inorgánicas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y suplementados con diferentes componentes orgánicos, así como reguladores de crecimiento (tabla 7), a todos los medios se les adicionó 3% de sacarosa y se ajustó

el pH a 5.7 con NaOH 1N o HCl 1N según fuera necesario. Todos los medios se esterilizaron en una autoclave vertical a 121°C y a una presión de 1.2 psi, durante 18 minutos. Cabe mencionar que la combinación y concentración de los reguladores de crecimiento fueron diferentes según cada ensayo como se muestra en la tabla 6. Algunos medios de cultivo se les adicionó antibiótico como Cefotaxime y PPM bajo condiciones asépticas; en campana de flujo laminar se agregaron los antibióticos cuando el medio alcanzó una temperatura de 40°C aproximadamente y, posteriormente se sirvieron los frascos esterilizados previamente.

Tabla 7. Composición por litro de los diferentes medios de cultivo para inducción de organogénesis.

Componente	Ensayo No. 1 (Organogénesis directa e indirecta)						Ensayo No. 2 (Organogénesis directa e indirecta)						Ensayo No. 3 (Organogénesis directa)
	COR 1A	COR 1B	COR 2A	COR 2B	COR 3 ^a	COR 3B	C1	COR 4	C2	COR 5	C3	COR 6	COR 7
Sales MS	100%												
Vit R2	100%												
Sacarosa	3%												
PVP	1 g												2g
AIA/ANA	1 mg												
Ac cítrico							150 mg						
Ac ascórbico							150 mg						
Glutamina	25 mg	25 mg			50 mg	50 mg	25 mg	25 mg			50 mg	50 mg	50 mg
Arginina	50 mg	50 mg			15 mg	15 mg	50 mg	50 mg			15 mg	15 mg	15 mg
Adenina	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	25 ml	25 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	25 ml	10 ml	25 ml
Caseína			200 mg	200 mg					100 mg	200 mg			
L-prolina			2.5 g	2.5 g					1.125 g	2.5 g			
Coctel 20			10 ml	10 ml					5 ml	10 ml			
BA	0.6 mg	1.2 mg	0.6 mg	1.2 mg	0.6 mg	1.2 mg	0 ml	1.8 mg	0 mg	1.8 mg	0 mg	1.8 mg	5.0 mg
Cisteína													100 mg
Carbón activado													1 g
Sulfato de cobre													8µg
Nitrato de plata													5 mg
Cefotaxime													250 mg
PPM													10 ml
pH	5.7												
Agargel	7 g												

6.4 Condiciones de incubación y subcultivo

Todos los cultivos fueron incubados en un cuarto con ambiente controlado a una temperatura de 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad. Cada tres semanas se subcultivaron los explantes a un medio de cultivo nuevo.

6.5 Germinación de semillas y establecimiento de los cultivos asépticos

Tras ser desinfectadas, las semillas se sembraron en frascos con 100 ml de un medio de cultivo como se presenta en la tabla 8 bajo condiciones asépticas. Las semillas se mantuvieron en un cuarto con ambiente controlado durante su germinación hasta la obtención de plántulas con el tamaño adecuado para el establecimiento de cultivos asépticos.

Tabla 8. Componentes de medio de cultivo para germinación de las semillas *in vitro*

Componente	Concentración /l
Sales MS	100 %
Sacarosa	3 %
Glicina	2 mg
AG3	2 mg
Vit R2	100%
pH	5.7
Gelzán	3.3g

6.6 Ensayo 1. Inducción de la organogénesis directa e indirecta

Con el objetivo de regenerar plantas de chile a partir de peciolo y láminas foliares como explantes, se probaron 6 medios de cultivo para inducir la formación de brotes adventicios de forma directa o a partir de callo. Para ello se variaron las concentraciones de BA, así mismos componentes orgánicos que pudieran inducir la des diferenciación y re diferenciación de brotes (tabla 7).

En cuanto a la obtención de los explantes, se disectaron peciolo de plantas de 15 días de germinadas *in vitro*. Las plantas presentaron de tres a cuatro nudos y con 6 a 8 hojas verdaderas por tallo (figura 12).



Figura 12. Plántulas con 15 días de germinación, con más de tres nudos y hojas verdaderas para disección.

En el primer ensayo se probaron seis diferentes medios de cultivo (Tabla 7) con tres repeticiones cada uno por tratamiento, en cada frasco se colocaron de 6 a 8 explantes los cuales se obtuvieron disectando segmentos de peciolo y lámina foliar de un tamaño aproximado de 1cm^2 con el haz y el envés tocando el medio de cultivo como se muestra en la figura 13. Este ensayo tuvo como objetivo seleccionar el medio con mayor respuesta (proliferación de brotes adventicios o formación de callo), se realizaron subcultivos cada 3 semanas. Los parámetros evaluados fueron oxidación del explante y contaminación.

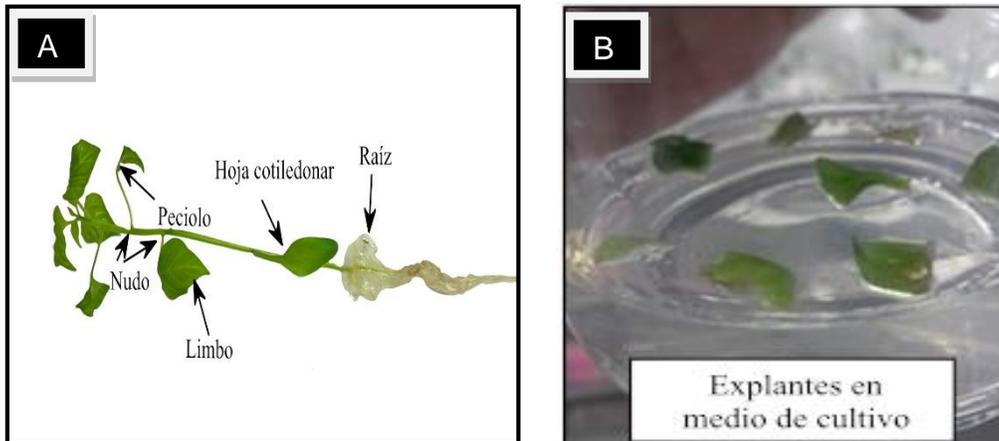


Figura 13. Explantes tomados de plantas de tres semanas de edad. A. Planta con raíz, hoja cotiledonaria, hojas verdaderas (pecíolo y láminas foliares) y nudo. B. Segmentos de hojas verdaderas con lámina foliar y pecíolo.

6.7 Ensayo 2. Inducción de la organogénesis directa e indirecta

Se realizó un segundo ensayo (Ver tabla 7) en el cual se elevaron las concentraciones de 6-bencilaminopurina (BA) en tres tratamientos y se establecieron tres tratamientos control con el fin de estimular de mayor manera la división celular y la promoción de brotes adventicios. En este ensayo se utilizaron como explantes los pecíolos con láminas foliares como en el ensayo 1 y, además se probaron nudos y segmentos de hojas cotiledonarias (figura 14) para evaluar si existía una respuesta organogénica mayor que en pecíolos.

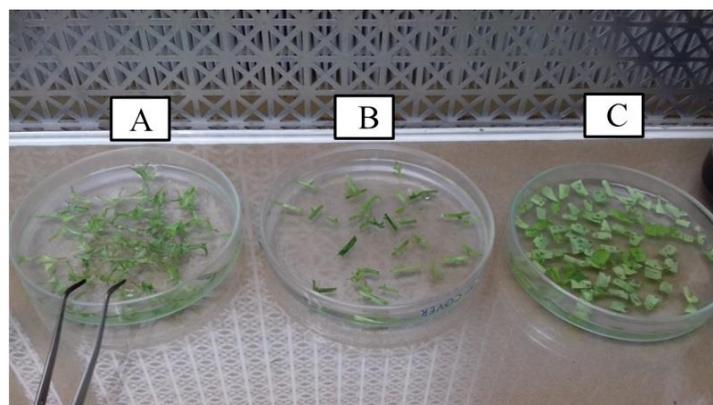


Figura 14. Explantes provenientes de plantas de 2 semanas de edad utilizados en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. A. Pecíolos. B. Nudos. C. Segmentos de hojas cotiledonarias.

6.8 Ensayo 3. Inducción de la organogénesis directa

Tras la selección del tratamiento y el explante que promovieron la formación de brotes adventicios en el ensayo 2, se probó un medio en el que se modificó la concentración de BA y, además se adicionaron algunos compuestos como nitrato de plata y sulfato cúprico y se modificaron los antioxidantes. Se eligió como explante nudos (figura 15), los cuales fueron subcultivados en repetidas ocasiones, eliminando el tejido oxidado.



Figura 15. Disección de nudos para el ensayo 2.

Cuando los nudos regeneraron al menos un brote adventicio fueron traspasados a un medio de alargamiento cuya formulación se muestra en la tabla 9 (COR7-EL) en el cual se disminuyó al 50 % la concentración de BA además se agregó ANA para la inducción de la formación de raíces.

En la figura 16 se muestran los brotes adventicios obtenidos que se sometieron al medio de alargamiento.

Tabla 9. Composición por litro de medio de cultivo COR7-EL para el alargamiento de brotes adventicios

Componente	Concentración por litro de solución
Sales MS	100%
Vit R2	100%
Sacarosa	3%
PVP	2 g
ANA	1 mg
Ac cítrico	150 mg
Ac ascórbico	150 mg
AG3	0.5 mg
BA	2.5 mg
Sulfato de cobre	4 µg
Nitrato de plata	5 mg
pH	5.7
Agargel	7 g



Figura 16. Elongación de brotes adventicios.

El ensayo tres se repitió para confirmar la reproducibilidad del protocolo de regeneración *in vitro* de *Capsicum annuum* L. var. Tampiqueño 74.

6.9 Enraizamiento de brotes adventicios y aclimatación de plantas regeneradas

Después de varios subcultivos, los brotes alargados se pasaron a un medio MS sin reguladores de crecimiento con la finalidad de estimular la formación de raíces, y cuando las plantas presentaron una altura de 10-15 cm fueron aclimatizados probándose dos tipos de tratamientos para mejorar su adaptación a suelo. A un grupo de plantas se les agregó una solución de hongos micorrízicos (Spectrum®, *Glomus sp*), la cual se preparó pesando 25 g del Spectrum® y disolviendo en un litro de agua desionizada estéril y se sumergieron las raíces en la solución de micorrizas durante un minuto, después se depositaron en las macetas conteniendo un sustrato comercial (Garden's®) el cual se humedeció con antelación. El otro grupo de plantas, no se inoculó en la solución de hongos micorrízicos, sino que las raíces se sumergieron en una solución de Benomil (4g. L⁻¹) y Agrimycin 500 (4g. L⁻¹) estériles y se depositaron en las macetas con el mismo tipo de sustrato que el tratamiento anterior. Todas las plantas se mantuvieron tapadas en un contenedor de plástico para mantener la humedad relativa alta. Cada semana se regaron con una solución de sales MS al 25% durante el primer mes, posteriormente se regaron sólo con agua y se abrieron los contenedores para permitir el intercambio gaseoso y disminuir la humedad relativa (ver figura 17). Se evaluó la sobrevivencia de plantas de cada tratamiento.

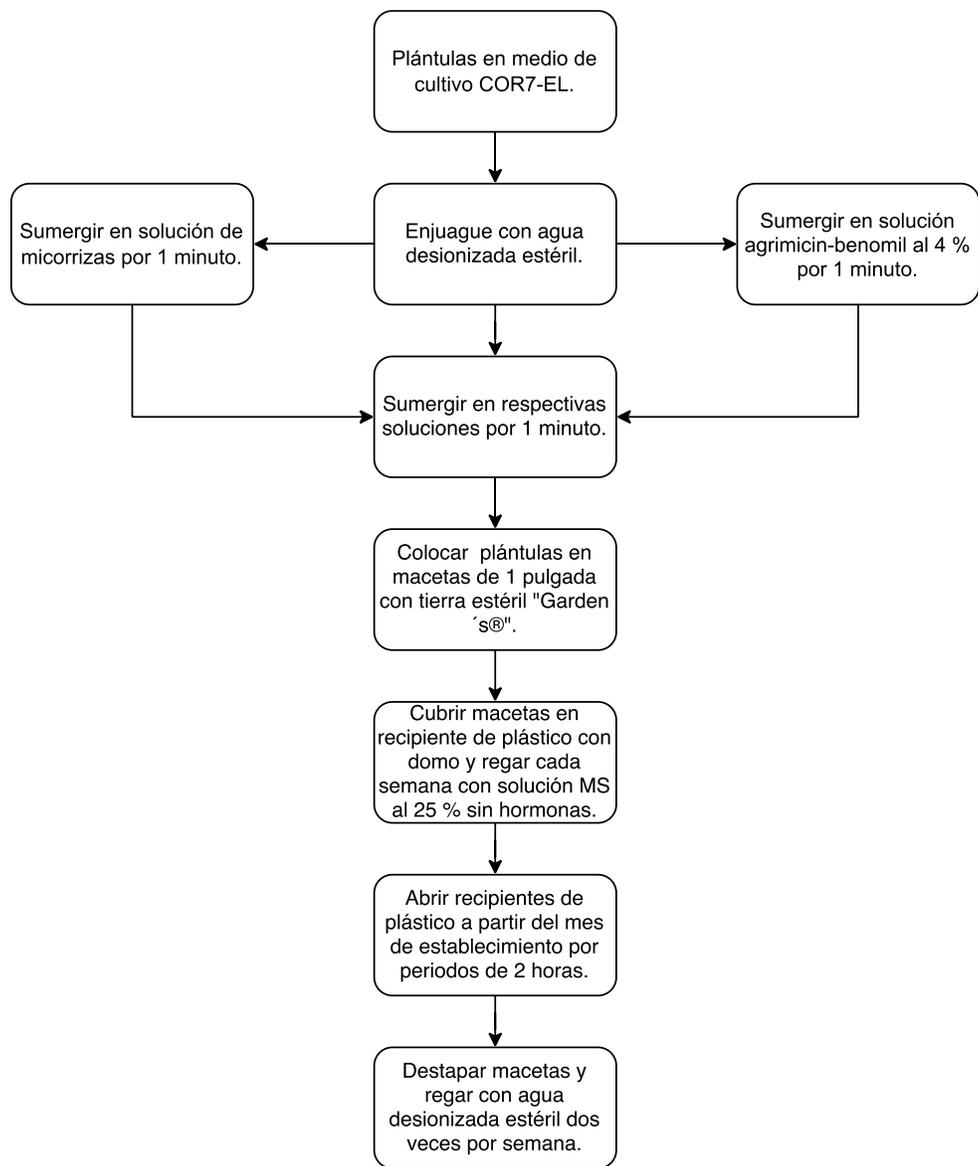


Figura 17. Diagrama de flujo para aclimatización de plántulas regeneradas.

6.10 Transformación genética de nudos

Ya diseñado el protocolo de regeneración *in vitro*, se probaron diferentes condiciones para establecer un protocolo de transformación genética de *C. annuum* mediante el método de biobalística. Los pasos seguidos se muestran en las figuras 18, 19 y 20. Cabe señalar que la concentración del agente selectivo Glufosinato de amonio (Basta®) que se utilizó, fue con base al protocolo desarrollado por Zaragoza, (2017); así mismo se contó con balas de tungsteno ya preparadas en el laboratorio

116 (CTV), en el anexo 2 se presenta la metodología utilizada en la preparación de las balas de tungsteno.

Para realizar la transformación fue necesario verificar la integridad del plásmido pEarly101-AtPPiasa4-GFP-GUS proporcionado por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres. Para ello se realizó un gel de agarosa al 1% siguiendo la metodología que se describe en la figura 18.

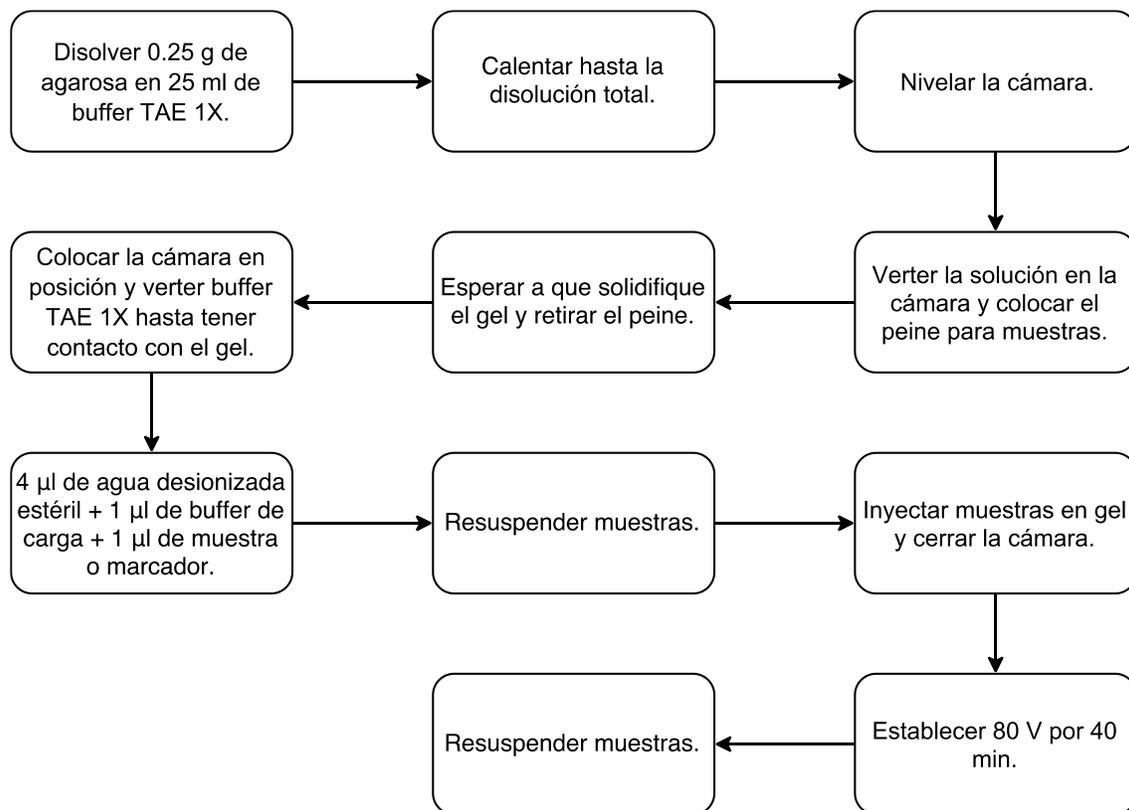


Figura 18. Metodología para verificación de integridad de plásmido.

Al confirmar la integridad del plásmido, se hizo una cuantificación de ADN en el equipo BIODROP® prestado por el laboratorio 114 del conjunto E de la Facultad de Química, en el cual se leyeron las concentraciones del plásmido en una longitud de onda ideal de 260 y 280 nm y una densidad óptica de 1.8.

Con el fin de ajustar las muestras para que posterior a un proceso de liofilización en un volumen de 100µl de agua desionizada estéril se tuviera una concentración de

$1\mu\text{g}\cdot 1\text{ml}^{-1}$, se realizaron los cálculos correspondientes y ajustes de volumen necesarios.

El material para transformar se preparó un día antes, se cortaron yemas axilares de plantas de un mes después de la germinación, y se depositaron en cajas Petri conteniendo el medio de cultivo de inducción con la diferencia que se agregó 0.5 g más que lo normal del gelificante (Figura 19).

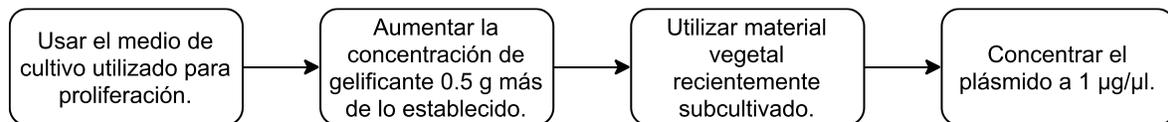


Figura 19. Preparación de material biológico.

El bombardeo se realizó siguiendo la metodología presente la figura 20 y los tratamientos de las condiciones de biobalística que se probaron se describen en la tabla 10. La preparación de balas se describe en el anexo 2.

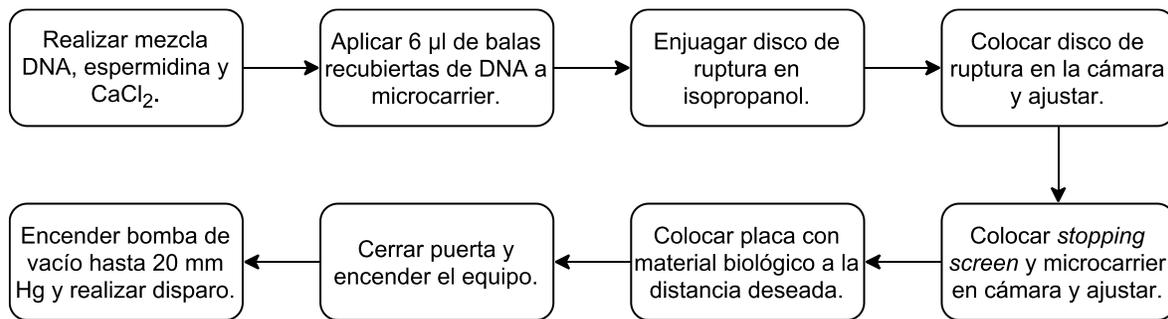


Figura 20. Bombardeo de material biológico.

Tabla 10. Condiciones de transformación genética para *Capsicum annuum*. L. vía Biobalística.

Condiciones	Tratamientos		
	1	2	3
Número de disparos	2 disparos		
Presión	1,100 psi		
Distancia microcarrier-explante	6 cm	9 cm	12 cm
Tamaño de bala	5M (0.4µm)		

Se realizaron observaciones cualitativas las primeras seis semanas, posteriores a la transformación genética los explantes se pasaron al medio de cultivo COR7 suplementado con 2 mg. L⁻¹ del agente selectivo Basta®. Finalmente se realizaron prueba de GUS en explantes sobrevivientes a la selección.

6.10.1 Ensayo de expresión transitoria GUS.

Para confirmar que la transformación genética fuera exitosa, se realizó una prueba de expresión transitoria. Esto fue posible ya que el plásmido insertado contiene el gen reportero GUS. Para realizar la prueba se prepararon soluciones descritas en el Anexo 2, el procedimiento se describe en la figura 21.

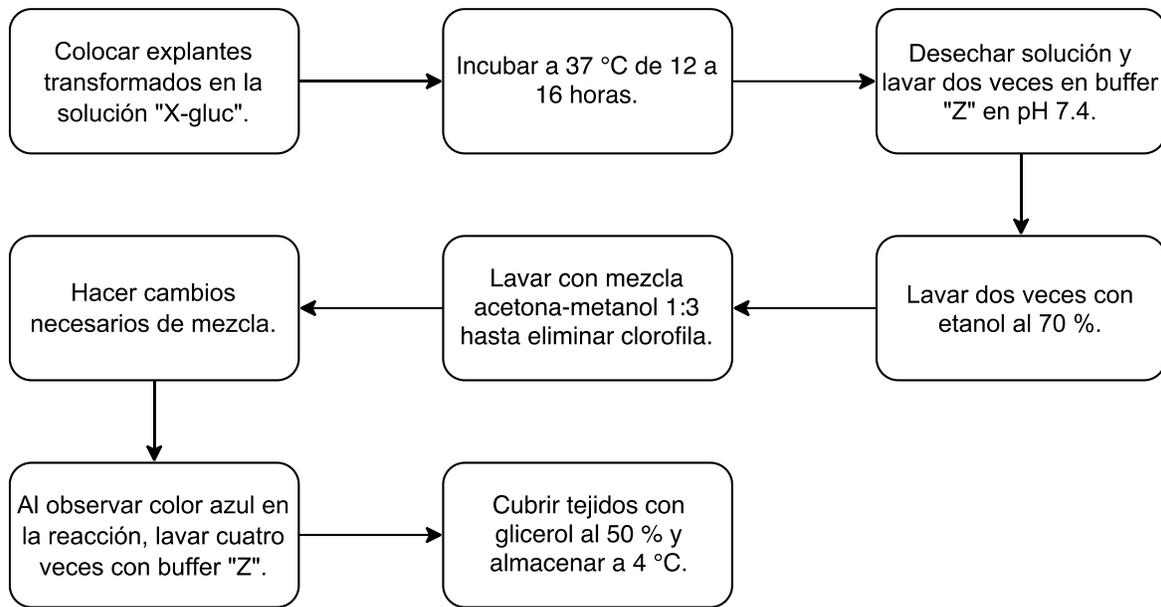


Figura 21. Determinación de la actividad de β -gluc por método histoquímico.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Germinación de semillas y obtención de plantas donadoras de explantes

El establecimiento de cultivos *in vitro* de cualquier especie requiere como paso inicial la eliminación de la elevada contaminación por microorganismos, principalmente bacterias y hongos que contienen las plantas y semillas bajo condiciones naturales. Para ello se debe evaluar diferentes métodos de desinfección probando distintos agentes desinfectantes, concentraciones y tiempo de exposición, así como la elección de la parte de la planta (explante) más adecuada que permitan la obtención de plantas regeneradas o masas celulares denominadas callos. Por ello, en el presente trabajo se planteó utilizar plantas *in vitro*, germinando semilla bajo condiciones asépticas.

Para obtener las plantas donadoras de explantes se probaron dos métodos de desinfección, realizándose 8 siembras utilizándose dos lotes de semillas de chile serrano. En la primera siembra una vez realizado el método de desinfección de semillas (DCI), éstas fueron colocadas en frascos con medio de cultivo para germinación y tras una semana de incubación se observó en el medio de cultivo la presencia de bacterias por lo que no se logró la germinación. Posteriormente se nuevamente se desinfectaron semillas, pero se modificó el método de desinfección al agregaron 250 mg. l⁻¹ de Cefotaxime al medio de cultivo y dejando en remojo las semillas en AG3 y Cefotaxime (DCII). Se realizaron en total 4 siembras con este sistema y con un mismo lote de semillas (lote 1). Los resultados obtenidos con este método de desinfección en la 2 y 3 siembra fueron un 100% de germinación *in vitro* y ninguna semilla contaminada (tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje de germinación de semillas para los tres establecimientos realizados.

Tratamiento	Lote de semilla	#Siembra	#Semillas	#Plántulas obtenidas	%Germinación	Tiempo de germinación (días)
DC I	1	1	120	120	(Contaminación total)	15
DC II	1	2	46	46	100	15
DC II	1	3	26	26	100	15
DC II	1	4	24	16	66.66	60
DC II	1	5	80	14	17.5	60
DC I	2	6	72	60	83.3	18
DCI	2	7	27	22	81.48	17
DC I	2	8	85	70	82.35	20

En la 4ª y 5ª siembra utilizando este método y el lote 1 de semillas, se observó una disminución progresiva del porcentaje de germinación, además aumentó el tiempo para obtener plantas con 4 a 6 hojas verdaderas. Con base a los resultados obtenidos, se tomó la decisión de cambiar de lote de semilla y adquirir semillas recién cosechadas. Por ello se volvió a probar el método de desinfección DCI y las tres últimas siembras de semillas con el lote 2 se observó un porcentaje mayor de germinación y en menor tiempo.

En condiciones normales, el género *Capsicum* es una especie susceptible al ataque de microorganismos en especial de hongos del género *Phytophthora capsici*, *Fusarium* y *Rhizoctonia*, y virus del mosaico de tabaco, pepino y papa (Kothari *et al.*, 2010). Aunque en condiciones *in vitro* estos microorganismos no representan un riesgo para la especie, hongos filamentosos y bacterias suelen presentarse causando daños en explantes y frenan el desarrollo causando daños irreversibles (Ramos, 2006). Además, las semillas de *Capsicum* pueden contener microorganismos patógenos de manera externa o interna haciendo más complicado el manejo y reduciendo la producción de plantas, por ello, en ocasiones es necesario utilizar antibióticos que aminoren estos efectos (INIFAP, 2013).

En el tratamiento DC I (ver tabla 6) no se utilizó antibiótico y a pesar de utilizar el método de desinfección establecido por Zaragoza, (2017) se presentó una bacteria blanca en todos los frascos por lo que tuvo que ser desechada toda la siembra 1 (ver tabla 11). Se procedió a utilizar un antibiótico en el medio de cultivo para asegurar que si la bacteria se encontraba presente en las semillas (tratamiento DC II), no volviera a impedir la germinación y evitar que utilizara los nutrientes del medio de cultivo para reproducirse; por ello, se añadieron 250 mg.l⁻¹ de Cefotaxime®, la cual inhibe la síntesis y reparación de pared bacteriana, actuando sobre bacterias Gram positivas y negativas especialmente sobre Enterobacterias, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

En las siembras 2 y 3 no hubo inconvenientes para la germinación hasta que en la siembra número 4 el porcentaje de germinación disminuyó drásticamente y las plántulas no se desarrollaron de manera correcta haciendo imposible su uso para los ensayos. Uno de los principales problemas durante la cosecha de las semillas de *Capsicum*, es que la selección de las mismas se realiza de manera inadecuada y son seleccionadas sin la sanidad adecuada ocasionando la propagación de enfermedad y la baja calidad reflejada en características agronómicas indeseables y ya que el secado de las semillas no suele realizarse de manera correcta, muchas impurezas y semillas dañadas son mezcladas con semillas sanas disminuyendo la viabilidad (INIFAP; 2013). La humedad presente en las semillas (8-10%) es un factor muy importante para la conservación de la viabilidad, el almacenamiento en lugares secos y con bajas temperaturas es importante para la prolongación de la viabilidad, esto, pudo ser un factor por el cual las semillas perdieran viabilidad. Ya que las semillas utilizadas en los ensayos del 1 al 4 tenían más de dos años en almacenamiento y se estima que el tiempo de vida de una semilla de chile es de 2 a 4 años, por ello se decidió reemplazar el lote de semillas y eliminar el uso de antibiótico en el medio de cultivo y a partir de la siembra 6, el porcentaje de germinación estuvo por encima del 80% como lo indica la etiqueta del lote de dichas semillas y se determinó el tratamiento DCI como el indicado para la germinación de semillas *in vitro* (Sandoval , 2011).

En cuanto a los otros componentes del método de desinfección, fueron eficientes y los tiempos utilizados fueron los adecuados para el proceso de germinación. El etanol al 70% tiene la función de disolver la capa epicuticular de las semillas, además tiene un efecto antiséptico al hacer permeables las membranas de microorganismos mediante la disolución de lípidos (Ramos, 2006). El hipoclorito de sodio (NaClO) cumplió con su función desinfectante mediante la desnaturalización de proteína e inactivación de reacciones enzimáticas de ácidos nucleicos en células bacterianas (Negrón, 2009).

Con la utilización del regulador de crecimiento AG₃ durante el remojo de 24 horas, se buscó que todas las semillas germinaran al mismo tiempo para tener las plantas donadoras del mismo tamaño y con el mismo número de nudos y hojas. En las siembras 2 y 3 si se logró que todas las semillas germinaran y casi al mismo tiempo, lográndose el 100 % de germinación, pero las siembras 4 y 5 ni con AG₃ se logró tener éxito en la germinación, en las siguientes siembras (6, 7 y 8) las semillas ya no se pusieron en remojo con AG₃ ni antibiótico, lográndose una buena germinación con más del 80% de las semillas que germinaron y se obtuvieron plantas bien desarrolladas. Estos resultados demuestran que las giberelinas no son indispensable en la germinación de semillas de chile serrano bajo condiciones *in vitro*. En algunos estudios se ha demostrado que la aplicación de Giberelinas a razón de 500 pm promovió la germinación de diferentes poblaciones del género *Capsicum*, sin embargo, la combinación de este regulador de crecimiento con otros factores como oscuridad, tamaño de semilla, así como maduración del fruto pueden ser factores determinantes en la germinación. Así mismo las semillas de chile serrano puede contener en la testa algunas sustancias inhibitorias de la germinación, pero son solubles en agua y el remojo de 24 horas elimina estos inhibidores como lo menciona Hernández *et al.*, 2001.

Tras dos semanas de la aparición de las plántulas, se realizó un conteo de hojas verdaderas y cuando tuvieron de 4 a 6 hojas verdaderas las plantas fueron utilizadas para disectar los diferentes explantes que se utilizarían en cada ensayo.

7.2 Ensayo 1. Inducción de la organogénesis directa e indirecta

En el primer ensayo, las concentraciones de reguladores de crecimiento fueron propuestas con base en artículos que reportan regeneración vía organogénesis directa y embriogénesis somática en *Capsicum sp* (Roca y Mroginski, 1991; Dabauza, 2001; Sanatombi y Sharma, 2008; Kothari *et al.*, 2010; Orlinska, 2015) mientras que la concentración de aminoácidos y vitaminas fueron seleccionados por resultados de experimentos previos realizados en el laboratorio (tabla 7).

Para asegurar que las hojas al ser disectadas no se deshidrataran o contaminaran durante su manipulación y siembra en los frascos de alimento infantil, fueron sumergidos en aguades ionizada estéril con 125 mg.100 ml de Cefotaxime®.

Para lograr la inducción de la organogénesis, (tabla 7) se establecieron 6 tratamientos en los cuales se varió la concentración de dos aminoácidos, L-arginina y glutamina junto con la concentración de 6-bencilaminopurina (BA) y ácido indolacético (AIA) como reguladores de crecimiento.

En cuanto a la respuesta de los explantes en los distintos medios de cultivo, se observa en la tabla 12 que del total de explantes sembrados hubo una pérdida por contaminación en los 6 medios de cultivo, y por oxidación especialmente en los medios COR2 A y COR2 B, en los medios COR1A y COR1B también se presentó oxidación, pero en menor porcentaje. Cabe señalar que en todos los casos sobrevivieron más del 50% de los explantes sembrados inicialmente. Así mismo se lograron observar puntos de regeneración, en aquellos explantes cultivados en el medio COR1A de los cuales sólo un explante de peciolo logró una diferenciación celular completa dando lugar a un brote adventicio (figura 22). Los puntos de regeneración son un precedente a la formación de brotes adventicios, es decir que la composición del medio de cultivo seleccionado para los tratamientos tiene la capacidad de modular la organogénesis, dichos puntos aparecieron en la semana 6.

Tabla 12. Evaluación de la respuesta de explantes de chile serrano cultivados en 6 medios de cultivo diferentes durante 9 semanas.

Tratamiento	Número de explantes iniciales	Número de explantes en semana 9	Porcentaje de explantes sobrevivientes	Número de Explantes contaminados	Número de explantes oxidados	Número de puntos regenerativos	Número de explantes con callo
Ensayo 1							
COR1A	81	54	66.67	27	3	1	81
COR1B	80	57	71.25	23	13	0	80
COR2A	99	91	9.8	8	90	0	0
COR2B	108	80	8.8	28	71	0	0
COR3A	78	57	73.08	21	0	0	78
COR3B	64	48	75	16	0	0	64

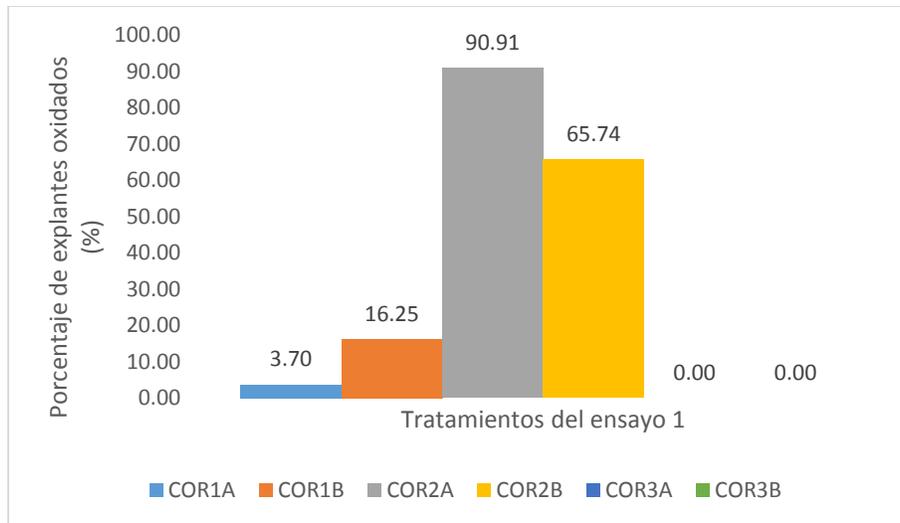
Cabe mencionar que todos los puntos de regeneración se presentaron en los explantes de peciolo con el haz tocando el medio de cultivo aunado a que también presentaron callo (Santana 2005).



Figura 22. Formación de puntos de regeneración y brote adventicio proveniente del ensayo 1, A. Puntos regenerativos del tratamiento COR1A. B. Brote adventicio obtenido en el medio COR1A.

Otro de los aspectos evaluados fue la presencia de callo en cada explante y como puede observarse en la tabla 12 a excepción de aquellos tratamientos en los que se utilizó el Coctel 20, todos presentaron callos en diferentes cantidades. Los explantes con cantidades mayores de callos se presentaron en los tratamientos con las concentraciones más elevadas de BA, ya que favorece la división celular y estimula la formación de células des diferenciadas conocidas como callo (Kothari *et al.*, 2010; Santana 2005).

La oxidación del tejido fue un problema que se presentó en la mayoría de los tratamientos, haciéndose mayor conforme pasaban las semanas de incubación. Este fenómeno inhibió el crecimiento y desarrollo de los callos, en los tratamientos que no desarrollaron callo, los explantes se oxidaron por completo, como se puede observar en la gráfica1.



Gráfica 1. Porcentajes de oxidación en explantes cultivados en 6 diferentes medios de cultivo

Es importante resaltar que en los medios con coctel 20, la oxidación fue más severa, impidiendo la producción de callo y la diferenciación de brotes presentados en la figura 23.



Figura 23. Presencia de oxidación de explantes provenientes de medios de cultivo con Coctel 20 a partir del segundo subcultivo (4 semanas).

El Coctel 20 es una mezcla de amino ácidos y compuestos orgánicos que se utiliza como fuente de nitrógeno reducido para promover la embriogénesis somática cuya composición no puede ser detallada en este trabajo ya que se encuentra en proceso de patente.

El nitrógeno en los suelos se puede encontrar de manera natural de diferentes maneras, como el ion amonio (NH_4^+), óxido nítrico (NO), nitratos (NO_3^-), óxido nitroso (N_2O), nitritos (NO_2^-), o como nitrógeno elemental (N_2). La presencia de nitrógeno suele tener un efecto benéfico en muchos cultivos como en maíz, trigo y cebada en los cuales aumenta el crecimiento y rendimiento en determinadas fases de crecimiento, en especial cuando se hacen mezclas de nitratos y amonio, además se ha reportado que existe un incremento de proteínas en carbohidratos cuando las plantas son fertilizadas con amonio (Kass, 1998). Sin embargo existe una concentración limitante de nitrógeno en plantas, por ejemplo, los elevados niveles de amonio (NH_4^+) restringen la absorción de otros elementos como el potasio, mientras que la alta presencia de nitratos disminuye la absorción de potasio (K), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) provocando una deficiencia en el desarrollo del sistema radical, deformaciones en hojas, clorosis, disminución de crecimiento, aparición de manchas café y envejecimiento prematuro que son síntomas observados en la figura 24, motivo por el cual fue descartado el uso de Coctel 20 para este experimento (Howeler, 1987). Los aminoácidos probados en este ensayo fueron L-arginina y glutamina, ambos aminoácidos tienen como función amortiguar los efectos indeseables en las plantas debido al estrés al cual se les somete, tales como la inhibición de síntesis de clorofila, y al agregar ambos aminoácidos generan un efecto rejuvenecedor en las plantas (Sadhana 1989; Mohamed 2011). En cuanto a los reguladores de crecimiento probados, el BA pertenece al grupo conocido como citocininas, este regulador es un derivado de la adenina que promueve la división celular acelerando la entrada de células a mitosis, la maduración de cloroplastos, además actúa sobre la diferenciación celular, así como en sinergia con las auxinas estimulan la proliferación celular dando lugar a masas celulares llamadas callos (Azofeifa, 2009; Pazmiño, 2009). El AIA pertenece a las auxinas, es una hormona natural cuyas funciones son permitir la expansión celular y con ello dar más flexibilidad a las paredes celulares, así mismo junto con la citocininas promueve la división celular y estimula la diferenciación de raíces en cultivo *in vitro*. Además, la combinación de auxinas con citocininas ha demostrado tener un efecto sinérgico para la proliferación de brotes adventicios estimulando la formación de tallos cuando

ambas se encuentran en cantidades relativamente elevadas (Mohamed 2011, Ramos, 2004).

Aun cuando se logró diferenciar un brote adventicio en el medio COR 1A, éste murió semanas posteriores. Por esta razón se realizó una repetición bajo las mismas condiciones, es decir usando peciolo con el haz tocando el medio de cultivo. El seguimiento de la repetición del tratamiento COR1A se muestran en la Tabla 13 donde se expone la relación de explantes con puntos de regeneración en la semana número dos a partir de la siembra del explante, sin embargo no hubo respuesta organogénica, sólo aparición de callo que fue mantenido por seis meses durante los cuales se perdieron los puntos de regeneración, igual a los que se muestran en la figura 24 donde los peciolo generaron callo pero finalmente se oxidaron hasta detener el crecimiento.

Tabla 13. Repetición de tratamiento COR1A. Relación Explantes y porcentaje de oxidación peciolo.

Tratamiento	No. de Explantes iniciales	No. Explantes en semana 2	Porcentaje de oxidación	No. de puntos de regeneración
COR1A	126	126	0	0

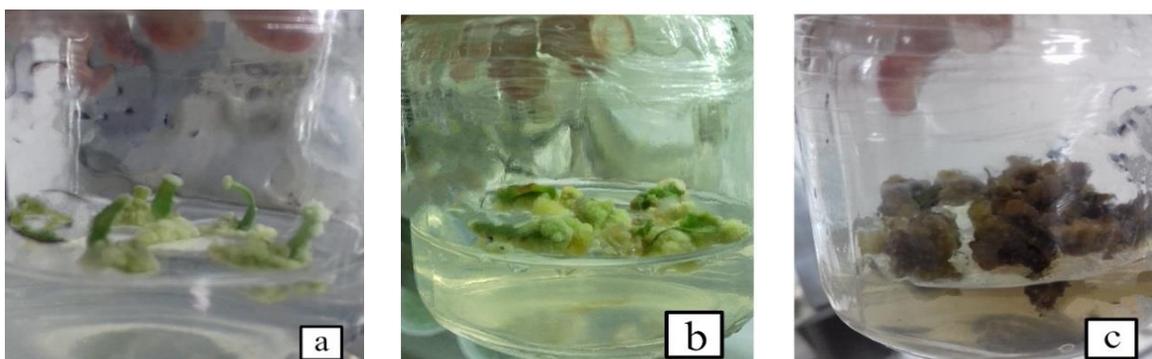


Figura 24. Repetición COR1A. a) y b) Formación de callo (7 días), c) oxidación y pérdida de puntos de regeneración (3 meses).

7.3 Ensayo 2. Inducción de la organogénesis directa e indirecta

Al no obtener una respuesta organogénica reproducible se realizaron cambios en el medio de cultivo (ver tabla 7) y se realizó el ensayo 2 en el cual se probaron tres tratamientos semejantes a los probados en el ensayo 1, modificando la concentración de BA aumentando hasta 1.8 mg .l⁻¹ y se establecieron tres grupos control designados como C1, C2 y C3 en los cuales se eliminó el uso de BA pero se mantuvieron constantes las concentraciones de los demás componentes del medio de cultivo representando a los tratamientos probados. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la tabla 14 donde se observa un comportamiento similar de los explantes a los presentados en el ensayo 1. Los mayores porcentajes de oxidación se dieron en los tratamientos cuyos medios de cultivo presentaron Coctel 20 mientras que en los demás tratamientos se desarrolló callo con puntos de regeneración principalmente en los tratamientos COR 4 y COR 6 que fueron aquellos con mayor concentración de BA, en los grupos control existió desarrollo de callo en el tratamiento con Coctel 20 pero al transcurrir seis semanas de subcultivos tanto los puntos de regeneración como callo sufrieron oxidación hasta llegar a la necrosis de los brotes y pérdida total de los puntos de regeneración (ver figura 26).

Tabla 14. Evaluación de la respuesta de explantes de chile serrano cultivados en 6 medios de cultivo diferentes durante 9 semanas.

Tratamiento	Número de explantes iniciales	Número de explantes en semana 9	Porcentaje de explantes sobrevivientes	Número de Explantes contaminados	Número de explantes oxidados	Número de puntos regenerativos	Número de explantes con callo
Ensayo 2							
C1	78	78	100	5	16	0	78
C2	70	55	78.57	25	27	2	70
C3	71	58	81.69	18	0	0	71
COR4	84	84	100	5	30	6	84
COR5	81	56	69.14	10	56	0	0
COR6	85	80	100	5	10	3	85



Figura 25. Formación de brotes adventicios en tratamiento COR6 (15 días).

Como se observa en la figura 26 la oxidación en cultivos *in vitro* genera oscurecimiento y puede llegar a necrosis de las células vegetales como consecuencia de una serie de factores principalmente resultado de los productos generados por reacciones de radicales libres en las cuales se generan especies reactivas que desencadenan la formación de compuestos principalmente dañinos para los tejidos. Los radicales libres son producto del metabolismo de oxígeno en distintas vías y se conocen como especies reactivas de oxígeno (ROS) mientras que las especies reactivas de oxígeno en presencia de nitrógeno forman otro tipo de compuestos igual de dañinas conocidas como especies reactivas de nitrógeno (RNS). Como consecuencia de ambas especies las células entran a un estado de estrés conocido como estrés oxidativo o nitrosativo dependiendo de las especies reactivas involucradas. (Azofeifa, 2009).

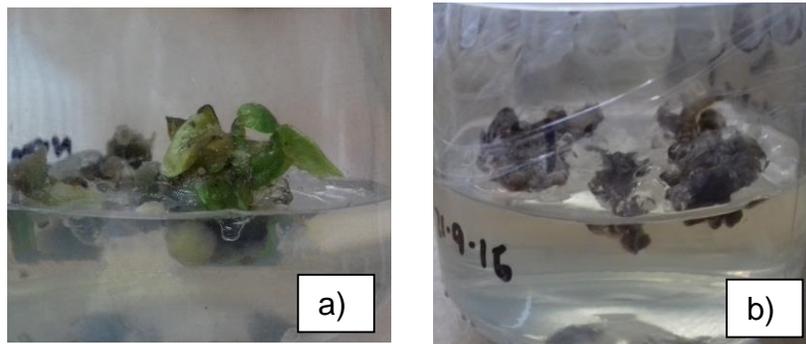


Figura 26. Oscurecimiento de explantes y medio de cultivo de ensayo 2. a) COR6 (30 días), b) COR5 (15 días).

En cultivos *in vitro* al ser sometidas las plantas y explantes a estrés con el fin de generar una respuesta fisiológica deseada en la mayoría de los casos se favorece el aumento de la concentración de compuestos no deseados generando estrés oxidativo, en el cual son afectados los sistemas de reparación, condiciones oxidantes y defensa de las células provocando daños en macromoléculas incluyendo alteraciones estructurales o incluso la muerte.

Como parte del metabolismo y ciclo de vida de las plantas las especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) se forman naturalmente en cantidades relativamente bajas. En el caso de los ROS, son especies conformadas por moléculas que pueden ser radicales libres o no. Los primeros son especies químicas capaces de existir independientemente conteniendo uno o más electrones desapareados provenientes de rupturas homolíticas o por la ganancia o pérdida de un electrón proveniente de una especie no radical tales como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}), peróxilo (RO_2^{\cdot}), entre otros. Mientras que las ROS no radicales como el oxígeno singulete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y ozono (O_3) provienen de la reducción molecular del oxígeno y tienen una reactividad alta. Las RNS también pueden o no ser radicales libres como el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y dióxido de nitrógeno (NO_2) y no radicales como el catión nitronio (NO_2^+). Como parte de un equilibrio las células son capaces de regular la formación de estos compuestos y reparar los daños que puedan causar en las macromoléculas principales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

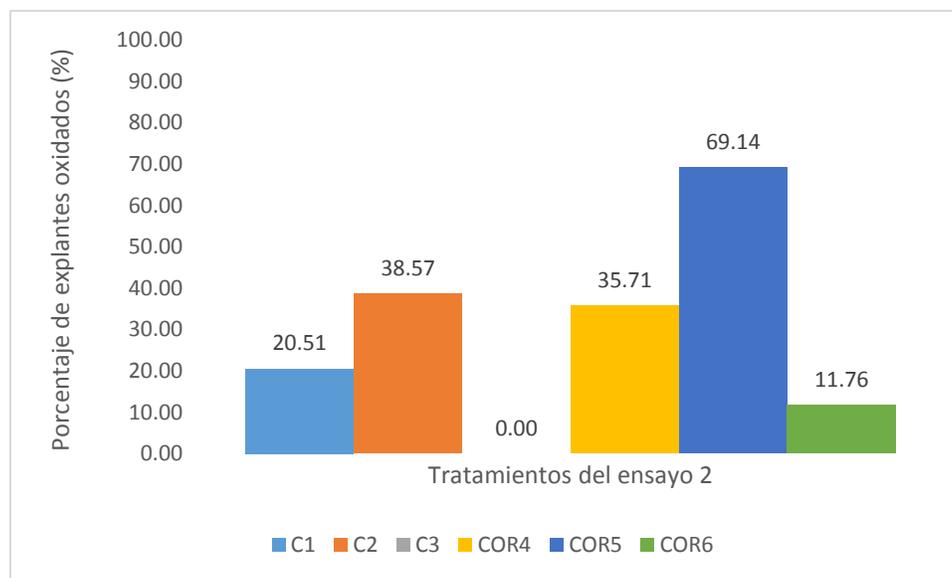
Al aumentar la concentración de estos ROS y RNS, se activan enzimas oxidasas como las polifenol oxidasas (PPO), fenolasas, tirosinasas y peroxidasas (POX). Estas enzimas en el ciclo natural de las plantas están presentes en las etapas finales cuando comienza la senescencia o cuando hay una lesión, por ello es que la presencia de estos compuestos se relaciona con el oscurecimiento característico causado por la oxidación. Al alterar las condiciones normales de crecimiento de las plantas como los ciclos de luz, si no son regulados a las necesidades de las plantas generan cambios ya que los excesos de energía son captados por especies deficientes de electrones generando oxidación (Azofeifa, 2009).

Sin embargo, existen muchos otros factores que favorecen la aparición de oxidación reportados en la literatura tales como las especies de oxígeno reactivo (ROS) las cuales son productos de la reducción del oxígeno atmosférico para la formación de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), entre otras especies resultado de las reacciones de radicales libres, también como resultado del metabolismo vegetal al igual que las especies producto de la reacción del oxígeno con óxido nítrico presente en las plantas se forman los compuestos conocidos como especies reactivas de nitrógeno (RNS). Estos compuestos se generan en organelos como lisosomas, cloroplastos y mitocondrias (Azofeifa, 2009, Kothari *et al.*, 2010, Pazmiño 2009). Bajo condiciones normales, las plantas generan ROS y RNS a bajos niveles y el estrés que ocasionan en las plantas se conoce como estrés oxidativo y nitrosativo respectivamente. Como fue mencionado, la aparición de estos compuestos se debe una respuesta en el metabolismo de las plantas inducido o como un proceso natural (Azofeifa, 2009). En este experimento los explantes al ser cortados y puestos en un microambiente provocan que las ROS y RNS se produzcan con mayor facilidad pese a los componentes agregados en el medio de cultivo para disminuir los efectos adversos como la adición de aminoácidos y vitaminas antioxidantes junto con reguladores de crecimiento mencionados anteriormente.

Como consecuencia de las reacciones en cadena de radicales libres algunas enzimas que aparecen en el proceso como las polifenol oxidasas (PPO's),

fenolasas, tirolidasas y peroxidadas se acumulan en los tejidos generando oxidación y la aparición de la coloración oscura en tejidos. Para evitar estos efectos, en la literatura se sugiere realizar subcultivos continuos, así mismo la eliminación de los tejidos oxidados de los explantes, también el uso de antioxidantes y adsorbentes (Pazmiño 2009; Kothari *et al.*, 2010). En este trabajo se decidió realizar los subcultivos cada tres semanas y se traspasaron los explantes a frascos más pequeños para disminuir la disponibilidad de oxígeno, además se adicionó a todas las formulaciones 250 mg. l⁻¹ de ácido cítrico y ascórbico respectivamente para intentar modular la oxidación en los explantes, 1g de carbón activado y 2 gramos de Polivinilpirrolidona (PVP) (tabla 7).

A pesar de realizar estos cambios para atenuar la oxidación de explante y como se observa en la gráfica 2, los porcentajes de oxidación fueron elevados en la mayoría de los tratamientos siendo mayor en los medios con Coctel 20, el cual evidentemente no es un buen estímulo para los explantes por lo cual, fue eliminado como posible tratamiento para inducción de organogénesis.



Gráfica 2. Porcentajes de oxidación por tratamiento en explantes de distintas partes de hoja en ensayo 2.

Otro componente que se decidió modificar fue AIA por ANA ya que comenzaron a emerger raíces indeseables en esta etapa del experimento (Figura 27), la formación de raíces se da por el exceso de auxinas en la formulación del medio de cultivo, por lo que se tomó la decisión de eliminarlas en la formulación y elevar la concentración de citocininas en el ensayo número 3 (Mohamed, 2011).



Figura 27. Raíces provenientes de explante en tratamientos COR 3A Y COR1A.

Se estableció con las mismas plantas del ensayo 2, bajo los mismos tratamientos utilizados (Tabla 7) entrenudos y nudos como explantes para observar la respuesta siendo que este posee zonas de diferenciación celular (formación de ramas y hojas) que podrían favorecer la regeneración vía organogénesis. Sin embargo, todo el lote tuvo que ser desechado tras no poder modularse la presencia de oxidación, la cual fue más agresiva que en los experimentos realizados con hoja.

Como se observa en la figura 28, los entrenudos sembrados en los medios de cultivo provenientes del ensayo 2 (tabla 7 y 12) se oxidaron y perdieron la viabilidad.



Figura 28. Medios de cultivo con nudos, oxidación de explantes (15 días).

Con base en los resultados, se decidió realizar el ensayo 2.1 que se muestra en la tabla 15 en el cual se utilizaron los tratamientos COR 4 y COR 6 que fueron en los que se presentaron puntos de regeneración previamente.

Tabla 15. Inducción de organogénesis con nudos utilizando dos diferentes tratamientos, COR4, COR6.

Tratamiento	Número de Explantes iniciales	Número de Explantes contaminados	Número de explantes oxidados	Número de puntos de regeneración	Número de explantes con callo
Ensayo 2.1					
COR4- Nudo	100	26	74	4 (semana 3)	0
COR4- Peciolo	100	15	85	5 (semana 4)	0
COR6- Nudo	84	0	84	6 (semana 3)	0
COR6- Peciolo	84	0	84	0	0

En este ensayo, se utilizaron los tratamientos en los que hubo mayor éxito, sin embargo, ninguno de los puntos de regeneración que se formaron se lograron desarrollar para dar paso a brotes adventicios. En el tratamiento de nudos con COR6 (ver tabla 7), se generaron brotes pequeños que finalmente se oxidaron como se muestra en la figura 28.

7.4 Ensayo 3. Inducción de la organogénesis directa

El ensayo 3 se diseñó a partir de los resultados obtenidos en los dos ensayos anteriores. Como se observó en los ensayos 1 y 2, existen muchos factores que intervienen en la oxidación de explantes y existen muchos reportes en los cuales se expone la recalcitrancia del cultivo, es decir, que *Capsicum* no suele responder a estímulos en CTV de manera constante (Kothari *et al.*, 2010), también interviene el estrés que sufren los explantes durante la disección y posiblemente a las mismas

razones que se han mencionado con anterioridad que son la formación de ROS y RNS en exceso (Azofeifa 2009).

Al no lograr la regeneración en este ensayo, se realizaron algunos ajustes al tratamiento COR6 en cuanto a los componentes de los medios de cultivo tales como elevación de la concentración de antioxidantes, adición de otros compuestos como carbón activado para controlar la oxidación; CuSO_4 y AgNO_3 , para retrasar la senescencia, además se utilizó una mezcla de antibióticos PPM y Cefotaxime® para inhibir el desarrollo de patógenos.

Los explantes utilizados fueron los mismos explantes que en los ensayos anteriores y se adicionó como explantes hojas cotiledonarias y cotiledones para observar el comportamiento bajo una nueva formulación de medio de cultivo denominado COR 7 en el cual se aumentó la concentración de BA a 5 mg. De esta manera se procedió a desinfectar y germinar semillas bajo las condiciones anteriormente establecidas. Los resultados se muestran en la tabla 15.

En este ensayo, se tomaron explantes de plantas con diferente edad que, en los ensayos anteriores, ya que tan sólo tenían dos semanas de germinación. En la primera semana de incubación se observó que los explantes perdieron totalmente la clorofila (figura 29).

Al observar esta respuesta, dos semanas después se sembraron otros nudos de plantas con 4 semanas de edad. Los explantes disectados, al contrario de los explantes anteriores (plantas de dos semanas de edad), presentaron una respuesta favorable al nuevo tratamiento.

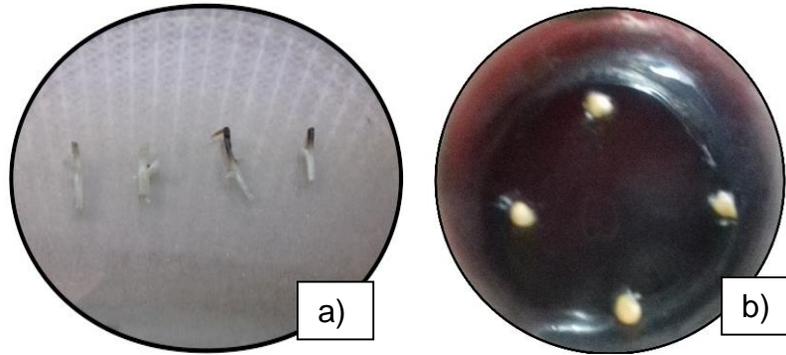


Figura 29. Explantes provenientes de plantas germinadas con dos semanas y cotiledones. A. Nudos con pérdida total de clorofila. B. Cotiledones de semilla.

De esta manera, utilizando explantes provenientes de plantas de 4 semanas de edad posteriores a la germinación, se sembraron dos lotes al mismo medio COR 7. Cabe señalar que se hizo una siembra sólo de nudos para verificar el desarrollo de éstos en medio sin reguladores de crecimiento como un control. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 16.

Tabla 16. Respuesta obtenida de diferentes explantes de plantas de 4 semanas de edad cultivados en el medio COR7.

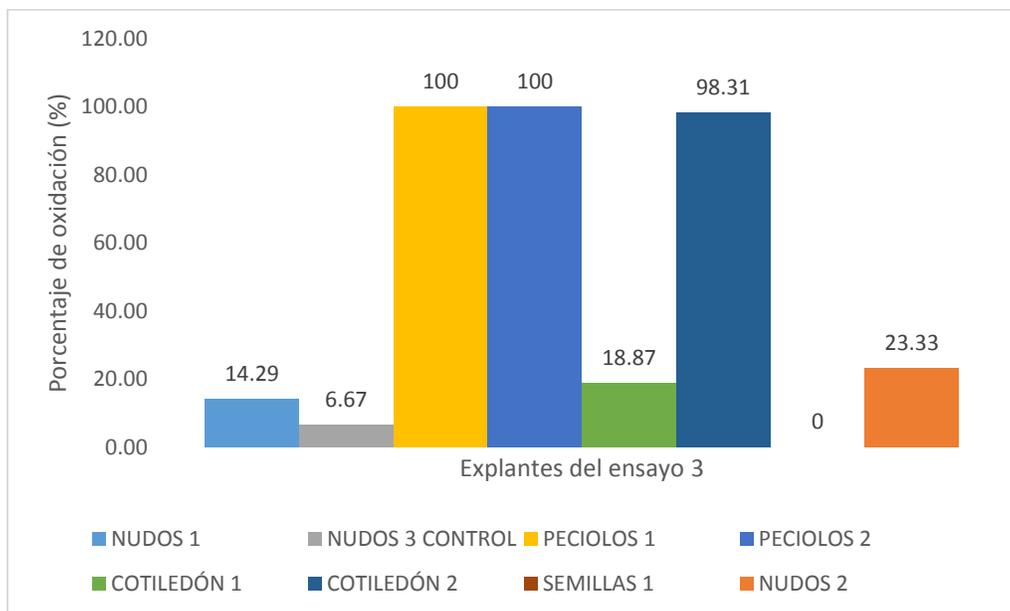
Explante	Lotes COR 7	Explantes iniciales	Explantes desechados por oxidación	Porcentaje Oxidación	Número de puntos regenerativos	Brotos / explante
NUDOS	1	33	0	0	33	1
	2	48	7	23.33	22	3
	3 (control) ¹	30	2	6.67	30	1
Peciolos	1	64	64	100	0	0
	2	64	64	100	0	0
Hojas cotiledonarias	1	106	20	18.87	0	0
	2	59	58	98.31	0	0
Cotiledones	1	30	0	0	0	0

¹ El lote 3 de nudos correspondió a un control, esto es, que fueron sembraron nudos en medio COR7 sin reguladores de crecimiento.

En la formación de brotes adventicios vía organogénesis directa, la concentración de las citocininas es la determinante en la diferenciación. En las plantas, esta hormona tiene efectos como promoción de morfogénesis, división celular, diferenciación de brotes adventicios, expansión de hojas, retraso de la senescencia y diferenciación de cloroplastos, entre otros (ver tabla 2).

En protocolos de regeneración de *Capsicum*, se ha reportado el uso de BA y Thidiazurón (TDZ) (ver tabla 4) principalmente. Para BA el rango de concentración utilizado va de 8.8 μM hasta 22.2 μM y para TDZ de 4.5 μM a 13 μM . En algunos protocolos reportan que estas concentraciones promueven el aumento en la formación de brotes adventicios, sin embargo, se menciona que una alta concentración de citocininas también se produce la oxidación prematura de explantes (Azofeifa 2009), por ello se decidió utilizar 5 mg (22.2 μM) de BA, y para evitar la oxidación se implementó el uso de carbón activado como adsorbente de compuestos fenólicos producidos en exceso, también se aumentó la concentración de PVP que también es un adsorbente de compuestos fenólicos, aldehídos y sustancias ácidas propias de los procesos de oxidación en plantas y que funcionan de mejor manera al ser combinados con otros compuesto adsorbentes, la concentración de ácido cítrico u ascórbico (como antioxidantes) se mantuvo y se adicionaron sulfato de cobre CuSO_4 que, ha concentraciones muy pequeñas además de tener un efecto fungicida ayuda en proceso enzimáticos y es coadyuvante en fotosíntesis y respiración, y nitrato de plata AgNO_3 que compite por el sitio de unión del etileno en los tejidos; esta hormona genera senescencia, y por tanto pérdida de hojas además disminuye el desarrollo de las plantas (Azofeifa, 2009, Kothari *et al.*, 2010, Peter, 2004).

A pesar de haber realizado modificaciones en el medio de cultivo para el tratamiento COR7, los índices de oxidación persistieron sólo en alguno explantes como se muestra en la gráfica 3 donde se observa que tanto cotiledones como peciolo tuvieron los índices más altos sin dar algún tipo de respuesta organogénica como formación de brotes adventicios o proliferación de callosidad.



Gráfica 3. Porcentajes de oxidación en diferentes explantes del ensayo 3, tratamiento COR7.

Como se puede observar en las figuras 30 y 31, tanto el peciolo como las hojas cotiledonarias se oxidaron con forme pasó el tiempo de incubación. Se hace más evidente la oxidación del tejido en las hojas cotiledonarias, ya que a las 3 semanas de incubación más del 50 % ya presentaban necrosis, mientras que los peciolos tardaron más en oxidarse.

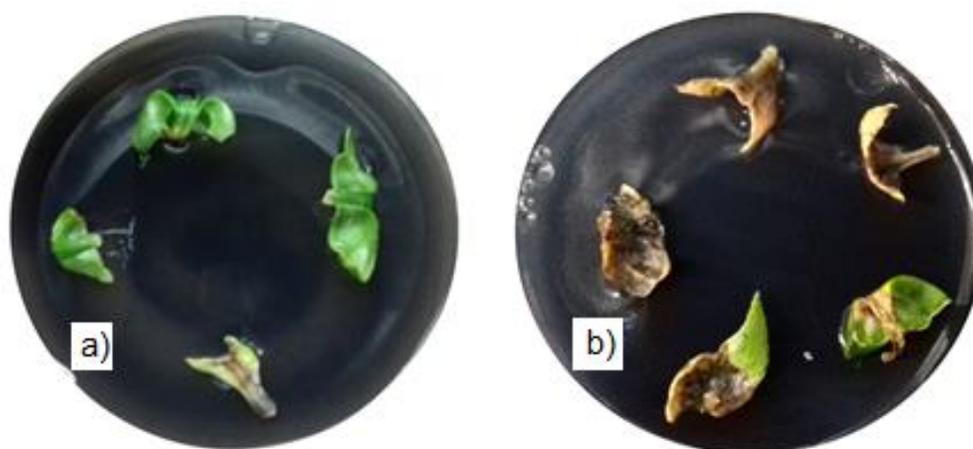


Figura 30. Peciolo en medio de cultivo COR7 en el tercer subcultivo, a) Peciolo con 3 semanas de incubación sin tejido oxidado. b) Peciolo con 12 semanas de incubación con más del 50 % del tejido oxidado.

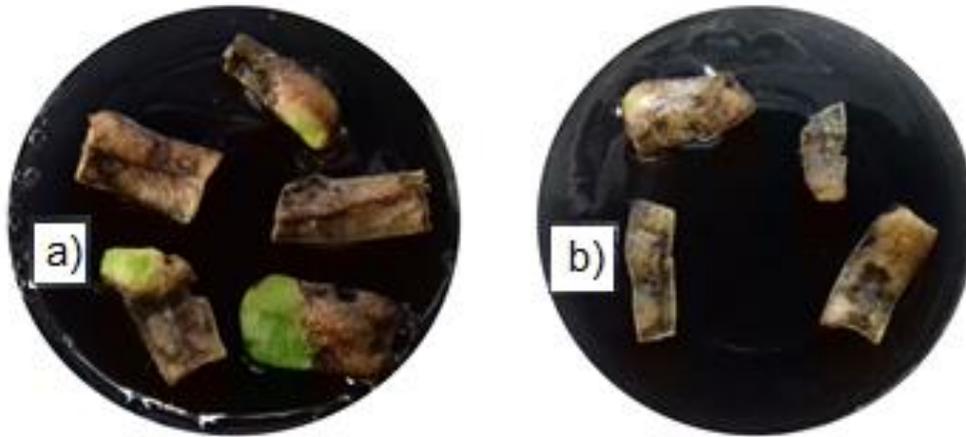


Figura 31. Hojas cotiledonarias en medio de cultivo COR7 en el tercer subcultivo, a) hojas cotiledonarias con 3 semanas de incubación con más del 50 % del tejido oxidado. b) hojas cotiledonarias con 12 semanas de incubación totalmente oxidada.

Por otro lado, los explantes en los que hubo formación de puntos de regeneración fueron los nudos como se muestra en la tabla 15, en los cuales, a pesar de existir oxidación, estos fueron capaces de generar respuesta organogénica.

En la figura 32 se observa la respuesta de los nudos tras 1 y 3 semanas de incubación respectivamente en el medio de cultivo COR 7. En estos explantes hubo un 100% de respuesta. Esto pudo deberse a la adición de los micronutrientes, CuSO_4 como coadyuvante en la fotosíntesis y respiración, y nitrato de plata AgNO_3 como inhibidor de etileno, disminución de senescencia y pérdida de hojas, mientras que el aumento en la concentración de PVP y adición de carbón activado disminuyeron considerablemente la oxidación en el medio de cultivo. En conjunto con los demás compuestos en el medio se promovió la formación de brotes adventicios (Peter, 2004; Azofeifa, 2009, Kothari *et al.*, 2010).



Figura 32. Formación de brotes adventicios provenientes de nudos.

Al llegar a la sexta semana y segundo subcultivo de los explantes, se observaron dos fenómenos, alargamiento de los brotes y desarrollo de raíces por lo cual fueron traspasados al medio de cultivo COR7-EL al cual se le redujo la concentración de BA al 50% y se agregó ANA para promover la formación de raíces y lograr mayor alargamiento de los brotes. En la figura 33 se pueden observar los brotes individualizados y que presentan formación de raíces.

Después de la diferenciación de brotes adventicios, el alargamiento y la formación de raíces son pasos claves para el éxito de los protocolos de regeneración ya que como menciona Kehie, (2012) y Santana, (2005) muchos explantes de *Capsicum* que son sometidos a un proceso de regeneración por organogénesis suelen tener muchos problemas durante el alargamiento y es muy común observar malformaciones en tallos y hojas durante esta etapa siendo éste el principal problema reportado para la regeneración *in vitro* de Chile.



Figura 33. Proliferación de brotes adventicios y formación de raíces a las seis semanas.

A las 12 semanas, en los explantes comenzaron a proliferar brotes adventicios generando hasta 4 de un mismo explante como se muestra en la figura 34 donde incluso se formaron en algunos explantes flores las cuales son un precedente del desarrollo de frutos, cabe señalar que no se observaron anomalías o malformaciones.



Figura 34. Proliferación de brotes adventicios, explantes provenientes de entrenudo con 12 semanas.

A comparación con el grupo control como se muestra en la figura 35 donde se observa que los explantes al no contener reguladores de crecimiento que favorezcan la división celular presentan elongación sobre el explante original sin multiplicar ni generar raíces.



Figura 35. Explante del grupo control de COR7 sin reguladores de crecimiento a las 12 semanas de edad posteriores a la disección.

7.5 Enraizamiento de brotes adventicios y aclimatación de plantas regeneradas

Finalmente, cuando las plántulas tuvieron una altura mayor a los 10 cm, fueron traspasadas a suelo y aclimatizados como se muestra en la figura 36.

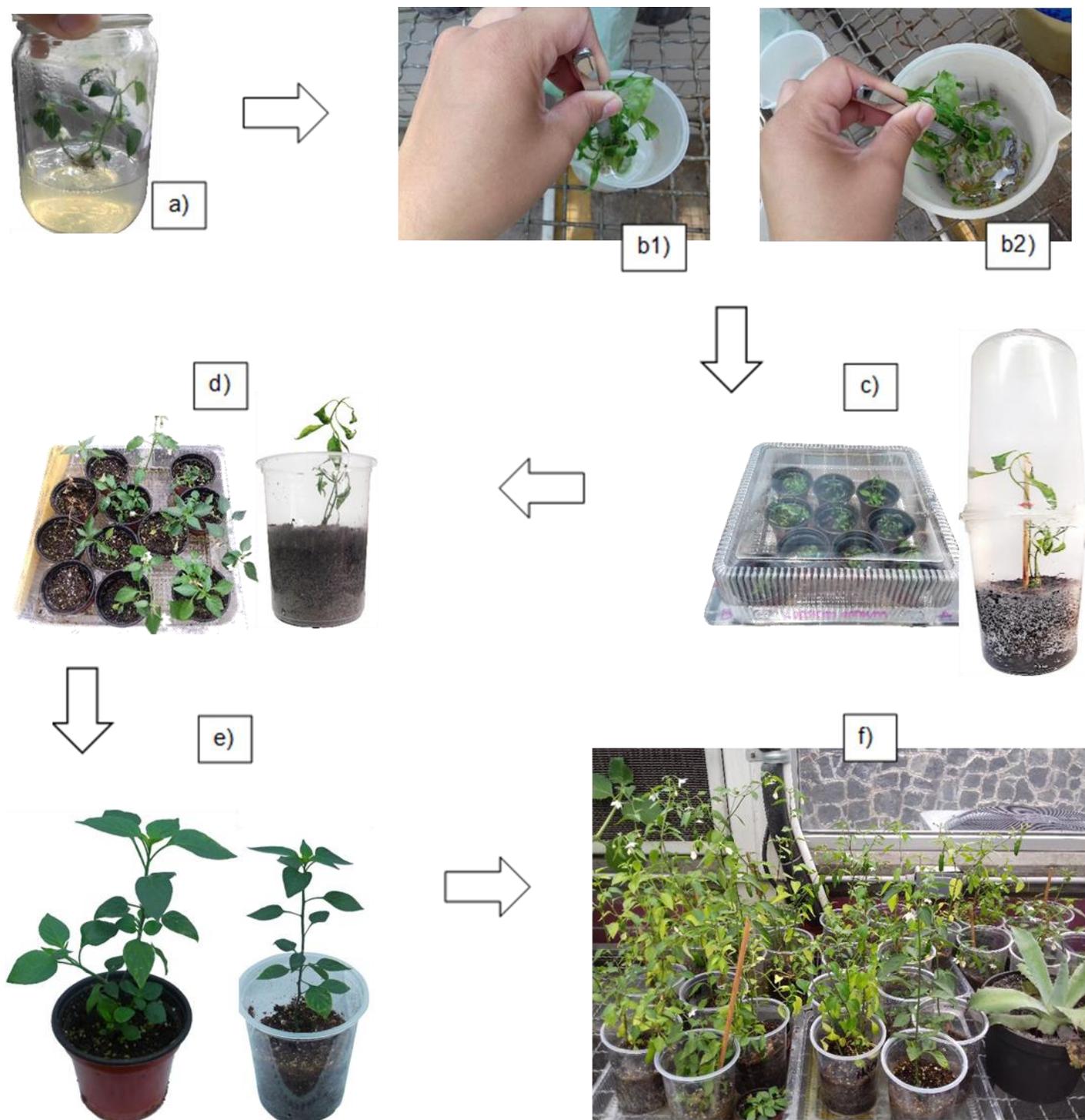


Figura 36. Aclimatación y pase a suelo. a) Plantas regeneradas *in vitro* en medio COR-EL b1) solución agrimycin-benomil, b2) solución micorrízica, c) plantas de diferentes tamaños en recipientes con domo, d) plantas después de 30 días de ser trasplantadas sin domo, e) plantas aclimatizadas sin domo, f) plantas con fruto después de 60 días *ex vitro*.

Las características fisiológicas de las plantas *in vitro* no son iguales que las de una *ex vitro* ya que las primeras se encuentran bajo condiciones estándar de humedad, luz y nutrientes que generan malformaciones en raíces y que pueden presentar problemas en la absorción de agua, ausencia de pelos radiculares y deshidratación rápida, entre otros problemas dando como resultado que las plantas no se desarrollen y haya pudrición en raíces provocando la muerte (López, 1996), estas malformaciones pueden corregirse si se realiza una adecuada y paulatina aclimatación ya que los porcentajes de pérdida de plantas en esta etapa suelen ser altos. Por ello, uno de los parámetros evaluados en el pase a suelo y aclimatación fue el porcentaje de supervivencia de las plántulas trasplantadas, para ello fue necesario desarrollar una metodología que promoviera el desarrollo de las raíces en suelo protegiéndolas a la vez de patógenos que pudieran afectar el desarrollo *ex vitro*.

Se probaron dos sistemas, el primero consistió en sumergir las raíces por 1 minuto en una solución al 4% de Agrimycin y 1 minuto en una solución de Benomil de igual manera al 4%. El uso de estas soluciones tiene como objetivo proteger a las raíces contra patógenos, Benomil inhibe la mitosis de hongos ascomicetos y basidiomicetos, mientras que Agrimycin puede traslocarse a diferentes órganos controlando y previniendo infecciones bacterianas. El segundo método consistió en sumergir las raíces en una solución de *Glomus sp* durante 1 minuto, la cual es una mezcla de hongos micorrízicos arbusculares, que forma una asociación mutualista entre raíces y hongos, esta simbiosis hace posible que haya un aumento en la absorción de nutrientes vía raíz como iones de zinc, cobre y amonio, además de favorecer tolerancia ante sequía, protección contra patógenos de los suelos, entre otras funciones que los hacen una buena herramienta para favorecer la adaptación al suelo de plantas *in vitro* y promover su crecimiento.

En la tabla 17 se presentan los porcentajes de multiplicación de las plantas pasadas a suelo y aclimatadas. Se observa que el número inicial de las plantas corresponde al número de plantas supervivientes tras 3 meses de subcultivo. A los seis meses posteriores a la aclimatación, los explantes iniciales presentaron multiplicación y

en ambos tratamientos fructificación de las plantas como se muestra en la figura 37.

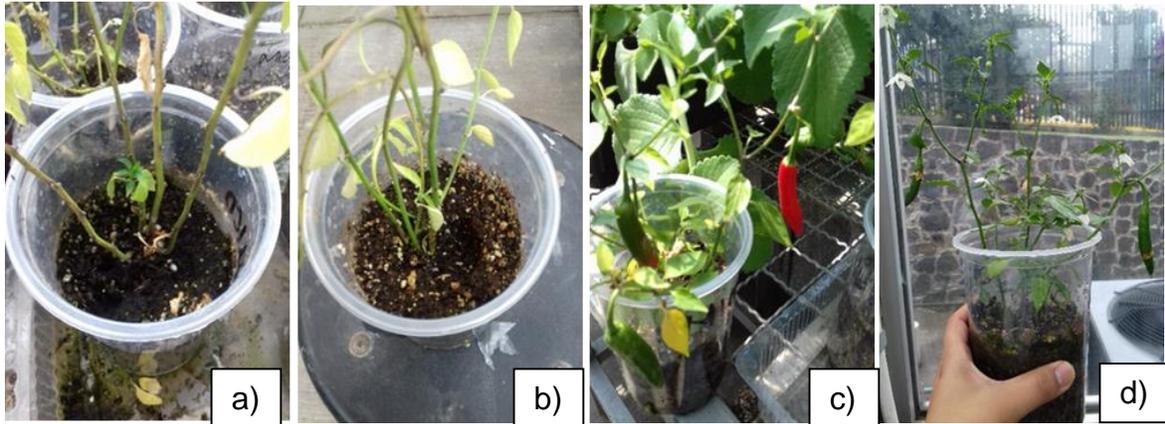


Figura 37. Multiplicación de brotes adventicios tras seis meses de aclimatización a) Multiplicación de brotes adventicios en tratamiento de solución micorrízica, b) multiplicación de brotes adventicios en tratamiento de solución Agrimycin-Benomil, c) Formación y maduración de frutos, solución micorrízica, d) Formación de frutos, de solución Agrimycin-Benomil.

Las plántulas inoculadas con la solución de hongos micorrízicos tuvieron un mayor porcentaje de multiplicación en ambos lotes, siendo además el mejor método para la adaptación de las plantas *in vitro*. A pesar de la protección brindada por ambos sistemas, existieron pérdidas de plantas debido a la presencia de hongos principalmente en las plantas que tuvieron un tamaño menor a los 15 cm de altura, además de la pérdida de humedad durante la aclimatación de las mismas.

Tabla 17. Multiplicación de brotes adventicios de distintos tratamientos pasados a suelo para aclimatización.

Tratamiento	Plántulas iniciales	Plántulas finales	Porcentaje de multiplicación ex vitro
Lote 1			
Agrimycin-Benomil (solución al 4%)	14	26 ¹	185
Solución Micorrízica	14	27 ¹	192.8
Lote 2			
Agrimycin-Benomil (solución al 4%)	11	2	0.0
Solución Micorrízica	11	17 ¹	121.4
Total	50	72 ¹	

¹ En estos casos, las plantas regeneradas mantuvieron el estímulo y al cabo de 6 meses aclimatadas se regeneraron más plantas por lo que al final de las observaciones se tuvieron más plantas de las sembradas al inicio.

7.6 Transformación genética de nudos

Al haber confirmado que el protocolo de regeneración establecido fue exitoso, se llevó a cabo una transformación genética por biobalística con los parámetros establecidos en la tabla 10 tomando como variable la distancia entre el microcarrier y el explante. El plásmido utilizado pEarly101-AtPPiasa4-GFP-GUS fue proporcionado por el Dr. Rogelio Rodríguez del laboratorio 115 del Conjunto E de la Facultad de Química por lo cual sólo fue necesario realizar una electroforesis para confirmar la integridad del ADN, se corrió a 85V por 40 min y se reveló con luz UV. La figura 37, muestra la fotografía del gel de agarosa en el cual se colocaron las muestras de la siguiente manera. El primer carril muestra el marcador de 1 Kb, los carriles 2, 3 y 4 corresponden a una dilución 1:100 del plásmido ya que se encontraba en una concentración de 1µg/µl que era muy elevada para poder realizar el ensayo; mientras que los carriles 5, 6 y 7 corresponden a una dilución 1:1000. El peso del plásmido utilizado corresponde a 12,000 pb y se aprecia su presencia en

la línea de 10,000 pares de bases confirmando además de la presencia, la integridad del mismo con lo cual fue posible utilizarlo para realizar transformación genética.

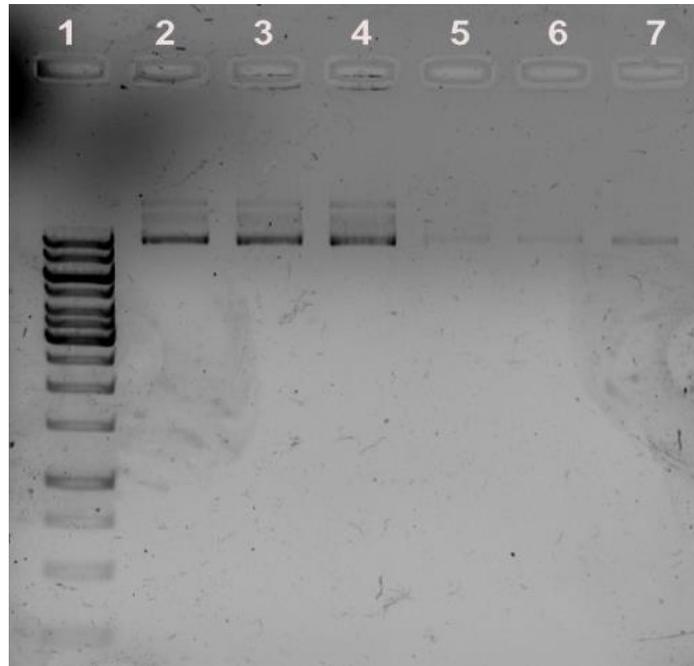


Figura 38. Gel de agarosa al 1% del plásmido pEarly 100-GFP-GUS. Carril 1: marcador molecular de 1Kb, carril 2, 3 y 4: dilución 1:100 del plásmido, carril 5, 6 y 7: dilución 1:1000.

Para la transformación genética se liofilizó y concentró el plásmido a $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se prepararon las balas de acuerdo al procedimiento descrito en el Anexo 1 y se utilizó una cámara de biobalística BIORAD®.

Fueron colocados 4 explantes de nudo con un tamaño de 1cm de largo por placa y sembrados con las yemas hacia arriba uno al lado de otro y bombardeados dos veces de acuerdo a las condiciones establecidas en la tabla 10; se estableció un control positivo bombardeando con balas impregnadas de agua en lugar de material genético y uno negativo en el cual no hubo bombardeo alguno.

Tres días después de la transformación, se subcultivaron los explantes en un medio de selección utilizado para inducción de brotes adventicios (COR 7) adicionado con el agente selectivo Basta® ya que el plásmido contuvo como agente de selección a Glufosinato de amonio. La concentración utilizada fue la reportada por Zaragoza (2017) que experimentó en callos de *Capsicum annuum* L. realizando una transformación genética exitosa utilizando el mismo plásmido determinado la concentración máxima de tolerancia del agente selectivo en 2mg.l⁻¹. Así se utilizó la misma concentración para los explantes sometidos a transformación y se realizaron observaciones cualitativas en espera de observar indicios de regeneración. Sin embargo, a las tres semanas se realizó una toma de fotografías (Anexo 3) en las cuales se manifiestan indicios de oxidación tanto en tallos como hojas.

Para poder determinar el éxito de una transformación genética, es posible realizar diferentes técnicas de detección ya que son insertados genes reporteros y de selección, los primeros tienen como función evidenciar mediante reacciones químicas la presencia de células transformadas, el plásmido utilizado contenía el gen GUS y la proteína verde fluorescente GFP (por sus siglas en inglés Green Fluorescent Protein), la proteína fluorescente puede monitorearse mediante observaciones en microscopio confocal y GUS puede monitorearse por medio de una prueba histoquímica; es un gen proveniente de *Escherichia coli* que codifica para la enzima β -glucuronidasa el cual es estable a altas temperaturas, resiste fijaciones histoquímicas y es de fácil detección mediante una prueba de expresión transitoria que produce una coloración azul celeste producto de una hidrólisis de compuestos colorigénicos y fluorogénicos que no son comúnmente expresados endógenamente por plantas (Chávez, 2001). Mientras que los genes de selección permiten reconocer a las células transformadas ya que codifican para enzimas que tienen la capacidad de inactivar antibióticos o herbicidas como Basta®, éste último fue utilizado en este trabajo a una concentración de 2 mg. l⁻¹, concentración determinada por Zaragoza, (2017).

Se realizó la prueba histoquímica para GUS y después de ser enjuagadas las muestras con buffer "Z" (Anexo 1), se realizaron observaciones en el microscopio

estereoscópico con el fin de determinar la presencia del gen reportero en explantes bombardeados a diferentes distancias y controles como se muestra en la figura 38.

En las fotografías tomadas en el microscopio se puede observar que existe presencia de tinción azul celeste tanto en explantes bombardeados como en los no bombardeados siendo más evidente la presencia de azul en explantes bombardeados a las distancias de 6 y 12 cm. La coloración azul presente en el explante control puede deberse a que existe expresión endógena de β -glucoronidasa. No existe un estudio que demuestre la presencia de expresión endógena en *Capsicum*, sin embargo, Serres 1997 y Turck 2012, identificaron la presencia de β -glucoronidasa en raíces y hojas de papa que no estaban transformadas. También Krasnyanski en 2001 reportó que existe una relación entre los tejidos que se encuentran en divisiones celulares constantes y la presencia de citocininas por lo que se puede observar sobre expresar β -glucoronidasa. Ya que estos cultivos pertenecen a la misma familia, es posible que exista de igual manera expresión endógena en chile, ya que es evidente que la tinción tanto en tejidos transformados como en los no transformados está más presente en aquellas zonas en las que el tejido comienza a diferenciarse como la punta de los tallos tanto inferior como superior. Sin embargo, también es evidente que, en los tejidos no transformados, la tinción es completa y más tenue, mientras que en los tejidos transformados existen zonas teñidas, pero no en su totalidad, lo cual podría ser un indicio de la presencia de β -glucoronidasa proveniente del plásmido bombardeado.

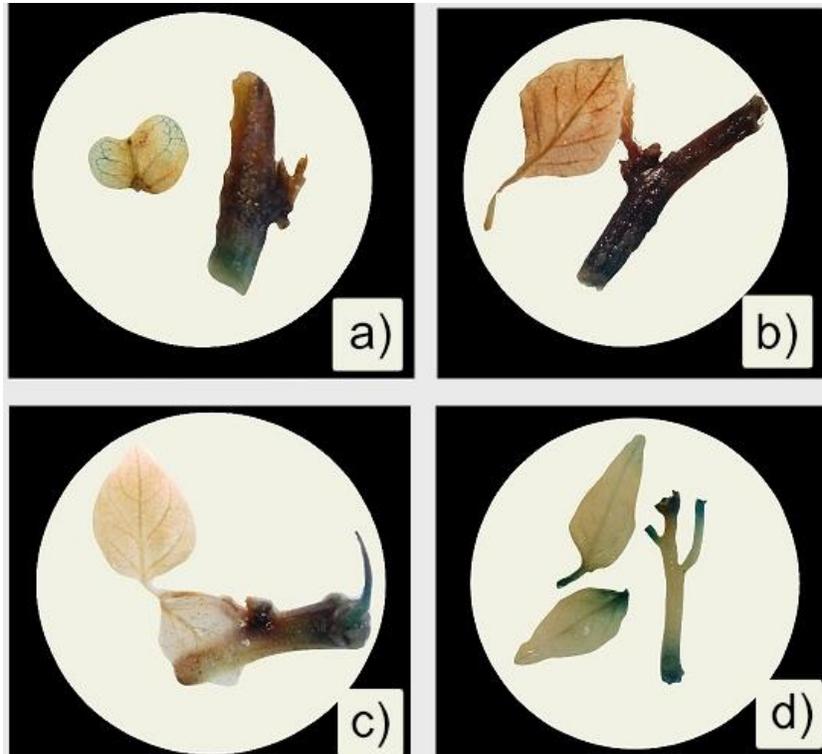


Figura 39. Explantes bombardeados teñidos en prueba de β -Glucoronidasa observados en microscopio estereoscópico. a) Explante bombardeado 6 cm, b) Explantes bombardeado a 9 cm, c) Explante bombardeado a 12 cm, d) Explante control.

8. CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo reproducible de regeneración *in vitro* de *Capsicum annum* L.
- El mejor explante para la inducción de organogénesis fue el nudo lográndose regenerar brotes adventicios en forma directa siendo la edad de disección de 4 semanas determinante para la regeneración.
- El mejor medio de cultivo para modular la organogénesis directa *in vitro* de *Capsicum annum* L. fue COR7, el cual contiene 5 mg de BA y promovió la inducción, proliferación, y elongación de brotes adventicios.
- La presencia de antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico), adsorbentes (carbón activado, PVP), y compuestos que eviten la senescencia (CuSO₄, AgNO₃) son indispensables para la obtención de plantas completas de chile serrano.
- El alargamiento y enraizamiento de los brotes adventicios regenerados se logró reduciendo la concentración de BA y agregando ANA al medio de cultivo.
- El uso de la solución de hongos micorrízicos permitió una mayor supervivencia de plantas *in vitro* durante el pase a suelo y aclimatación.
- Las distancias de 6 y 12 cm para la transformación genética presentaron mayor número de explantes con expresión transitoria.
- No fue posible determinar si el gen reportero GUS es eficiente para la transformación de *Capsicum annum* L.

9. PERSPECTIVAS

- Probar concentraciones más altas de 6-Benzilaminopurina para determinar si existe una mayor proliferación de brotes adventicios aumentando las concentraciones establecidas en este protocolo.
- Modificar el número de disparos y distancias utilizadas para la transformación genética, así como tamaño de las yemas.
- Realizar modificaciones a los plásmidos utilizados para insertar genes reporteros que no tengan expresión endógena en cultivos no transformados.
- Realizar curvas de concentración de Basta® en explantes no transformados para determinar la concentración ideal para la transformación genética de nudos.
- Utilizar *Agrobacterium spp.* como vector siendo una alternativa para transformar *Capsicum annuum*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour, A. y Vincent, J. (1994) Embriogénesis somática y suspensiones celulares. En: Keneth G, Royo O. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Costa Rica. Páginas: 20-25.
2. Acero, O, *et al.* (2003) Effect of Chili (*Capsicum annuum* L.) extracts and derived compounds on growth of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Huntoon". *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(002): 233-237.
3. Azcón J, *et al.* (2008). Auxinas. En: Azcón J., M. Talón. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. España. Cap.: 19-20.
4. Azofeifa A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*, *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
5. Barioglio C. (2006), En: Encuentro Grupo editor. *Diccionario de las ciencias Agropecuarias*. Argentina, 167,313.
6. Campbell, N. Reece, J. (2005) Forma y funcionamiento de las plantas. En: Urry, L. *Biología* Buenos Aires, Madrid. Páginas: 712-723.
7. Chávez, M. *et al.* (2001). Expresión transitoria del gen de la β -glucoronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum*), *Chapingo Serie Horticultura* 8(1): 107-121.
8. CONABIO, 2017. Solanaceae, *Capsicum annuum* L. Chile piquín, [En línea]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/Capsicum-annuum/fichas/ficha.htm>
9. Curtis, H. et al., (2006). Estructura y reproducción de las plantas. En: Curtis, H. *Invitación a la Biología*. Buenos Aires. Cap.7: 570.
10. Díaz, Marina, L. et al. (2004). Transformación genética, En: Levitus, G., Echenique V, et al. *Biología y Mejoramiento genético Vegetal II*. Argentina, INTA: 109-123.7
11. Díaz, C. y Chaparro, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61

12. FAO, 2013. Manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas. Ministerios de Agricultura y Ganadería. Paraguay, pág. 20-30.
13. FAO, 2017. Bernal E. Valverde Manejo de la resistencia a los herbicidas en los países en desarrollo, [En línea] Revisado 25/11/17. Disponible en:
<http://www.fao.org/docrep/007/y5031s/y5031s0h.html>
14. FAO STAT, 2017. Cultivos y productos de ganadería. [En línea] Revisado 8/9/17. Disponible en:
<http://www.fao.org/faostat/es/?#data/TP/visualize>
15. Gätjens O. (2012). Desarrollo de una nueva metodología de transformación genética no tradicional como estrategia potencial para introducir resistencia a infecciones fúngicas en vainilla (*Vanilla planifolia*). Instituto Tecnológico de Costa Rica. 10-20.
16. George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (Ed.). (2008). Plant Propagation by Tissue Culture (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
17. Guglielmo Z. y Fernández R. (2016). *Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas*. Colomb. Biotecnol. Vol. XVIII No. 2
18. Gutiérrez M., Antonia; Santacruz R., et. Al. (2003). *Mejoramiento genético vegetal in vitro*. e-Gnosis, México, (1): 1-20.
19. Hernández S., et al., (2001). *Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of Capsicum annuum from Mexico*, Plant Syst. Evol., 226: 129-142
20. Howeler, R. (1987). Deficiencias de macronutrientes y nutrientes secundarios, En: Howeler, R. *Desórdenes nutricionales de la planta de Yuca*. Colombia, CIAT: 14-20.
21. IBIAN (2017) [En línea] Revisado 25/11/17. Disponible en:
<https://www.ibiantech.com/antibioticos-de-seleccion-y-su-aplicacion-en-la-ingenieria-genetica/>
22. INIFAP, Selección y conservación de semilla de chile: primer paso para una buena cosecha, folleto técnico número 51., 2013 [En línea] Revisado 25/10/17. Disponible en:

23. Jefferson R. (1987). Assaying Chimeric Genes in Plants: The Gus Gene Fusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*.5, 387-405.
24. Kass, D. (1998). Nutrientes en las plantas. En: Núñez, J. *Fertilidad de los suelos*. Costa Rica, EUNED: 10-29.
25. Kothari S. *et al.* (2010), Chilli peppers- A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances* 28, 35–48.
26. Kehie M. *et al.* (2012). *In vitro* plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili, 3 *Biotech* (2): 31–35.
27. Koornneef M, y Meinke, D. (2010). The development of Arabidopsis as a model plant, *The Plant Journal* 61, 909–921.
28. Krasnyanski SF., Sandhu J., *et al.* (2001). Effect of an enhanced CAMV 35s promoter and a fruit-specific promoter on uid A expression in transgenic tomato plants sergei f. krasnyanski. *Vitro Cell* 37:427-433.
29. Larran *et al.* (2017). Rápido método de selección de plantas resistentes a herbicidas. *AGROMENSAJES* página 18-20
30. Lincoln T., E.Zieger (2006), Las células vegetales En: T. Lincoln, E.Zieger *Fisiología Vegetal Volumen I*. Estados Unidos. Universitat Jaume-I. Cap1, 14-20.
31. Long Janet (2009), “Los senderos prehispánicos del *Capsicum*”, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Históricas, Págs. 79-106.
32. López, C. (1996). Enraizamiento y aclimatización de plantas obtenidas *in vitro*, *Encuentros en la Biología*, N°31.
33. Miles, J. *et al.* (1998). Aplicaciones de la biotecnología al género *Brachiaria*. En: Miles, J, Maas, B., *Brachiaria Biología, Agronomía y mejoramiento*. Colombia, CIAT. Cap. 12, pág. 190-200.

34. Mohamed, M, Alsadon, A. (2011) Effect of the vessel type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*. 55 (2): 370-374.
35. Murashige T., F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
36. Nature. Model plants, 2017 [En línea] Revisado 10/07/17. Disponible en: <https://www.nature.com/subjects/model-plants>
37. Nee Michael, (1986), Flora de Veracruz Xalapa, Solanaceae En: Lorin 1. Nevling Jr. Cap: 49.
38. Negroni, M. (2009). Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. Argentina, Editorial Médica Panamericana En: Marcelo, T. Páginas 170-180.
39. Orlinska, M., Nowaczyk, P. (2015). *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum annuum* Spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology* 39: 60-68.
40. Pazmiño D, (2009). *Contribución de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo, y de los peroxisomas a la toxicidad del 2,4.D en plantas, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, 2009 España (30-37).*
41. Peter, J. (2004). Hormone Biosynthesis, metabolism and its regulation. En: Davis, P. *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal transduction, action!*, Cap: B Páginas: 36-203
42. P&C Maderas, Chile *Capsicum annuum*, Diciembre 2013. [En línea] Revisado 29/07/2017. Disponible en docplayer.es/12485236-Catalogo-chile-p-c-maderas-Capsicum-annuum.html.
43. Ramos, T. (2006). Regeneración de melón (*Cucumis, melo* L.) bajo condiciones *in vitro* como modelo biológico. UNAM, Ciudad de México.
44. Ramos, J. (2014). Avances en la micropropagación *in vitro* de plantas leñosas, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), 2012 Bogotá. 37-39.
45. Raven, P. *et al.* (1992). Células y tejidos del cuerpo vegetal. En: Word Publishers. *Biología de las plantas*. Cap. 20. Páginas: 384-390.
46. Renneberg R. (2008). Biotecnología verde En: J. Centelles y M. Ferrer. Eds. *Biotecnología para principiantes*. España: Reverté, Cap7, 178-182.

47. Roca, M. y Mroginski L. (1991). Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* En: W.M. Roca y L.A. Mroginski. *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones* Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cap 2, 20-22.
48. Sadava, D. *et al.* (2008). DNA recombinante y biotecnología En: s/e. *Vida la ciencia de la biología*. Estados Unidos: Panamericana, Cap 16, 360-380.
49. Sadhana A., Chandra N., Kothari S. (1989). Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. *Mathania*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 47-55.
50. SAGARPA. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Un panorama del cultivo de chile. Junio 2010 [En línea] (Actualizado al 3/9/2016).
Disponible en:
<http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
51. SAGARPA. Programa Integral de Desarrollo Rural 2014. Componente de Agricultura Familiar Periurbana y de Traspatio junio 2010 [En línea] (Actualizado al 5/9/2016).
Disponible en:
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/Documents/AgriculturaF/CHILE%20SERRANO.pdf>.
52. Salisbury F. y Cleon R. (1992). Hormonas y Reguladores del crecimiento: Auxinay Giberelinas, En: Grepe. N. *Fisiología vegetal*. Estados Unidos de América. Cap 17 y 18, 395-453.
53. Sanatombi, K. y Sharma G., (2008). *In vitro* plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants, *Biologia Plantarum* 52 (1): 141-145.
54. Sánchez, L. 2013. Las proteínas fluorescentes, nuevos colores para la biología celular. *SEBBM Divulgación*: 1-2.
55. Sandoval, R. (2011). El cultivo del chile piquín y la influencia de los ácidos orgánicos en el crecimiento, productividad y calidad nutricional. Universidad Autónoma de Nuevo León.

56. Santana N., Canto A. (2005). Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *HortScience* 40 (6): 1829-1831.
57. Serres R., Mccown B. *et al.* (1997). Detectable, β -glucuronidase activity in transgenic cranberry is affected by endogenous inhibitors and plant development. *Plant Cell Reports* 16 (9):641-646.
58. SNICS, SAGARPA, 2015, Generalidades de Cultivo, Recursos Fitogenéticos [En línea], Actualizado al 9/07/17, Disponible en: http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/Hortalizas/Chile/Generalidades_Cultivo.aspx
59. SNICS, 2014. Diversidad de chiles en México. [En línea], Actualizado al 9/06/17, Disponible en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/prensa/boletines/Paginas/2014-B041.aspx>
60. Turck S., Giordanengo P., *et al.* (2002). Transgenic potato plants expressing the nptII-gus marker genes affect survival and development of the Colorado potato beetle. *Plant Science* 162:373–380.
61. UNAM, 2017 .a. CHILES DE MÉXICO: COLORANTES COSMÉTICOS [En línea], Actualizado al 8/08/17, Disponible en: www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria17/102.pdf
62. UNAM. 2017. Cienciorama.b. *La vida en la Tierra, Proteínas fluorescentes* [En línea] (Actualizado al 2 de octubre de 2017). Disponible en: http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/145_cienciorama.pdf
63. Valenzuela, L., Armendáriz S. (2000). Use of antibiotics in culture media to reduce the presence of poluting agents during *in vitro* propagation of date palm. (*Phoneix dactylifera*)., *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, I (1) 47-50.
64. Zaragoza, 2017. Estalecimiento, caracterización y transformación de cultivos in vitro de dos especies del género *Capsicum* (*C. annuum* L. y *C. chinense* Jacq.) trabajo de tesis. UNAM. Ciudad de México.

ANEXO 1

Preparación de soluciones X-Gluc (10X) para prueba de expresión transitoria de *gus* (Jefferson, 1987).

1) Amortiguador de fosfato de sodio *

Compuesto	Pesar (g)	Volumen (ml)	Concentración (mM)	Stock
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.38	50 H_2O	200	39 ml
NaH_2PO_4	2.84	100 H_2O	200	<u>+ 61 ml</u> 100 ml (1M)

2) Ferrocianuro de potasio**

Compuesto	Pesar (g)	Volumen (ml)	Stock
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	0.211	100 H_2O	5 mM

3) Ferricianuro de potasio**

Compuesto	Pesar (g)	Volumen (ml)	Stock
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	0.164	100 H_2O	5 mM

4) EDTA *

Compuesto	Pesar (g)	Volumen (ml)	Stock
$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$	3.72	100 H_2O	100 mM

5) Tritón X-100*

1 ml de Tritón X-100 en 99 ml de H_2O	Stock 1%
---	-------------

- * Esterilizar en autoclave durante 18 minutos a 1.3 kg.cm⁻² o 18 lb. pulg⁻².
- ** Esterilizar por filtración en membrana millipore™ de 0.22µm de diámetro.

Preparación de solución-Gluc en condiciones de esterilidad.

Compuesto	Concentración (mM)	Stock 10x	Para 25 ml (ml)
Amortiguador de Fosfato de sodio Ph 7	100	1 M	2.5
EDTA	10	5	2.5
Ferricianuro de Potasio	0.5	5	2.5
Ferrocianuro de Potasio	0.5	5	2.5
Tritón X-100	0.5	5	2.5
X-Gluc en DMSO	1.0 mg.ml ⁻¹		25 mg/150µl de DMSO

Esta solución debe ser aforada a 25 ml con agua desionizada estéril y debe almacenarse a -20°C para ser descongelada lentamente al momento de ser utilizada.

Soluciones para medir expresión transitoria de *gus*.

a) Buffer "Z" pH 7.4.

Compuesto	Concentración (mM)	Pesar (g)
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	40	2.76
NaH ₂ PO ₄	60	4.26
KCl	10	0.37

MgSO ₄ .7. H ₂ O	1	0.12
--	---	------

b) Etanol al 70%

350 ml de etanol absoluto + 150 ml de agua desionizada estéril.

c) Acetona-Metanol (1:3)

166 ml de acetona + 333 ml de metanol.

d) Glicerol al 50%*

250 ml de glicerol absoluto + 250 ml de agua desionizada estéril.

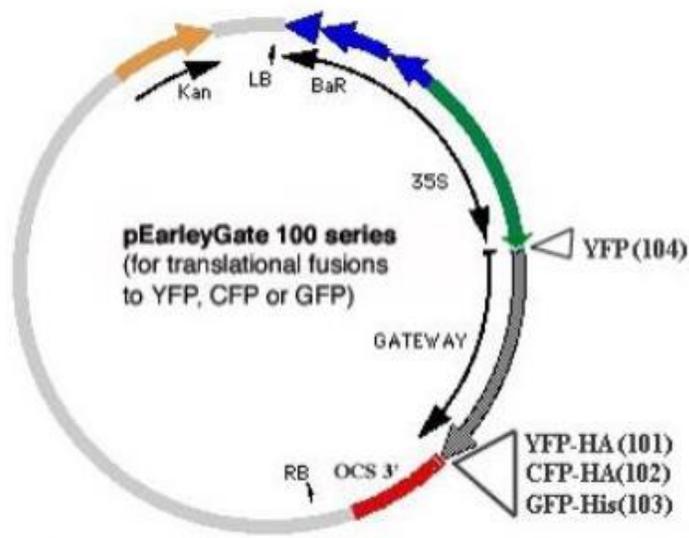
- * Esterilizar en autoclave durante 18 minutos a 1.3 kg.cm⁻² o 18 lb. pulg⁻².

ANEXO 2

Preparación de balas para transformación genética.

1. Pesar 30 mg de micropartículas de oro o tungsteno en un tubo de 1.5 ml
2. Agregar 1 ml de etanol al 70%
3. Dar vórtex por 3 a 5 minutos e incubar por 15 min
4. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 segundos
5. Remover y descartar el sobrenadante
6. Lavar tres veces con agua estéril y descartar sobrenadante.
7. Adicionar 500 μ l de glicerol al 50% permitiendo una concentración de 30 mg/ ml.

Construcción de plásmido pEarly101-AtPPiase4-GFP para transformación genética.



El plásmido fue donado al laboratorio 115 del dpto. de Bioquímica de la facultad de Química en el cual le fue insertado el gen reportero GUS, por esta razón no se encuentra en la construcción mostrada en este trabajo.

ANEXO 3

Fotografías de explantes bombardeados a las tres semanas posteriores a la transformación genética.

