



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**OBTENCIÓN DE PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE A PARTIR
DE CULTIVOS *IN VITRO* DE CHILE SERRANO UTILIZANDO EL SISTEMA
DE BIOBALÍSTICA.**

T E S I S

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

PRESENTA

ADDI DAVID FRAGOSO ANDRADE

DIRECTORA DE TESIS

I. A. María Teresa de Jesús Olivera Flores



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Dra. María Amanda Gálvez Mariscal

VOCAL: I.A. Teresa de Jesús Olivera Flores

SECRETARIO: Dr. Samuel Canizales Quinteros

1er. SUPLENTE: Dra. Carmina Montiel Pacheco

2° SUPLENTE: Q.A. Javier Axosco Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 116 - LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, DEPTO. DE
BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

I.A. Teresa de Jesús Olivera Flores:

SUSTENTANTE:

Addi David Fragoso Andrade:

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

A mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme desde el bachillerato hasta la licenciatura, las herramientas y el conocimiento necesario para ejercer mi profesión de una manera responsable, ética y lo más humanamente posible hacia quienes aportaron para alcanzar esta meta: el pueblo de México.

Al proyecto PAPIIT IN219518 “Cambios en acumulación de metabolitos secundarios en *Capsicum annuum* L. Serrano con expresión alterada de pirofosfatasas inorgánicas” por el financiamiento otorgado.

A la I. A. María Teresa de Jesús Olivera Flores por haberme permitido hacer uso de su laboratorio para la realización de este proyecto; agradezco el conocimiento que ha compartido conmigo más allá del cultivo de tejidos vegetales, estaré siempre agradecido con su apoyo y entrega para culminar tanto este proyecto como mi carrera universitaria.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por ser el responsable de este proyecto de investigación, sin el cual no hubiera conocido todo lo referente al cultivo de tejidos vegetales, en especial al chile serrano; agradezco también a su grupo de investigación por los plásmidos otorgados para concluir este proyecto.

A la Dra. María Amanda Gálvez Mariscal por el compromiso que brindó a mi trabajo de investigación desde un inicio para su revisión; sus comentarios y correcciones fueron de gran ayuda para lograr un mejor escrito y presentación.

Al Dr. Samuel Canizales Quinteros por sus buenos comentarios hacia este trabajo de investigación, así como al escrito en general, los cuales alentaron a que las revisiones indicadas fueran corregidas con el mayor esmero posible.

A la M. en D. Aracely Arandal Martínez por la supervisión de mi trabajo de investigación, puntualmente en la preparación del material y la capacitación para realizar una correcta transformación genética utilizando el sistema de biobalística.

ÍNDICE GENERAL.

Índice de figuras.....	x
Índice de tablas.....	xiii
Índice de gráficas.....	xiv
Abreviaturas.....	xv
I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades del chile serrano (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	3
2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica.....	3
2.1.2 Importancia del chile serrano.....	5
2.1.3 Algunos metabolitos importantes del chile serrano.....	6
2.2 Generalidades del cultivo de tejidos vegetales.....	8
2.2.1 Medios de cultivo.....	10
2.2.2 Citodiferenciación: Rutas morfogénicas.....	13
2.2.3 Cultivo de callos.....	15
2.2.4 Cinética de crecimiento en cultivos de callo.....	16
2.3 Transformación genética de cultivos vegetales.....	18
2.3.1 Transformación genética por medio de biobalística.....	20
2.3.2 Componentes moleculares para llevar a cabo la transformación genética.....	20
2.3.3 Regeneración de células transformadas.....	22
2.4 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i> L.....	22
2.5 Antecedentes directos y justificación para el cultivo <i>in vitro</i> de chile serrano	28
III. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo general.....	29
3.2 Objetivos particulares.....	29
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30

5.1 Diagrama general.....	30
5.2 Material biológico.....	31
5.3 Establecimiento de cultivos <i>ex vitro</i>	32
5.4 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	32
5.4.1 Método de desinfección.....	32
5.4.2 Medios de cultivo y condiciones de incubación.....	33
5.4.3. Germinación <i>in vitro</i> de semillas.....	35
5.5 Regeneración indirecta.....	35
5.5.1 Inducción de callo.....	35
5.5.2 Proliferación y evaluación del crecimiento de callos.....	36
5.5.3 Inducción de la vía regenerativa.....	37
5.6 Regeneración directa.....	39
5.6.1 Germinación <i>in vitro</i> de semillas para regeneración directa.....	39
5.6.2 Inducción de embriogénesis somática.....	39
5.7 Transformación genética por biobalística.....	40
5.7.1 Transformación de callos.....	42
5.7.1.1 Selección de la concentración del agente de selección en cultivo de callos.....	42
5.7.1.2 Selección de las condiciones de transformación genética de callo.....	42
5.7.1.3 Comprobación de la transformación y visualización de la expresión transitoria de GFP en callos.	43
5.7.2 Transformación de embriones cigóticos maduros e inmaduros....	44
5.7.2.1 Selección de la concentración de higromicina-B en plantas de chile serrano.....	44
5.7.2.2 Selección de las condiciones de transformación genética en embriones cigóticos.....	44
5.7.2.3 Visualización de la expresión transitoria de GFP en embriones cigóticos transformados.....	47
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6.1 Germinación <i>ex vitro</i>	48

6.2 Método de desinfección.....	48
6.3 Germinación <i>in vitro</i>	49
6.4 Regeneración indirecta.....	51
6.4.1 Inducción y proliferación de callo.....	51
6.4.2 Inducción de la vía regenerativa indirecta.....	54
6.5 Regeneración directa.....	60
6.5.1 Inducción de la vía regenerativa directa.....	60
6.6 Transformación genética de callos.....	64
6.6.1 Determinación de la concentración letal de higromicina en callos..	64
6.6.2 Condiciones para la transformación genética de callos.....	67
6.6.3 Comprobación de la transformación genética y expresión transitoria de GFP.....	67
6.7 Transformación genética de embriones maduros e inmaduros.....	70
6.7.1 Determinación de la concentración letal de higromicina en nudos	70
6.7.2 Comprobación de la transformación genética de embriones maduros.....	72
6.7.3 Comprobación de la transformación genética de embriones inmaduros.....	75
VII. CONCLUSIONES.....	78
VIII. PERSPECTIVAS.....	79
ANEXO I. Vectores de expresión utilizados en la transformación genética....	80
ANEXO II. Composición de macro y micronutrientes de los medios MS, N6 y WPM.....	82
ANEXO III. Procedimiento para el bombardeo de micropartículas por el método de biobalística.....	83
BIBLIOGRAFIA.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Morfología de <i>Capsicum annuum</i> L.....	5
Figura 2. Estructuras moleculares de capsaicina y 6,7-dihidrocapsaicina.....	7
Figura 3. Diversas formas de regeneración de células vegetales a plantas completas, debido a la capacidad totipotente que éstas tienen.....	9
Figura 4. Presencia de las diferentes hormonas endógenas en las plantas a lo largo de su ciclo vital y los requerimientos nutrimentales en cada una de las fases.....	12
Figura 5. Rutas regenerativas de plantas a través del cultivo in vitro de tejidos vegetales.....	14
Figura 6. <i>Esquema de la cinética</i> de crecimiento de células vegetales.....	17
Figura 7. Técnicas de transformación genética mediadas por <i>Agrobacterium</i> y biobalística, y la posterior regeneración de plantas.....	19
Figura 8. Mapa de un plásmido (Vector de expresión) con las secuencias de un promotor, un marcador de selección así como los inicios y términos de la replicación y transcripción.....	21
Figura 9. Diagrama de flujo experimental para la regeneración y transformación genética de chile serrano (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	30
Figura 10. Método de desinfección para la implementación de cultivos asépticos <i>in vitro</i> de los explantes de <i>Capsicum annuum</i> L.....	33
Figura 11. Disección de los embriones cigóticos inmaduros de chile serrano en condiciones asépticas.....	36
Figura 12. Estadios de las plántulas germinadas de <i>Capsicum annuum</i> L. probados para la embriogénesis somática directa.....	40
Figura 13. Diagrama general de transformación genética por biobalística para los diferentes explantes de <i>Capsicum annuum</i> L.....	41
Figura 14. Plantas de <i>Capsicum annuum</i> L. en condiciones de hidroponía con 60 días de desarrollo.....	48
Figura 15. Desarrollo de plantas donadoras de explantes bajo condiciones <i>in vitro</i> en medio MS sin reguladores de crecimiento.....	51
Figura 16. Comparación de dos medios de cultivo (B+ y N6P) para la inducción y proliferación de callo a partir de embriones inmaduros de <i>Capsicum annuum</i> L.....	53
Figura 17. Octavo subcultivo del experimento de reguladores de crecimiento para la regeneración de <i>C. annuum</i> L.....	56
Figura 18. Resultados cualitativos del tratamiento 1 (T1) en callo proveniente de embrión inmaduro de <i>Capsicum annuum</i> L.....	56

Figura 19. Resultados cualitativos del tratamiento 2 (T2) en callo proveniente de embrión inmaduro de <i>Capsicum annuum</i> L.....	57
Figura 20. Resultados cualitativos del tratamiento 3 (T3) en callo proveniente de embrión inmaduro de <i>Capsicum annuum</i> L.....	58
Figura 21. Resultados cualitativos del tratamiento 4 (T4) en callo proveniente de embrión inmaduro de <i>Capsicum annuum</i> L.....	58
Figura 22. Resultados cualitativos del tratamiento 5 (T5) en callo proveniente de embrión inmaduro de <i>Capsicum annuum</i> L.....	59
Figura 23. Visualización de las plántulas (estadio “a”) desarrolladas a partir de embriones maduros para la regeneración embriogénesis somática en diferentes medios de cultivo tras 48 días de cultivo.....	61
Figura 24. Visualización de las plántulas (estadio “b”) desarrolladas a partir de embriones maduros para la regeneración embriogénesis somática en diferentes medios de cultivo tras 48 días de cultivo.....	62
Figura 25. Visualización de las plántulas (estadio “c”) desarrolladas a partir de embriones maduros para la regeneración embriogénesis somática en diferentes medios de cultivo tras 48 días de cultivo.....	63
Figura 26. Callo proveniente de embrión cigótico inmaduro de <i>C. annuum</i> L. en medio N6P con un mes de incubación bajo diferentes concentraciones de higromicina-B.....	65
Figura 27. Resultados cualitativos de la transformación genética de callos provenientes de embriones cigóticos inmaduros de <i>Capsicum annuum</i> L. (chile serrano) probando diferentes parámetros dentro de la transformación genética por biobalística (distancia y tamaño de bala) en el primer ensayo.....	68
Figura 28. Nudos provenientes de plantas maduras de <i>Capsicum annuum</i> L. con 42 días de desarrollo en un medio MS-RD, incubados un mes bajo diferentes concentraciones de higromicina-B.....	71
Figura 29. Resultados cualitativos de la transformación genética de semillas maduras de <i>Capsicum annuum</i> L. (chile serrano) probando diferentes parámetros dentro de la transformación genética por biobalística (distancia y tamaño de bala) en el segundo ensayo.....	74
Figura 30. Observaciones del callo obtenido a partir de embriones cigóticos inmaduros de chile serrano en medio MS-RD después de cuatro meses de haber sido transformados con los plásmidos pCAMBIA1302::FBP::GFP (plásmido 1) y pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP (plásmido 2) en el tercer ensayo.....	76
Figura 31. Plantas de chile serrano obtenidas a partir de embriones cigóticos inmaduros en el tercer ensayo tras cuatro meses de la transformación genética con el plásmido 2 (pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP), desarrolladas en medio de selección MS-RD (15 mg/L de higromicina-B).....	77

Figura 32. Mapa general del vector de expresión (plásmido) pCAMBIA1302::GFP (superior) al que se le añadió la secuencia del promotor FBP-aldolasa (inferior), diseñado por Vega (2019) 80

Figura 33. Mapa general de los vectores de expresión (plásmidos) pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4-stp (superior) y pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP (inferior) diseñados por Salazar (2019)... 81

Figura 34. Esquema general del procedimiento de bombardeo de micropartículas a cultivos vegetales a través del sistema de biobalística (“Fran Espinosa”, 2012)..... 84

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Capsicum annuum</i> L.....	4
Tabla 2. Análisis bromatológico de <i>Capsicum</i> sp.....	6
Tabla 3. Revisión bibliográfica para la regeneración de <i>Capsicum annuum</i> L. a través de rutas organogénicas.....	24
Tabla 4. Revisión bibliográfica para la regeneración de <i>Capsicum annuum</i> L. a través de rutas embriogénicas.....	26
Tabla 5. Medios de cultivo generales utilizados en los experimentos del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Capsicum annuum</i> L.....	34
Tabla 6. Medios de cultivo preparados para la regeneración indirecta de plantas de <i>Capsicum annuum</i> L. utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (mg/L).....	38
Tabla 7. Medios de cultivo probados para la embriogénesis somática directa de <i>Capsicum annuum</i> L.....	39
Tabla 8. Experimento propuesto para la transformación genética de callos de <i>Capsicum annuum</i> L. por medio del sistema de biobalística.....	43
Tabla 9. Componentes del medio de cultivo (MS-RD) para la regeneración vía organogénesis directa de brotes de <i>C. annuum</i> L.....	45
Tabla 10. Experimento propuesto para la transformación genética de semillas maduras de <i>Capsicum annuum</i> L. por biobalística, utilizando diferentes medios de cultivo.....	46
Tabla 11. Experimento propuesto para la transformación genética de semillas inmaduras de <i>Capsicum annuum</i> L. por biobalística, utilizando dos plásmidos diferentes.....	46
Tabla 12. Germinación de semillas de chile serrano bajo condiciones <i>in vitro</i> en dos medios de cultivo diferentes.....	50
Tabla 13. Resultados cualitativos para la inducción de callo a partir de embriones cigóticos inmaduros en dos medios de cultivo diferentes.....	52
Tabla 14. Análisis de varianza de los datos obtenidos para la concentración letal de higromicina-B en callo proveniente de embrión cigótico inmaduro en medio N6P.....	66
Tabla 15. Prueba <i>Tukey</i> para determinar la diferencia significativa entre los grupos de la concentración letal de higromicina-B para callos de chile serrano.....	66

Tabla 16. Análisis de varianza de los datos obtenidos para la concentración letal de higromicina-B en nudos de plantas de <i>Capsicum annuum</i> L. en medio MS-RD.....	71
Tabla 17. Prueba <i>Tukey</i> para determinar la diferencia significativa entre los grupos de la concentración letal de higromicina-B para nudos de plantas de chile serrano.....	71
Tabla 18. Macro y micronutrientes de los tres medios generales utilizados...	82

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Cinética de resistencia a higromicina-B para callos provenientes de embrión inmaduro de chile serrano (<i>Capsicum annuum</i> L.) en medio N6P.....	65
Gráfica 2. Oxidación de nudos de plantas maduras (4 semanas de cultivo) de <i>Capsicum annuum</i> L. en medio MS-RD, expuestas a diferentes concentraciones de higromicina-B.....	70

ABREVIATURAS.

°C	Grados Celsius	EtOH	Etanol	NH₄ NO₃	Nitrato de Amonio
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	g	Gramo	NLNS	Medio NLNS
2iP	N ⁶ -(2-Isopentil)adenina	Germ	Germinación	nptII	Neomicin-fosfotransferasa II
ABA	Ácido abscísico	GFP	Proteína Verde Fluorescente	PAA	Ácido Fenilacético
ADN	Ácido desoxirribo-Nucleico	gusA	β-glucuronidasa	PEG	Polietilenglicol
AG₃	Ácido giberélico	h	Hora	pH	Potencial de Hidrógeno
AgNO₃	Nitrato de Plata	HCl	Ácido Clorhídrico	ppm	Partes por millón
AIA	Ácido indol-3-acético	HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	psi	Libras por pulgada cuadrada
AIB	Ácido indol-3-butírico	hpt	higromicin-fosfotransferasa	PVP	Polinilpirrolidona
ANA	Ácido 1-naftalenacético	kg	Kilogramo	R2	Vitaminas R2
ARN	Ácido ribonucleíco	KIN	Kinetina	Sac.	Sacarosa
B+	Medio B+	l	Litro	TDZ	Tidiazuron
B5	Medio B5	lux	Luciferasa	v	Volumen
BAP	6-N-Bencilaminopurina	m	Metro	WPM	Medio WPM
C.	<i>Capsicum</i>	M	Molar	Zn²⁺	Zinc (II)
CaCl₂	Cloruro de Calcio	mg	Miligramo	μg	Microgramo
CG	Caseína-Glutamina	min	Minuto	μl	Microlitro
cm	Centímetro	mm	Milimetro	μm	Micrómetro
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales	Mn²⁺	Manganeso (II)		
Cu²⁺	Cobre (II)	MS	Medio MS		
CuSO₄	Sulfato de Cobre	MS-RD	Medio MS de Regeneración Directa		
CW	Agua de Coco	N	Normal		
D.E.	Desviación Estándar	N6P	Medio N6P		
etc.	Etcétera	NaOH	Hidróxido de Sodio		

I. RESUMEN.

El chile serrano (*Capsicum annuum* L.) es una hortaliza de gran importancia en México debido a su uso en la industria alimentaria y farmacéutica, destacándose por sus componentes moleculares conocidos como capsaicinoides. El cultivo de tejidos vegetales ofrece diferentes herramientas biotecnológicas para la regeneración, propagación, conservación y mejoramiento genético de estas plantas, basándose en la totipotencialidad de las células vegetales, por lo cual la búsqueda de los factores que permitan modular las respuestas deseadas, en condiciones *in vitro*, son de gran interés en la investigación de este cultivo. Los reportes en la literatura sobre la regeneración y obtención de cultivos transgénicos de *Capsicum annuum* L. son muy variados; sin embargo, tienen una baja eficiencia en la transformación y obtención de plantas transgénicas.

En esta investigación se utilizó el explante de embrión cigótico, tanto maduro como inmaduro, probando diferentes vías de regeneración. Previamente se comprobó la viabilidad de las semillas utilizadas para los diferentes experimentos al igual que el método de desinfección para obtener cultivos asépticos. La vía de regeneración a través de callo se manejó en un medio N6P, el cual indujo y proliferó un callo friable con baja oxidación; la diferenciación celular del callo se experimentó con diferentes concentraciones de BAP tras subcultivos periódicos y en presencia de sales MS y N6P, diferenciándose una mayor cantidad de cloroplastos con BAP (3 mg/L) en medio MS, pero sin la obtención de órganos, respuesta inhibida por la presencia 2,4-D (2 mg/L).

Por su parte, la búsqueda de regeneración vía embriogénesis somática directa en plántulas de chile serrano con 10 días de desarrollo, a través de los medios MS y WPM con diferentes compuestos orgánicos (CG, CW y Vitaminas R2) así como una alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo (8%) y 2,4-D (2 mg/L), basados en la literatura correspondiente, no generó los resultados esperados ya que en vez de formar las estructuras embriogénicas deseadas solamente desarrolló callo en todos los tratamientos.

Para el callo de chile serrano se definió el mejor momento para la transformación genética por biobalística a través de una cinética de crecimiento, siendo entre el quinto y el séptimo día de subcultivo los mejores para bombardearlo. Se probaron diferentes

concentraciones de higromicina-B a través de una cinética de resistencia para causar la muerte celular y utilizarse en la transformación genética, siendo 25 mg/L la concentración letal. Los callos se bombardearon con el plásmido (*pCAMBIA1302::FBP::GFP*) y se observó la expresión transitoria de GFP después de cinco y treinta días de la transformación, siendo positiva en ambos ensayos, pero con la necrosis del callo después de 120 días en el agente de selección.

La transformación genética de semillas también requirió de una cinética de resistencia a higromicina-B, obteniendo que 15 mg/L causan la muerte del tejido vegetal. Se bombardearon las semillas maduras con el plásmido (*pCAMBIA1302::FBP::GFP*) bajo dos medios de cultivo diferentes (MS-RD y N6P), observando la expresión positiva de GFP tras cinco días de la transformación, sin embargo las plantas se necrosaron en su totalidad en el agente de selección después de 32 días de haber sido transformadas. Respecto a las semillas inmaduras se bombardeó con dos plásmidos (*pCAMBIA1302::FBP::GFP* y *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP*) en un medio MS-RD y se mantuvieron bajo las mismas condiciones de selección, obteniendo callo en las semillas cultivadas tras cuatro meses de incubación en el medio de selección así como algunas plántulas completas; tanto los callos obtenidos como las plántulas completas fueron observadas en un microscopio confocal para revisar la expresión transitoria de GFP tras 4 meses del bombardeo, siendo ausente en los callos pero sí presentada en todo el tejido observado de las plantas transformadas con el plásmido *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP*.

En conclusión, la obtención de un protocolo de regeneración *in vitro* para *Capsicum annuum* L., ya sea vía organogénesis o embriogénesis, no se logró bajo las condiciones experimentales probadas, sin embargo se obtuvieron plantas de chile serrano modificadas genéticamente tras bombardear directamente semillas inmaduras con el plásmido *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP* en un medio MS-RD con selección en higromicina-B a una concentración de 15 mg/L.

II. ANTECEDENTES.

2.1 Generalidades del chile serrano (*Capsicum annum* L.).

El género *Capsicum* (Solanaceae) está constituido por 30 especies aproximadamente. México es considerado el centro de origen y domesticación de *Capsicum*, siendo una de las primeras plantas domesticadas en el continente americano, destacando *C. annum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* (Mendoza, 2006).

El chile (*Capsicum spp.*) es uno de los cultivos más importantes en México y su utilización se remonta a la época precolombina, en donde se utilizaba como condimento. En general, los diferentes chiles han jugado un papel importante como fuente de vitamina C en las diferentes culturas americanas (Eshbaugh, 1970). Existen evidencias de que en diferentes culturas esta hortaliza se ha utilizado como medicamento, castigo, moneda, material de tributo, etc. (Long-Solis, 1998).

Algunas especies se destacan por tener frutos con sabor picante y agrio razón por la cual la palabra *Capsicum* proviene del griego *Kapso* (*Kaptein*) que refiere al aroma pungente y penetrante que tiene el chile. Este género comprende varias especies de plantas, emparentadas con el tomate, la papa, el tabaco, el pepino, entre otros (Mendoza, 2006).

2.1.1 Clasificación taxonómica y descripción botánica.

La taxonomía del género *Capsicum* es compleja debido a la gran variabilidad de tipos existentes en formas cultivadas y silvestres, así como a la diversidad de criterios utilizados en su clasificación. Por ello *Capsicum annum* ha sido sometido a diversos estudios taxonómicos y filogenéticos, basados en caracteres morfológicos y moleculares, que han permitido conocer aspectos sobre la taxonomía del género y las relaciones evolutivas que lo conforman (Hernández-Verdugo et al., 1999), en la tabla 1 se presenta su clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Capsicum annuum</i> L. (tomado y modificado de Hernández-Verdugo et al., 1999 y Heike-CONABIO, 2009)	
<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>División</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase</i>	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Subclase</i>	<i>Asteridae</i>
<i>Orden</i>	<i>Solanales</i>
<i>Familia</i>	<i>Solanaceae</i>
<i>Subfamilia</i>	<i>Solanoide</i>
<i>Tribu</i>	<i>Solaneae</i>
<i>Género</i>	<i>Capsicum</i> L.
<i>Especie</i>	<i>annuum</i>
<i>Variedad</i>	<i>Tampiqueño</i>
<i>Nombre común</i>	<i>chile serrano</i>

El chile serrano (*Capsicum annuum* L.) proviene de zonas montañosas y pertenece a los chiles tradicionales, nombrado comúnmente como chile verde. Botánicamente es una planta herbácea que crece de manera arbustiva, con un solo tallo y muchas ramas ascendentes-extendidas (Anguiano, 2010) y una altura promedio de 0.85 m (Yáñez et al., 2015).

Particularmente los tallos de la planta son verdes, costillados, pubescentes con pelos incurvados de 0.4 mm de largo. Las hojas de esta planta aparecen solas o en pares, lanceoladas de 2 a 8 cm de largo y 1 a 3 cm de ancho con el ápice acuminado, la base cuneada y acuminada abruptamente en el pecíolo de 5 a 20 mm de largo. Las flores son de 1 a 2 cm de largo y 0.5 mm de ancho; corola blanca y acampanada de 9 mm de ancho; filamentos de 1 a 1.5 mm de largo, con anteras verde azuladas y estilos de 2.5 mm. El fruto es alargado, cónico con punta roma y redondeada; su color es verde oscuro; su piel es lisa, gruesa y consistente; el sabor es picante y con cuerpo. La semilla tiene un color pardo-amarillento, comprimida de 2.5 mm de largo (Anguiano, 2010) (figura 1).



Figura 1. Morfología de *Capsicum annuum* L. (Breitkopf & Härtel, 1901)

2.1.2 Importancia del chile serrano.

Aproximadamente 89% del total de áreas cultivadas con chile en el mundo se encuentran localizadas en el continente asiático, destacando India, China, Corea, Tailandia, Vietnam, Sri Lanka e Indonesia. La segunda región más importante comprende a los Estados Unidos de América y México con un 7% del total plantado y, finalmente, el 4% restante en países de Europa, África y Medio Este (Luiz & Maria, 2016).

A nivel nacional, las diez entidades productoras de chile verde son Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas, San Luis Potosí, Sonora, Jalisco, Michoacán, Guanajuato, Baja California Sur y Durango, aunque se produce en las 32 entidades del país. El chile verde es el de mayor producción en el país, ocupando el segundo lugar en producción mundial; en 2017 el cultivo fue de 3, 296, 875 toneladas para permanecer en dicha posición, después de China que es el principal productor. Por otra parte, el principal mercado del cultivo de esta hortaliza es Estados Unidos de América, a donde se exportó 1, 053, 000 toneladas durante 2017 (ASERCA, 2018).

El mercado de los frutos de *C. annuum* L. es muy amplio y ofrece una gran gama de productos procesados, el consumo de sus frutos frescos, así como propósitos ornamentales. Los productos que son procesados incluyen salsas, encurtidos, paprika, botanas secas crujientes, frutos secos, jaleas, productos medicinales y funcionales como lo son las sustancias antioxidantes que incluyen la vitamina C, Vitamina E y carotenoides. El aporte más relevante de esta hortaliza debe a la presencia del picor dado por la capsaicina secretada por las glándulas en la placenta del fruto (Luiz & Maria, 2016).

El chile serrano tiene propiedades irritantes, laxantes y expectorantes, además de ser utilizado como analgésico tópico. En estudios como el de Athanasiou et al. (2007) se ha demostrado que los vaniloides, familia de moléculas a las que pertenece la Capsaicina, se unen a proteínas en la mitocondria de células cancerosas y genera apoptosis o muerte celular, sin dañar a las células sanas circundantes.

El aporte nutrimental de *Capsicum sp.* se muestra en la tabla 2, donde se destaca el contenido de ácido ascórbico (Vitamina C) que, con base en lo mencionado por Kothari et al. en 2010, el chile aporta más de esta vitamina que una naranja (53.2 mg/100 g peso fresco) (USDA Nutrient Data Base, 2019), además de minerales como manganeso y molibdeno, entre otros.

Tabla 2. Análisis bromatológico de <i>Capsicum sp.</i> tomada y modificada de Aguirre-Mancilla et al., 2017.	
Componente	Porcentaje en <i>Capsicum sp.</i>
Agua	91.0%
Almidón	0.81%
Fibra	2.2%
Pectina	0.73%
β -carotenos	0.92 mg/100g peso fresco
Vitamina C	34-192 mg/100 g peso fresco
Ácido málico	208 mg/100 g peso fresco

2.1.3 Algunos metabolitos importantes del chile serrano.

Las propiedades pungentes de los chiles son atribuidas a un grupo de compuestos llamados capsaicinoides, los cuales son derivados del metabolismo secundario de la planta de *Capsicum spp.* Estos compuestos se sintetizan y acumulan en el tejido placentario, en donde las semillas se encuentran unidas dentro del fruto. Estos compuestos han sido extensamente utilizados como aditivos alimentarios y farmacéuticos, además de tener propiedades antimicrobianas (Peña-Álvarez et al., 2009).

Se conocen más de 20 diferentes capsaicinoides cuya estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. La porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides. El ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina. Las diferencias estructurales de los diversos capsaicinoides residen en la naturaleza de la cadena lateral, de entre 9 y 11 carbonos de largo, con un número variable de enlaces dobles colocados en diferentes posiciones (Vázquez-Flota et al., 2007).

Los miembros más importantes del grupo de los capsaicinoides son la capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, y homodihidrocapsaicina (Orellana-Escobedo et al., 2013). La capsaicina (N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-8-metil-E-6-nonenamida) y su análogo 6,7-dihidrocapsaicina (N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil]-8-metil-6-nonanamida) (figura 2), en conjunto llegan a representar más del 90% del total de los capsaicinoides presentes en los frutos, siendo la capsaicina la más abundante (Vázquez-Flota et al., 2007; Peña-Álvarez et al., 2009; Orellana-Escobedo et al., 2013).

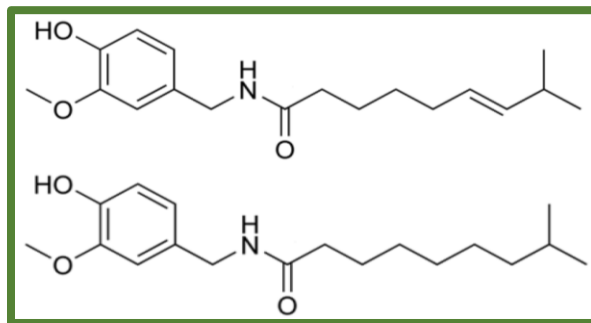


Figura 2. Estructuras moleculares de capsaicina (superior) y 6,7-dihidrocapsaicina (inferior), (Usman et al., 2014).

La cantidad de capsaicinoides contenidos en los chiles es variable, manteniéndose en un rango de 0.1% a 1.0% del peso fresco del fruto; la cantidad de éstos depende de la edad de la planta, la temperatura en la que creció, edad y posición del fruto, así como el tiempo a la exposición e intensidad lumínica, influyendo también el genotipo de éstos (Orellana-Escobedo et al., 2013; Usman et al., 2014). El contenido de Capsaicina en chile serrano es de 627.48 ± 17.03 mg/kg masa seca y de dihidrocapsaicina de 399.77 ± 5.48

mg/kg masa seca, cantidad que coincide con el rango mencionado previamente (Orellana-Escobedo et al., 2013).

El color rojo del fruto maduro de *Capsicum annuum* L. es impartido principalmente por los carotenoides, con más de 50 estructuras identificadas. Cabe destacar que la capsantina, capsorubina y criptocapsina son las moléculas que imparten el color rojo brillante a los frutos maduros mientras que el color amarillo-anaranjado es dado por β -carotenos, zeaxantina, violaxantina y b-criptoxantina (Melgar-Lalanne et al., 2016)

En algunos estudios se ha logrado la síntesis de capsaicinoides mediante el cultivo *in vitro* de *C. annuum* y *C. frutescens* encontrándose que hay menor capacidad de producción capsaicinoides, en comparación con los frutos, esto relacionado a la baja actividad de algunas enzimas involucradas en su formación. Se han intentado diferentes estrategias para promover la acumulación de capsaicinoides en cultivos *in vitro*, basadas en el hecho de que en este tipo de cultivos la acumulación de capsaicinoides ocurre cuando se ha detenido la acumulación de biomasa, por lo que la reducción o eliminación de reguladores de crecimiento y nutrimentos del medio, promueven la acumulación de estas moléculas pungentes (Vázquez-Flota et al., 2007).

2.2 Generalidades del cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de células, tejidos y órganos vegetales, es un conjunto de técnicas con la que se logra el crecimiento y multiplicación de células y tejidos, utilizando soluciones nutritivas en un ambiente aséptico y controlado (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006). En esta tecnología se estimula el crecimiento de las plantas, utilizando órganos o tejidos adecuados con los que se inician los cultivos. La limpieza, esterilización y tamaño adecuado del explante, así como el medio de cultivo en donde éste se desarrolle son factores moduladores de la respuesta *in vitro*, siendo así una importante herramienta en investigación básica, aplicada y para uso comercial (Thorpe, 2013).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) tiene un enfoque científico que optimiza sistemáticamente las condiciones físicas (naturaleza del sustrato, pH, luz, temperatura y humedad), químicas (composición del medio de cultivo respecto a nutrientes y reguladores de crecimiento y otros compuestos orgánicos) y ambientales (composición gaseosa dentro del frasco de cultivo, temperatura y fotoperiodo) con el fin de lograr un

adecuado desarrollo, metabolismo y diferenciación celular en condiciones *in vitro* (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006), permitiendo la propagación de plantas donde una parte o tejido de ésta es puesto sobre el medio de cultivo nutritivo que favorece la producción de células, brotes, raíces y plantas completas (Bhoite & Palkishar, 2014).

Lo anterior se rige bajo el principio de la totipotencialidad, establecido por el botánico alemán Haberlandt en 1902 por primera vez, y que define la capacidad que tiene una sola célula vegetal que después de varias etapas de división celular, se desarrolla y forma estructuras especializadas formando una planta completa como se muestra en la figura 3 (Bhoite & Palkishar, 2014). Otra definición de la totipotencialidad, propuesta por Calva & Pérez (2005), indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una planta completa.

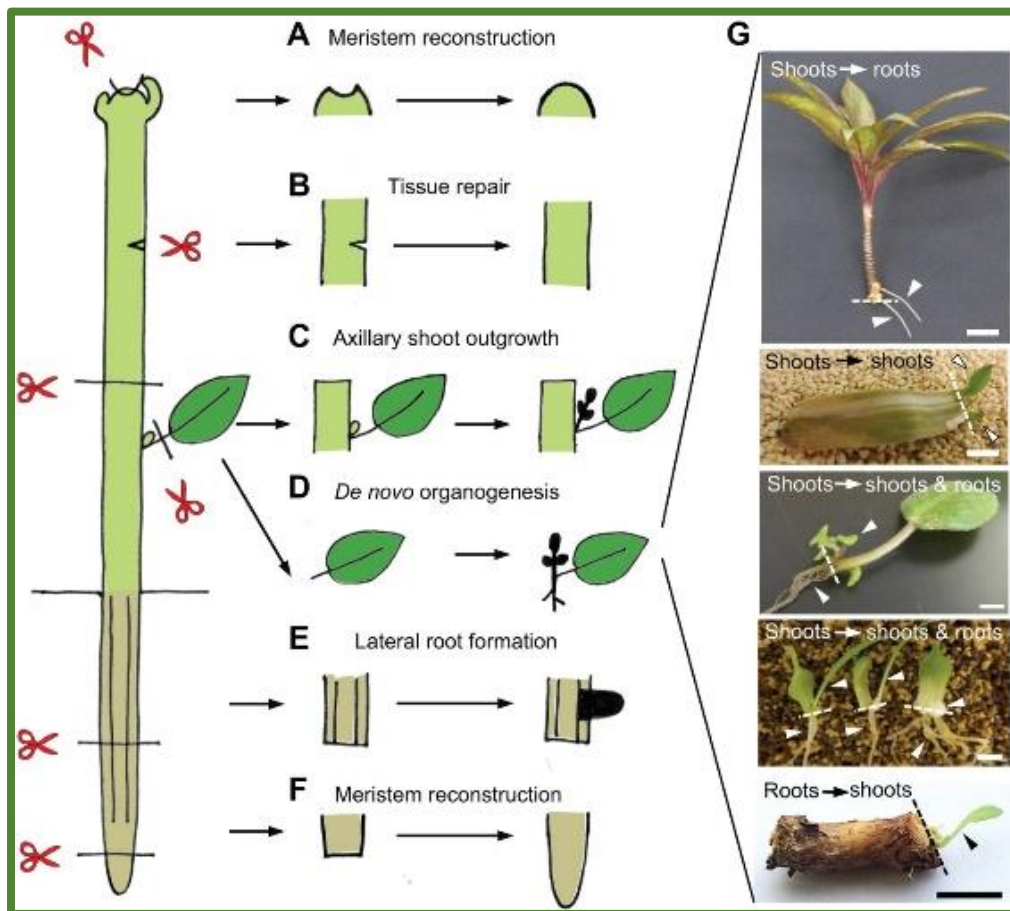


Figura 3. Diversas formas de regeneración de células vegetales a plantas completas, debido a la capacidad totipotente que éstas tienen (Ikeuchi et al., 2016).

De esta forma, la contribución más importante del CTV es demostrar la capacidad única que tienen las células vegetales de regenerar plantas completas a través de diferentes vías como lo son las rutas organogénicas y embriogénicas, independientemente del explante que sea manejado. Esta técnica potencializa la capacidad totipotente de las células vegetales para diferentes aplicaciones y facilidades biotecnológicas, como lo son el desarrollo de los cultivos alimentarios, micropropagación, eliminación de virus, conservación de germoplasma, producción de fitoquímicos y regeneración de plantas manipuladas genéticamente por recombinación genética (Bhojwani & Dantu, 2013). Los estudios mencionados son realizados en un tiempo mucho menor y bajo condiciones más controladas respecto a los métodos de cultivo tradicionales (Calva & Pérez, 2005).

2.2.1 Medios de cultivo.

El éxito del cultivo de tejidos vegetales depende en gran parte de la selección del medio de cultivo adecuado, donde se encuentran los nutrientes necesarios para que la planta o explante se desarrolle bajo condiciones *in vitro* tal como si se encontrara en suelo, destacando la inclusión de componentes inorgánicos y orgánicos, como lo son una fuente de carbono, vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento. De esta forma, el desarrollo del medio dependerá del propósito deseado para el cultivo celular, si éste será para la inducción de células no diferenciadas, embriogénesis somática, cultivo de anteras o proliferación de brotes (Smith, 2013).

En el medio de cultivo es indispensable la adición de un carbohidrato que brinde los requerimientos energéticos y estructurales (carbono, oxígeno e hidrógeno) de las células vegetales debido a la baja actividad fotosintética que presentan de manera *in vitro*, siendo la sacarosa el más utilizado para este fin en concentraciones de 2 a 3%, sin embargo, el uso de monosacáridos y otros materiales también son utilizados (Neumann et al., 2009).

Los requerimientos básicos de elementos minerales son potasio, calcio, magnesio, nitrógeno, fósforo y azufre, en concentraciones elevadas y son conocidos como macroelementos; paralelamente se necesitan elementos minerales en menor concentración tales como el hierro, manganeso, cobre, zinc, boro y molibdeno, conocidos

como micronutrientes, siendo ambos grupos absorbidos por las células vegetales en forma activa como iones. Específicamente, las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y el amonio, siendo el nitrógeno un elemento de gran importancia estructural en proteínas, mientras que los micronutrientes añadidos se utilizan como cofactores enzimáticos (Calva & Pérez, 2005).

Otro de los componentes nutritivos en mayor concentración es una mezcla de vitaminas como lo son timina, piridoxina y ácido nicotínico, ya que las células aisladas provenientes de las plantas no son capaces de producir la suficiente cantidad de estos compuestos, esenciales en el metabolismo de carbohidratos y nitrógeno (Neumann et al., 2009). Se destaca también el uso de un agente gelificante, cuando éste es necesario, el cual brinda la superficie sólida para el correcto cultivo del explante, complejos naturales, así como antibióticos y antifúngicos, que, en caso necesario, erradiquen contaminaciones bacterianas y fúngicas respectivamente (Smith, 2013).

Aunque los explantes tienen cierta cantidad de hormonas endógenas, naturalmente sintetizadas y que coordinan procesos esenciales para el desarrollo de la planta (figura 4), es necesario suplementarlos con reguladores de crecimiento de manera exógena con el fin de evocar reacciones celulares específicas que dirijan a ciertas respuestas fisiológicas, tales como diversos tipos de desarrollo y diferenciaciones morfogénicas. Estos reguladores son variados y probados en diferentes concentraciones y combinaciones en el medio de cultivo de acuerdo a la variedad de la planta, la naturaleza del tejido y la etapa del cultivo ya sea en iniciación del callo, inducción de embriogénesis, diferenciación de brotes, etc. (Calva & Pérez, 2005; Neumann et al., 2009; Bhojwani & Dantu, 2013).

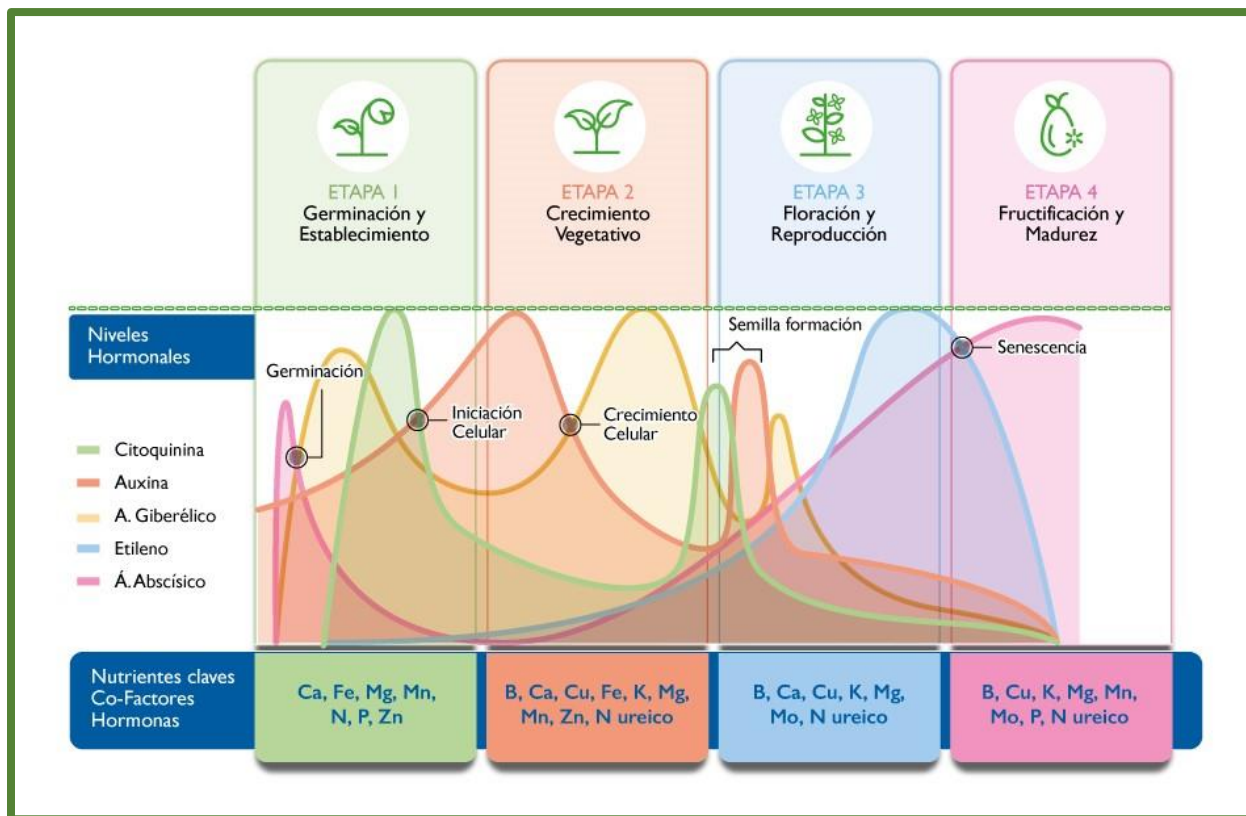


Figura 4. Presencia de las diferentes hormonas endógenas en las plantas a lo largo de su ciclo vital y los requerimientos nutrimentales en cada una de las fases (Stoller, 2004).

Los reguladores de crecimiento que más se utilizan en el CTV son las auxinas, citocininas y giberelinas. Las auxinas se encuentran naturalmente en las plantas en el proceso de elongación del tallo, internudos, dominancia apical y enraizamiento. En el cultivo de tejidos vegetales han sido utilizadas para inducir la división celular; a bajas concentraciones la iniciación del enraizamiento y en altas concentraciones la formación de callo (Smith, 2013). Comúnmente se utilizan auxinas como AIA, AIB, ANA y 2,4-D, siendo las dos primeras naturales y las últimas dos sintéticas. Particularmente, AIA, AIB y ANA son usadas para el enraizamiento y en combinación con citocininas, para la proliferación de brotes; por su parte el 2,4-D es efectivo para la inducción y desarrollo de callo, así como la inducción de embriogénesis somática (Bhojwani & Dantu, 2013).

Las citocininas son otro gran grupo de hormonas vegetales. En la naturaleza están presentes durante la división celular, la modificación de dominancia apical y diferenciación de brotes. Incorporadas en el medio de cultivo, se usan principalmente para desencadenar la división y proliferación celular, así como inducir la diferenciación

de brotes adventicios provenientes de callos y órganos. Las citocininas utilizadas comúnmente son Kinetina, BAP, 2iP, Zetina y TDZ. Por su parte, las giberelinas son menormente utilizadas, donde AG₃ es la más usada. Estas hormonas estimulan la elongación de internudos, desarrollo de meristemas, así como el desarrollo de embriones (Jordán & Casaretto, 2006).

Otras hormonas de importancia en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es el etileno y el ácido abscísico, las cuales son generadas durante la senescencia de las plantas. El etileno es producido por el envejecimiento debido a la exposición a altas temperaturas, oxidación, luz solar y radiación; generalmente inhibe el desarrollo y diferenciación, pero en algunos casos, promueve la embriogénesis somática. El ácido abscísico es un inhibidor del crecimiento, sin embargo, es requerido para el desarrollo normal y maduración de embriones somáticos (Jordán & Casaretto, 2006).

2.2.2 Citodiferenciación: Rutas morfogenéticas.

Con el refinamiento de las técnicas del cultivo *in vitro* y el descubrimiento de los reguladores de crecimiento ha sido posible establecer varios tipos de cultivos, empezando por los tejidos embrionarios, meristemáticos y maduros. En general, hay dos tipos de cultivos: desorganizados (callos y células en suspensión) y organizados (raíces, brotes y embriones) (Adamczuk et al., 2012). La efectiva regeneración de plantas completas a partir de explantes en cultivos o a partir de cultivos de callos (figura 5), es un paso vital en el éxito de la implementación biotecnológica enfocada en la mejora de las plantas. De igual forma, la obtención de plantas completas a partir de una cantidad mínima de células vegetales, es el objetivo central para el desarrollo de la ingeniería genética en vegetales (Smith, 2013).

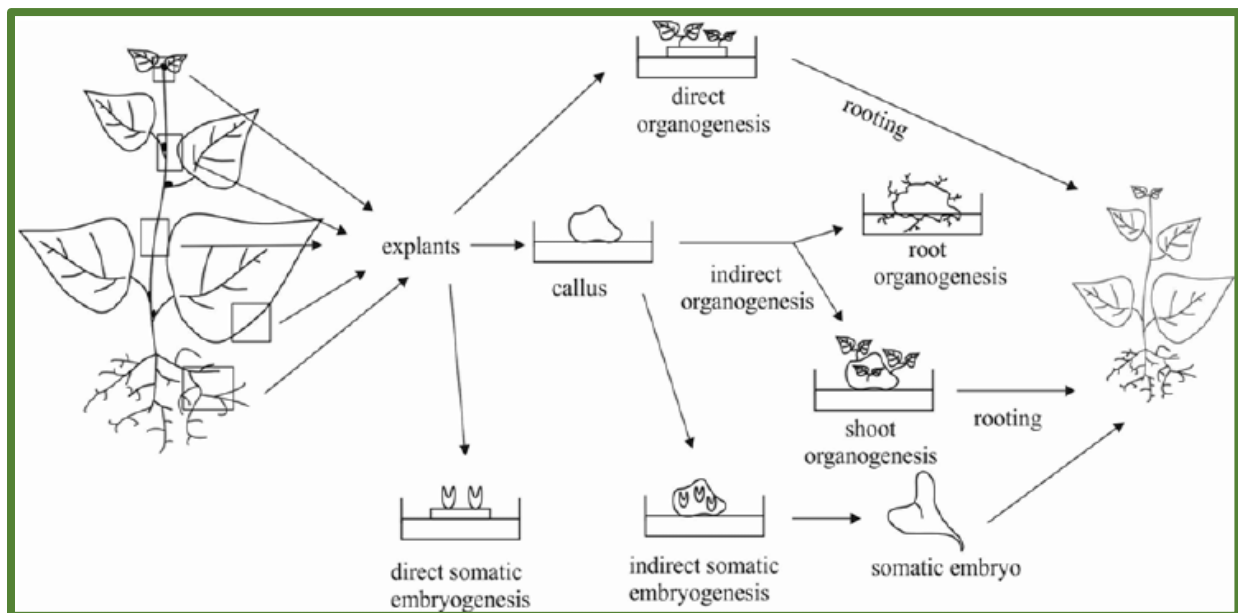


Figura 5. Rutas regenerativas de plantas a través del cultivo in vitro de tejidos vegetales (Adamczuk et al., 2012).

Un evento básico en el desarrollo de eucariotas es la especialización de las células, la cual es denominada como citodiferenciación, siendo uno de los objetivos principales del cultivo de tejidos vegetales el entendimiento de los eventos celulares y subcelulares fundamentales en la diferenciación de células especializadas. De esta forma, se comprenden algunos cambios asociados con la diferenciación vascular elemental y se funge como un mediador en la capacidad totipotente de las células vegetales a través de la diferenciación, estructura y funcionalidad especializada de las células somáticas y cigóticas de la planta (Adamczuk et al., 2012).

La regeneración de plantas a partir de células diferenciadas es generalmente precedida por células meristemáticas que siguieron divisiones para formar un callo de células indiferenciadas, en donde las células maduras se revierten a un estado meristemático, conocido como desdiferenciación, y otro como la regeneración a partir de callo, o en algunos casos, directamente de células meristemáticas preexistentes, conocido como rediferenciación (Ikeuchi et al., 2016).

Las células vegetales conservan el potencial de revertirse a un estado meristemático y formar un individuo nuevo bajo la exposición a condiciones favorables, independientemente de su especialización (Bhojwani & Dantu, 2013). Las regiones

meristemáticas pueden formarse dentro del callo y son capaces de formar brotes o raíces, considerándose una organogénesis indirecta debido a que la fase de callo es intermediaria a la regeneración. La organogénesis directa es la formación de regiones meristemáticas directamente de la célula o el explante, sin pasar por callo. Por su parte, la embriogénesis somática es un proceso por el cual las células somáticas (no gaméticas) se someten a una diferenciación para formar una estructura bipolar que contenga tanto una raíz como el eje de un brote. Los embriones somáticos son similares a los embriones cigóticos, con la capacidad de madurar y germinar como tales (Smith, 2013).

2.2.3 Cultivo de callos.

El callo es una masa irregular de tejido parenquimatoso, es decir, que conserva la capacidad de dividirse, además de tener zonas meristemáticas no diferenciadas que generen posteriormente órganos vegetales o embriones; éste carece de una estructura organizada, pero a menudo puede mostrar una diferenciación celular. La heterogeneidad celular del callo es derivada de los explantes multicelulares utilizados que se usan para inducirlo, mostrando variaciones aún dentro de callos que provienen del mismo explante; siendo compacto o friable, seco o húmedo, traslúcido o con cierta coloración (Bhojwani & Dantu, 2013; Smith, 2013).

La formación del callo se da a partir del procedimiento de aislamiento en donde el explante es herido, condición que estimula la división y proliferación del callo, siendo una respuesta a la herida formada que desencadena la dediferenciación y proliferación en los explantes sobre la región mencionada (Smith, 2013). Esta masa celular puede ser multiplicada como un tejido desorganizado por tiempo ilimitado a través de subcultivos periódicos en un medio fresco o induciendo su diferenciación en estructuras organizadas como raíces, brotes o embriones, a través de la manipulación del medio de cultivo, aunque debe destacarse que no todas las células contribuyen a la formación del callo y aún más, no todas las células son competentes para regeneran estructuras organizadas (Bhojwani & Dantu, 2013).

Para el inicio de los cultivos se prefiere utilizar tejidos que contengan células meristemáticas que se diferencian rápidamente en respuesta a los diferentes estímulos ambientales, fisicoquímicos y nutricionales. El cultivo de callos tiene entonces varias

aplicaciones; entre ellas es la de servir como material inicial para cultivos en suspensión, sistema para estudios morfogénéticos y fisiológicos, producción de metabolitos secundarios y generar variaciones somaclonales (Calva & Pérez, 2005).

2.2.4 Cinética de crecimiento en cultivos de callo.

La evaluación precisa de la cinética de crecimiento es esencial para el diseño de bioprocesos ingenieriles, sin embargo, la medida de los parámetros de crecimiento en los diferentes tipos de cultivos, así como la heterogeneidad en la morfología celular, aportan diversos problemas que deben ser dirigidos al uso de metodologías específicas para cada caso (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006). Con lo anterior, una curva de crecimiento puede ser establecida por diversos métodos para la caracterización de los cultivos vegetales. El primero es sacrificar cultivos a diferentes intervalos de tiempo, y tomar el peso húmedo y seco, siempre replicando y promediando los puntos establecidos para obtener los datos (Smith, 2013).

Otros métodos para evaluar la cinética de crecimiento en cultivos de células vegetales, además de los ya mencionados, son el volumen que ocupan las células, el conteo celular, así como densidad óptica, conductividad eléctrica, mediciones de pH, entre otras. En el caso del peso fresco muestra una excelente correlación en diferentes especies vegetales por cual puede ser utilizada para la cinética de crecimiento, sin embargo, el método tiene desviaciones importantes en la correlación cuando la célula entra a una fase estacionaria (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006).

La tasa de crecimiento de un cultivo de callo es similar en muchos casos a la curva sigmoidea vista en poblaciones de células aisladas en los organismos. En la curva de crecimiento usualmente existen cinco zonas, como se muestran en la figura 6. El comportamiento de las células del callo durante cada uno de las fases de desarrollo es diferente, siendo aquí donde el medio de cultivo influye en la permanencia de cada fase en particular (Smith, 2013).

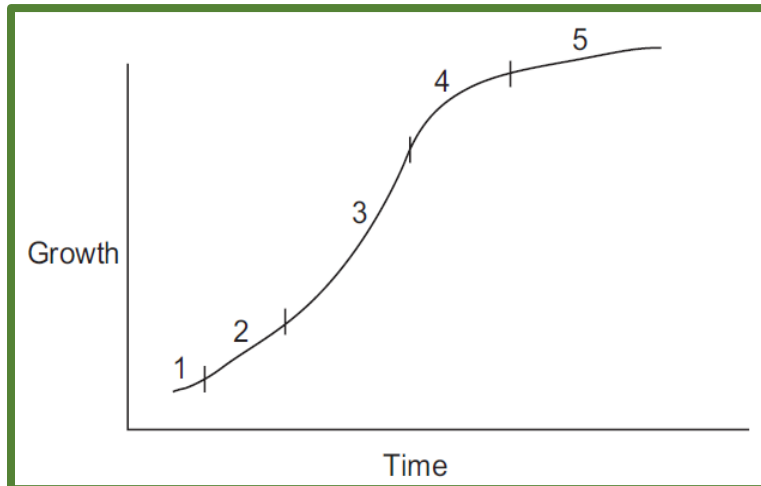


Figura 6. Esquema de la cinética de crecimiento de células vegetales: (1) Fase lag (preparación para división); (2) Fase exponencial de crecimiento (división celular máxima); (3) Fase lineal (crecimiento y desarrollo); (4) Desaceleración del crecimiento; (5) fase estacionaria (células sin división) (Smith, 2013).

En la cinética de crecimiento se indica la fase inicial donde las células se preparan para su división (fase lag), seguida de una fase exponencial y finalmente una fase estacionaria. El patrón que siguen las células refleja la actividad de división que éstas tienen. Durante la fase exponencial de desarrollo se tiene un incremento en el número de células, donde domina la capacidad de crecimiento de las mismas. Consecuentemente, el promedio del tamaño celular es reducido comparado con el explante original. Después, debido a una desaceleración de la actividad de división celular (reducción en el número de divisiones celulares por unidad de tiempo), las células cultivadas incrementan su tamaño en promedio y son similares, en tamaño, a las del explante de donde provenían siendo ésta la fase estacionaria (Neumann et al., 2009).

Para diferentes procedimientos experimentales, es necesario utilizar callos en un punto específico de su desarrollo dentro de la curva de crecimiento, tal es el caso de la fase exponencial en donde se detecta un mayor número de células en metafase al analizar los cromosomas de las células vegetales. Al entrar a la fase estacionaria, el cultivo debe transferirse a un medio fresco que le brinde nuevamente los nutrientes necesarios (Smith, 2013).

2.3 Transformación genética de cultivos vegetales.

Las plantas transgénicas o genéticamente modificadas se generan a partir de células vegetales a las que previamente se les introducen genes modificados o extraídos de otras especies como microorganismos, animales u otras especies vegetales completamente diferentes, englobando diversas técnicas de análisis genético. Debido a que las unidades químicas del ADN son iguales en todos los organismos, es posible transferir genes de uno organismo a otro, y controlar ciertas características deseadas en aquellos que naturalmente no las tienen, sin alterar otras características propias del organismo (Neumann et al., 2009). El incremento del uso de la ingeniería genética se ha dirigido para diversos fines, tales como la producción de fármacos y alimentos, así como la transformación de plantas de interés agrícola, con la finalidad de brindar resistencia a enfermedades, agroquímicos y condiciones ambientales extremas, además de aumentar la producción, rendimiento y calidad en los productos vegetales obtenidos (Calva & Pérez, 2005).

El paso inicial de la inserción del gene es sólo el principio de un largo proceso de ingeniería genética que envuelve la selección de las células transformadas, seguida de la regeneración de la planta y su respectiva aclimatación *ex vitro*. Si la planta llega a ser una variedad comercial, la planta transgénica y su progenie deberán ser sujetas a una serie de estudios moleculares para revisar su estabilidad genética y asegurar su desempeño junto a la calidad y seguridad del producto de manera que cumpla con las regulaciones y demandas del mercado. El conocimiento del cultivo de tejidos vegetales es de gran importancia para el éxito de la transformación genética ya que un sistema de regeneración bien establecido permite establecer plantas transgénicas a través de las diferentes vías regenerativas (Misra & Saema, 2016).

Se han utilizado principalmente dos métodos para insertar genes en células de plantas: (1) Vectores que insertan los genes deseados como son los mediados por *Agrobacterium*, agroinfección o vectores virales y (2) Transferencia directa de genes como lo son el bombardeo de micropartículas, microinyección, electroporación, PEG, liposomas, entre otros. De éstos, *Agrobacterium* y la biobalística (bombardeo de micropartículas) son los más usados y efectivos, sin embargo, también tienen ciertas limitaciones (Bhojwani & Dantu, 2013) teniendo problemas relacionados a la integración

estable y confiable del ADN, así como su expresión después de su introducción en las células vegetales (Misra & Saema, 2016). Independientemente de lo anterior, en ambos casos, las células que contienen la nueva información genética son crecidas dentro de condiciones de cultivo adecuadas, donde la embriogénesis somática puede desarrollar una nueva planta completa, funcional y con las características deseadas, como se observa en la figura 7 (Anami et al., 2013).

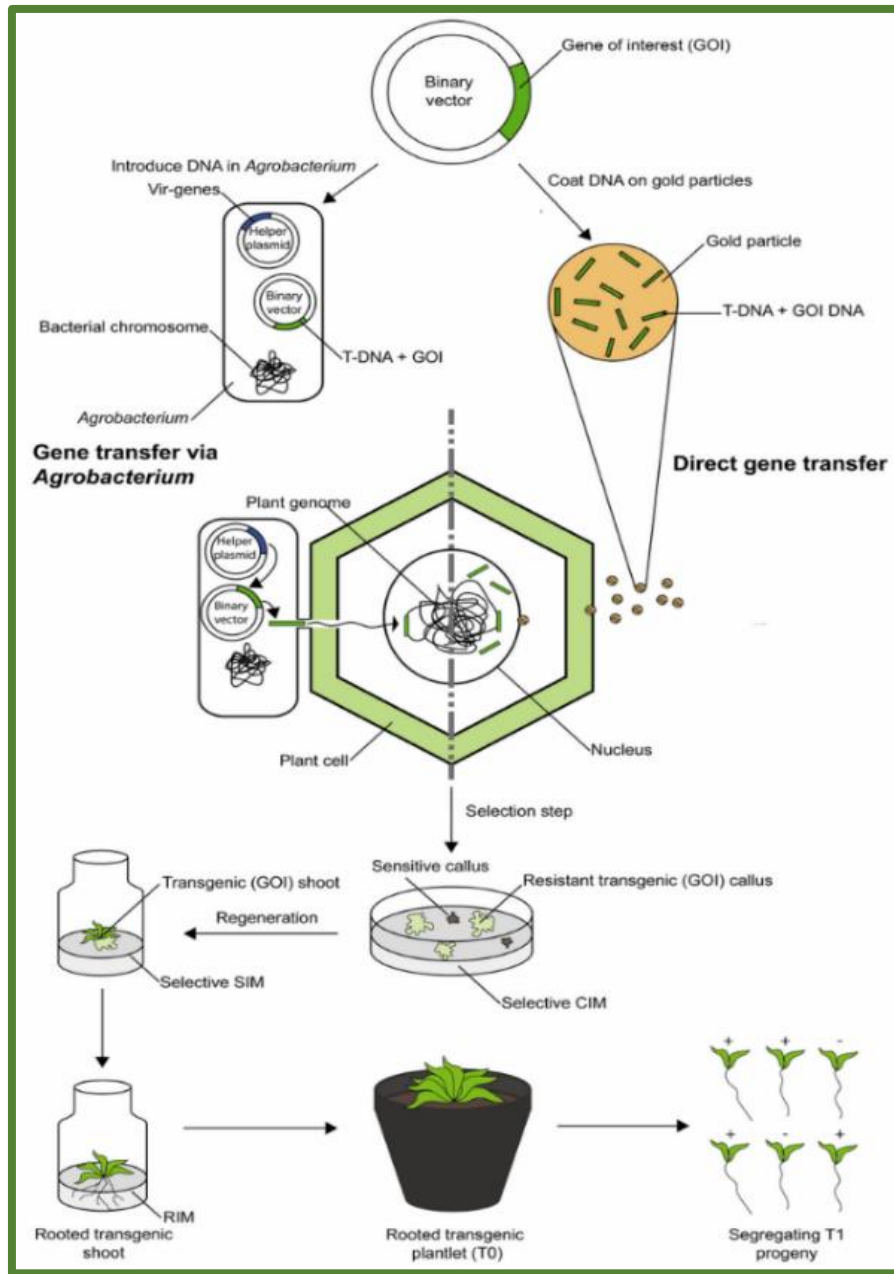


Figura 7. Técnicas de transformación genética mediadas por *Agrobacterium* y Biobalística, y la posterior regeneración de plantas (Anami et al., 2013).

2.3.1 Transformación genética por medio de biobalística

El método de biobalística de transferencia directa de genes fue inventado por John Sanford (Sanford, 2000) en el intento de superar las limitaciones de la transformación mediada por *Agrobacterium*. Esta tecnología es adaptable a un amplio intervalo de células y cultivos vegetales con una alta eficiencia de transformación. Básicamente, la técnica del bombardeo de partículas consiste en disparar partículas a una elevada aceleración en una cámara de vacío; las partículas son de un metal inerte (oro o tungsteno) y se recubren del ADN deseado para después ser internalizado en las células con la tecnología descrita. El gas más común que se utiliza en la cámara de biobalística para acelerar las partículas bajo una alta presión es helio, el cual es inerte y brinda un menor costo respecto al beneficio deseado (Sanford, 2000).

El bombardeo de partículas penetra la pared celular y llega directa o adyacentemente al núcleo, integrándose dentro de los cromosomas y llegando a permanecer añadido al genoma de la planta. La limitación del método de biobalística es la aleatoriedad de la integración del ADN externo al genoma de la planta, así como la cantidad elevada del número de copias introducidas. Los factores críticos para maximizar la eficiencia de la transformación por este sistema incluyen el tamaño y densidad de las micropartículas, la distancia entre las células y las micropartículas disparadas, la presión del gas inerte y el tiempo de precultivo del tejido (Bhojwani & Dantu, 2013).

2.3.2 Componentes moleculares para llevar a cabo la transformación genética.

Seguida la transformación genética por cualquiera de los métodos ya mencionados, generalmente sólo una pequeña parte de la población de células en el tejido son transformantes, siendo de gran importancia aplicar un sistema de selección eficaz que permita identificar las células transgénicas para su multiplicación y posterior regeneración (Neumann *et al*, 2009).

Cabe destacar que los genes insertados se manejan en su mayoría en plásmidos bacterianos (vector transformante), donde éstos últimos se encuentran ligados a la secuencia de interés bajo el control de promotores eucarióticos fuertes y funcionales en la planta. Los vectores también incluyen secuencias dianas para varias enzimas de restricción donde se inserta el gen deseado, así como un origen de replicación bacteriano

y un marcador procariótico seleccionable para el mantenimiento y selección del plásmido en la bacteria, siendo la figura 8 la que describe el vector en discusión (Carbonero, 1997).

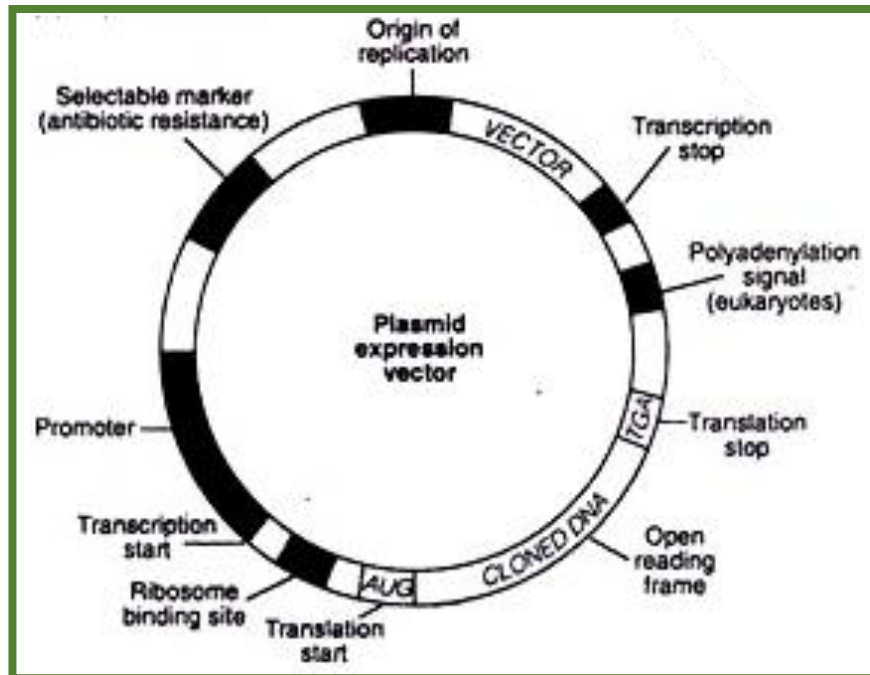


Figura 8. Mapa de un plásmido (vector de expresión) con las secuencias de un promotor, un marcador de selección, así como los inicios y términos de la replicación y transcripción. (Adita Raj, 2016)

Los marcadores, la mayoría de origen microbiano, han sido utilizados para identificar las células o plantas transformadas, clasificándose como (a) genes marcadores de selección y (b) genes reporteros o no selectivos. Particularmente estos marcadores presentan las siguientes características (Carbonero, 1997; Neumann et al., 2009):

1. Marcadores de selección: protegen al organismo de un agente selectivo en el medio de cultivo y permite el desarrollo celular, respecto a los que no están transformados, basándose en la resistencia a bajas concentraciones de antibióticos y codificando proteínas cuya actividad enzimática los degradan, o en el caso de herbicidas cuya detoxificación se encuentra relacionada a este marcador.
2. Marcadores visuales o reporteros: Muestran características distintas de las células no transformadas a las que sí lo están, al utilizar diferentes técnicas instrumentales o histoquímicas, facilitando la detección en un lapso corto de tiempo que se evalúa a las 24-48 horas después de la transferencia de ADN.

Los marcadores de selección que se utilizan con mayor frecuencia en plantas genéticamente modificadas son el gen de resistencia a kanamicina (neomicinofosfotransferasa II, *nptII*) y el gen de resistencia a higromicina (higromicinfosfotransferasa, *hpt*), los cuales inhiben la traducción de ARN en plantas no transformadas (Neumann et al., 2009). Algunos genes reporteros utilizados para identificar células transformadas son *gusA* (β -Glucuronidasa), *lux* (Luciferasa) y *gfp* (proteína verde fluorescente), en estos casos, las células transformadas no tienen ninguna ventaja selectiva sobre las células no transformadas, pero pueden ser separadas basándose en su identificación visual, instrumental o con un tratamiento especial, y ser nuevamente cultivadas (Bhojwani & Dantu, 2013).

2.3.3. Regeneración de células transformadas.

Generalmente, el producto deseado de la transformación genética es la regeneración de plantas que expresen el gen introducido. Por lo tanto, es importante que el explante seleccionado muestre un alto potencial de regeneración y un protocolo eficiente que logre este propósito debe ser desarrollado para obtener alguna ruta morfogénica en el cultivo *in vitro*. En células o callos aislados, donde la regeneración no está bien definida o no es posible, tejidos como explantes intactos (peciolos o un callo embriogénico) son utilizados para la regeneración de plantas transgénicas, sin embargo, la embriogénesis somática es la ruta más eficiente para evitar un mosaico genético, es decir, una planta que tenga células transformadas y no transformadas (Rose et al., 2010).

2.4 Cultivos *in vitro* de *Capsicum annuum* L.

Los reportes de organogénesis directa e indirecta para *Capsicum annuum* L. son muy variados, destacando el primer estudio realizado en 1978 por Gunay y Rao donde obtuvieron la regeneración vía organogénesis indirecta a partir de hipocótilo y cotiledón como explantes. En la tabla 3 se muestra una revisión bibliográfica para la ruta organogénica en donde la mayoría de la literatura se basa en la regeneración directa a partir de hipocótilo y cotiledones a través de sales MS (100%) tanto para la inducción y elongación de los brotes obtenidos; para la inducción se utilizan concentraciones elevadas de BAP en combinación con auxinas determinadas, y en la elongación se baja

la concentración de BAP. Reportes que también regeneraron órganos de *Capsicum annuum* L. utilizaron TDZ como citocinina (Dabauza & Peña, 2001; Venkataiah et al., 2006). Se destaca de esta revisión bibliográfica que sólo Arous et al., 2001 y Dabauza & Peña, 2001, utilizaron el explante de embriones cigóticos, sin embargo, estos experimentos se realizaron por medio de organogénesis directa.

De forma paralela, los reportes para la regeneración de embriogénesis somática fueron analizados, destacando que para la obtención de plantas genéticamente modificadas esta vía brinda plantas que son menos propensas a tener un mosaico genético en su estructura o la incorporación de genes que no son de interés durante la división meiótica, por lo cual las características deseadas se conservan por mayor respecto a los protocolos de rutas organogénicas (Freire, 2003).

La embriogénesis somática ha sido estudiada con el reporte de Harini & Lakshmi (1993) donde se desarrollaron embriones somáticos directos, sin pasar por callo, a partir de embriones cigóticos inmaduros, destacando el medio para inducción presentado en la tabla 4. Tras la implementación del protocolo de Harini & Lakshmi en 1993, Binzel y colaboradores probaron en 1996 diversos reguladores de crecimiento en combinación con agua de coco, concluyendo que el protocolo de Harini & Lakshmi es el adecuado y no requiere la adición de TDZ o ANA para el desarrollo de estructuras globulares. Cabe destacar que, en estos dos protocolos, una vez obtenidas las estructuras globulares embrionarias, su desarrollo se realizó en presencia de Sacarosa (2%) y AG₃ (1 mg/L).

Jo y colaboradores confirmaron en 1996 el uso de 2,4-D probado anteriormente (Harini & Lakshmi, 1993 y Binzel et al., 1996), y en futuros estudios (Buyakalaca & Mavituna, 1996; Kintizios et al., 2000; Bodhipadma & Leung, 2002; Kaparakis & Alderson, 2008 y Aboshama, 2011), como un regulador que permite desarrollar embriones somáticos ya sea en tejidos o callos, siendo entonces la vía regenerativa de embriogénesis somática dependiente de la auxina 2,4-D en una concentración de 2 mg/L. Comparativamente, a partir de los estudios de Harini & Lakshmi, 1993 y Binzel et al., 1996, el uso de sacarosa en concentraciones elevadas para la inducción de embriones somáticos, en la mayoría de los reportes, ha sido indispensable para la obtención de los resultados mostrados en la tabla 4.

Tabla 3. Revisión bibliográfica para la regeneración de *Capsicum annum* L. a través de rutas organogénicas.

Explante	Vía de regeneración	Medio de inducción	Medio de germinación	Información adicional	Referencia
Cotiledón e hipocótilo	Organogénesis indirecta	MS (100%) + AIA (1 mg/L) + BAP (2 mg/L)	MS (100%) + AIA (0.5 mg/L) + BAP (2 mg/L)	Se experimentó la organogénesis indirecta combinando citocininas y auxinas, donde 2,4-D inhibió la formación de brotes, mientras que BAP y AIA sí formaron brotes.	(Gunay & Rao, 1978)
Ápice, cotiledón e hipocótilo	Organogénesis indirecta	MS (100%) + 2,4-D (1 mg/L) + BAP (0.5 mg/L)	MS (100%) + BAP* (4 a 2 mg/L) + AG ₃ * (2 a 1.0 mg/L)	El mejor explante fue cotiledón. No hubo respuesta organogénica de los explantes después de 2 semanas en 2,4-D.	(Berljak, 1999)
Cotiledón	Organogénesis directa	MS (100%) + BAP** (5 a 7 mg/L) + PAA (2 mg/L)	MS (100%) + BAP** (2 a 5 mg/L) + PAA (2.0 mg/L)	Se destaca el uso de PAA como un mejor complemento en sinergia con BAP para la regeneración.	(Husain et al., 1999)
Hipocótilo de embrión cigótico maduro	Organogénesis directa	MS (100%) + BAP (5 mg/L) + ANA (1 mg/L)	MS (100%) + BAP (1 mg/L) + ANA (0.5 mg/L) + AG ₃ (0.5 mg/L)	Se discute la influencia de BAP respecto a otros reguladores.	(Arous et al., 2001)
Embriones cigóticos maduros	Organogénesis directa	MS (100%) + TDZ (2 mg/L)	MS (100%) + TDZ (0.5 mg/L) + AG ₃ (10 mg/L)	Se probaron ocho variedades de <i>C. annum</i> L. y el efecto de varios explantes en la formación de brotes.	(Dabauza & Peña, 2001)

<i>Meristemo apical</i>	Organogénesis directa	MS (100%) + TDZ (1 mg/L)	MS (100%) + BAP (0.05 mg/L) + AIA (0.9 mg/L)	Se probaron diferentes citocininas. Cuando se definió TDZ, se elongó en AG ₃ y KIN sin resultado positivo.	(Venkataiah et al., 2006)
<i>Cotiledón</i>	Organogénesis directa	MS (100%) + BAP (5 mg/L) + PAA (2 mg/L)	MS (100%) + BAP (3 mg/L) + AG ₃ (0.2 mg/L)	Se estudió el efecto del CuSO ₄ en la formación de brotes, donde 0.5 mg/L es la concentración más eficiente en inducción y elongación.	(Joshi & Kothari, 2007)
<i>Hoja, cotiledón e hipocótilo</i>	Organogénesis directa	MS (100%) + BAP (2 mg/L) + AIA (2 mg/L)	MS (100%) + AIA** (0.5 a 1 mg/L) + AIB** (0.5 a 1 mg/L)	Los mejores explantes fueron hoja y cotiledón. Se probaron 3 especies de las que se derivaron 6 variedades.	(Sanatombi & Sharma, 2008)

Nota: () En este experimento el regulador de crecimiento estuvo a una concentración inicial y al siguiente subcultivo se bajó su concentración con la finalidad de obtener una elongación más eficiente. (**) En estos experimentos los reguladores de crecimiento, en la concentración reportada, no presentaron diferencias significativas ya sea en la inducción o elongación, por lo cual ambas concentraciones brindan resultados similares.*

Tabla 4. Revisión bibliográfica para la regeneración de *Capsicum annuum* L. a través de rutas embriogénicas.

Explante	Vía de regeneración	Medio de inducción	Medio de germinación	Información adicional	Referencia
<i>Embriones cigóticos inmaduros</i>	Embriogénesis somática directa.	MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (10%) + CW (10%)	MS (100%) + Sac. (2%) + AG ₃ (1 mg/L)	Obtención de embriones 15 días después del cultivo. Maduración en medio de inducción.	(Harini & Lakshmi, 1993)
<i>Embriones cigóticos inmaduros</i>	Embriogénesis somática directa.	MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (8-10%) + CW (10%)	MS (100%) + Sac. (2%) + AG ₃ (1 mg/L) + AgNO ₃ (1.5 mg/L)	Obtención de estructuras globulares dentro de 15-20 días. Se probó TDZ y ANA, pero no fueron eficientes. Probada en dos variedades.	(Binzel et al., 1996)
<i>Embriones cigóticos inmaduros</i>	Embriogénesis somática directa	MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (diversas concentraciones) + incubación en oscuridad.	MS (25%) + 2,4-D (0.5 mg/L) + Carbón activado (0.5%) + Sac. (3%) + ABA (0.5 mg/L)	Existe una dependencia en la embriogénesis somática respecto a la concentración de 2,4-D.	(Jo et al., 1996)
<i>Embriones cigóticos maduros</i>	Embriogénesis somática indirecta	Callo embriogénico: MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (3%) Incremento de callo (medio líquido): MS (100%) + 2,4-D (1 mg/L) + Sac. (3%)	MS (50%) + ABA (0.5 mg/L)	La maduración de los embriones se llevó a cabo con un 97% de eficiencia.	(Buyakalaca & Mavituna, 1996)
<i>Hojas jóvenes.</i>	Embriogénesis somática indirecta.	Callo embriogénico: MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + BAP (0.3 mg/L) + Sac. (8%)	MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + BAP (0.3 mg/L) + Sac. (3%)	Después de cuatro semanas, los callos embriogénicos se pasaron a germinación.	(Kintzios et al., 2000)

<i>Embriones cigóticos inmaduros</i>	Embriogénesis somática directa	MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (10%)	MS (100%) + Sac. (2%) + AG ₃ (1 mg/L)	Se eliminó CW. Se probaron diferentes carbohidratos, el mejor fue sacarosa.	(Bodhipadma & Leung, 2002)
<i>Embriones cigóticos maduros</i>	Embriogénesis somática indirecta	Formación de callo: MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (3%) Inducción de embrión: MS (100%) + L-prolina (6 g/L) + NH ₄ NO ₃ (10 mM) + Sac. (3%)	MS (50%) + ABA (0.5 mg/L) + Sac. (3%)	Se deben de realizar subcultivos y pretratamientos en el procedimiento de regeneración para este explante.	(Bodhipadma & Leung, 2002)
<i>Tallo y meristemo apical</i>	Embriogénesis somática directa	MS (100%) + TDZ (0.1 mg/L)	MS (100%) + AIB (0.2 mg/L)	Se obtuvieron más embriones en tallo.	(Khan et al., 2006)
<i>Microspora</i>	Embriogénesis somática directa	NLNS (100%) + Sac. (9%) + KI (0.82 mg/L)	B5 (100%) + Sac. (2%)	Se probó sacarosa y maltosa (6, 9 y 12%) y el mejor resultado fue para Sac. 9% en la inducción de embriones.	(Kim et al., 2008)
<i>Embriones cigóticos inmaduros</i>	Embriogénesis somática directa	MS (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (10%) + CW (10%)	MS (100%) + Sac. (2%) + AG ₃ (1 mg/L)	La adición de agua de coco no fue significativa para el desarrollo de embriones.	(Kaparakis & Alderson, 2008)
<i>Hipocótilo</i>	Embriogénesis somática directa	Germinación: MS (100%) + Sac. (3%) Inducción de embriones: MS ó WPM (100%) + 2,4-D (2 mg/L) + Sac. (8%) + AgNO ₃ (1 mg/L) + L-glutamina (200 mg/L) + Caseína hidrolizada (500 mg/L)	MS (50%) + Sac. (3%) ABA (0.1 mg/L) + L-glutamina (200 mg/L) + Caseína hidrolizada (500 mg/L)	El mejor medio fue WPM en la inducción de embriones somáticos. En la germinación de los embriones regenerados, las sales MS al 50% dieron mejores resultados.	(Aboshama, 2011)

2.5 Antecedentes directos y justificación para el cultivo *in vitro* de chile serrano.

Los trabajos e investigaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* de *Capsicum annuum* L. son muy variadas, teniendo como propósito principal la regeneración y transformación de esta especie para diferentes aplicaciones de interés farmacéutico, alimentario y agrícola, utilizando como herramienta principal el cultivo de tejidos vegetales. Si bien diversos artículos, como los discutidos en la sección 2.4, han obtenido la regeneración de *Capsicum annuum* L. a través de diversas rutas morfogénicas, no se muestra una consistencia clara entre ellos, debido a la recalcitrancia intrínseca que tiene esta especie dentro de cultivos *in vitro*, por lo cual no se ha determinado en su totalidad un protocolo general para la regeneración y, consecuentemente, la obtención de plantas modificadas genéticamente.

Es entonces que este trabajo busca elucidar, con base en las investigaciones realizadas previamente por el grupo del Laboratorio 116 de la Facultad de Química (UNAM) así como en publicaciones nacionales e internacionales, una metodología que permita la regeneración y obtención de plantas genéticamente modificadas de *Capsicum annuum* L. (chile serrano) a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, permitiendo que en un futuro el protocolo sea reproducible dentro de la variedad estudiada, integrando finalmente los conocimientos previos de los trabajos de esta línea de investigación para generar y propagar una línea de plantas de chile serrano que tengan las características deseadas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

- Establecer un protocolo para la regenerar y transformar plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) utilizando cultivos *in vitro*, probando diferentes vías regenerativas a través del explante de embrión cigótico al experimentar con diferentes medios de cultivo, así como diferentes condiciones para la transformación genética.

3.2 Objetivos particulares.

- Establecer cultivos asépticos de plantas de chile serrano.
- Seleccionar el mejor medio de cultivo para inducir y proliferar callo a partir de embriones inmaduros.
- Caracterizar a través de una cinética de crecimiento el callo proliferado para la transformación genética por biobalística.
- Determinar la influencia de BAP sobre la diferenciación y regeneración del callo.
- Inducir una vía regenerativa embriogénica a partir de diferentes medios de cultivo con una concentración de sacarosa elevada (8%) y 2,4-D (2 mg/L) utilizando embriones cigóticos maduros como explante.
- Determinar la concentración letal de higromicina-B como agente de selección para callos y nudos de plantas de chile para su futura transformación genética.
- Observar la transformación genética de callos y embriones cigóticos a través de la expresión transitoria de GFP mediante microscopia confocal.

IV. HIPÓTESIS

- Si la obtención de plantas genéticamente modificadas de *Capsicum annuum* L. por medio de cultivos *in vitro* depende del tipo de explante, el medio de cultivo y las condiciones de transformación genética, entonces la adecuada selección de estos factores permite obtener un protocolo adecuado y reproducible para futuras investigaciones.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diagrama general.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (116), perteneciente al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. La estrategia seguida durante el desarrollo experimental se presenta en la figura 9.

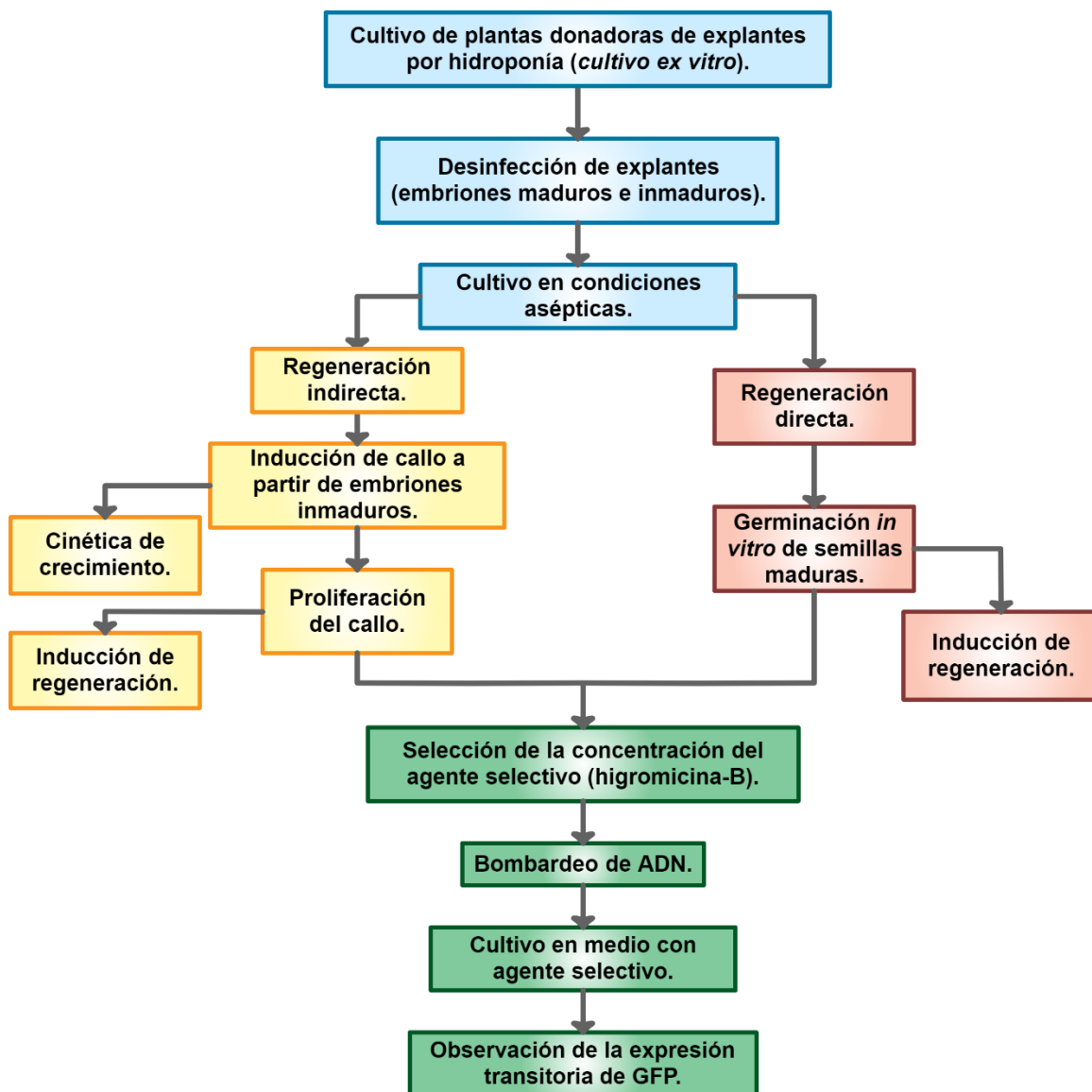


Figura 9. Diagrama de flujo experimental para la regeneración y transformación genética de chile serrano (*Capsicum annuum* L.)

De manera general, como muestra la figura 9, la metodología experimental consistió en cuatro etapas: inicialmente se cultivaron las plantas donadoras y una vez obtenido el explante deseado (embrión maduro o inmaduro) se procedió a desinfectarlos y cultivarlos en condiciones asépticas dentro de los medios específicos, ya sea para la regeneración directa o indirecta.

Dentro de la regeneración indirecta, el procedimiento requirió la inducción de un callo para su posterior proliferación y caracterización, además de inducir la vía regenerativa. La regeneración directa consistió en la germinación de semillas maduras en condiciones asépticas y consecuentemente la inducción de embriogénesis somática directa.

La última etapa fue la transformación genética, en donde en ambos experimentos se determinó la concentración letal de higromicina-B para el callo y las plantas de chile serrano, siendo el mejor resultado utilizado para seleccionar los tejidos vegetales que sí lograron transformarse correctamente a través del bombardeo de ADN, para finalmente comprobar en éstos la expresión transitoria del gen reportero (GFP).

5.2 Material biológico.

Se utilizaron semillas y plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) variedad Tampiqueño-74, de la comercializadora de semillas estadounidense "ITSCO", con lote 11E0486108432W2 y una pureza del 99.0%. Las semillas fueron utilizadas tanto maduras como inmaduras; tomadas directamente del empaque y provenientes de frutos verdes cultivados bajo condiciones *ex vitro*, respectivamente.

Los plásmidos (vectores de expresión) utilizados para la transformación genética fueron dos: el plásmido 1 (*pCAMBIA1302::FBP::GFP*) y el plásmido 2 (*pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP*), cuyos esquemas se pueden observar en el anexo I. Éstos fueron proporcionados a una concentración de 1 µg/µl por el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y su equipo de investigación, pertenecientes al laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

5.3 Establecimiento de cultivos *ex vitro*.

La germinación *ex vitro* se realizó con la finalidad de obtener frutos y semillas inmaduras, a través del cultivo bajo el sistema de hidroponía. Las semillas se remojaron en AG₃ (1 mg/L) por 24 horas para su posterior siembra en macetas con sustrato inerte (agrolita 100%) previamente esterilizada a 121°C (1.2 psi/18 min). El riego se realizó cada tercer día, y una vez que emergieron las hojas verdaderas, semanalmente se regó con una solución hidropónica, la cual fue adquirida en el taller de hidroponía, Facultad de Ciencias, UNAM.

La composición del fertilizante hidropónico es la siguiente: Nitrógeno (203 ppm), Fósforo (50 ppm), Potasio (236 ppm), Calcio (200 ppm), Magnesio (48 ppm) además de contenes todos los microelementos necesarios. Las sales se disolvieron a razón de 2.3 g/L en agua desionizada.

5.4 Establecimiento de cultivos *in vitro*.

De forma general, para la obtención de células transgénicas se siguieron dos vías: la regeneración directa e indirecta. Los explantes utilizados fueron semillas maduras e inmaduras, con tratamientos específicos según el experimento.

5.4.1 Método de desinfección.

Se siguió la metodología del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales para la especie *Capsicum annuum* L. propuesta por Zaragoza en 2016, destacando que los volúmenes utilizados de agua y agentes desinfectantes se añadieron de tal forma que los explantes quedaran cubiertos con la solución sin que fuera excesivo. La desinfección (figura 10) consistió en un enjuagar los explantes (semillas o frutos) con la cantidad suficiente de EtOH al 70% (v/v) por 1 minuto como disolvente de grasas y aceites, después se realizó un enjuague con agua estéril. Posteriormente, los explantes se lavaron con NaClO al 35% (v/v), de una solución stock de Clorox con NaClO al 5.40% como antiséptico y germicida, y Tween-20 como surfactante (2 gotas/250 mL) durante 15 minutos con agitación constante. Finalmente, se enjuagaron los explantes con agua estéril hasta que no se observara la espuma generada por el surfactante.

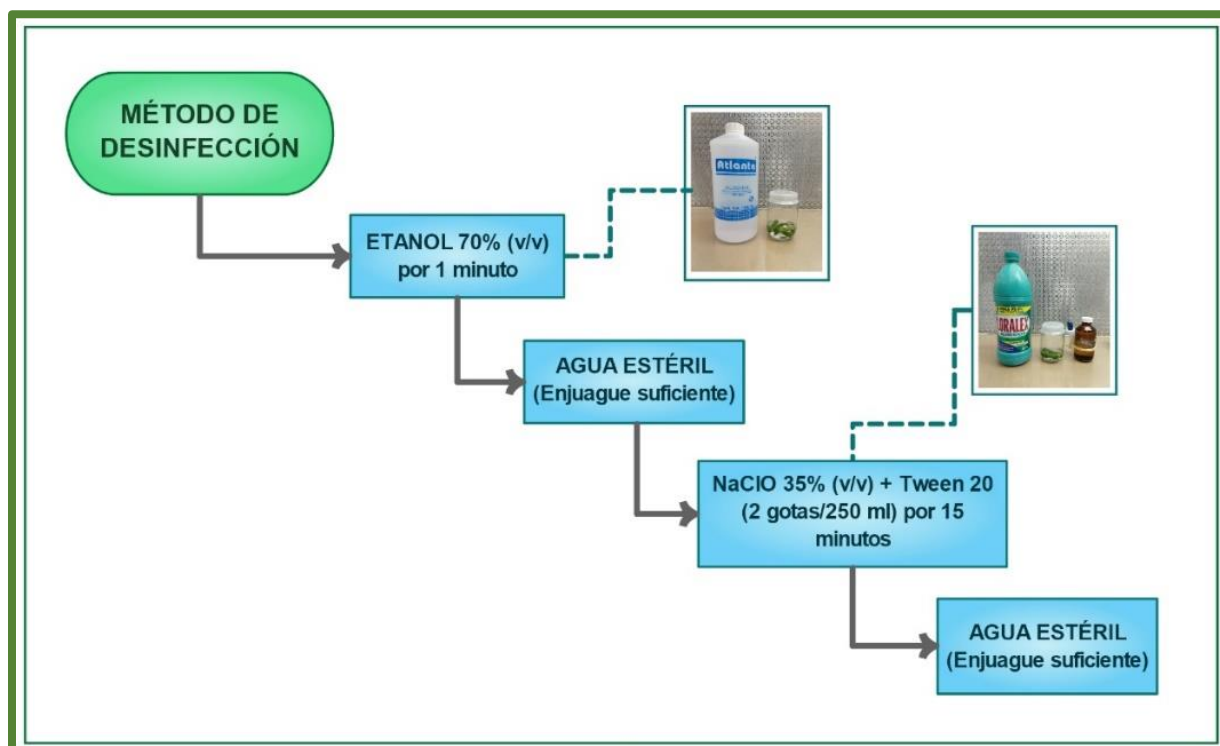


Figura 10. Método de desinfección para la implementación de cultivos asépticos *in vitro* de los explantes de *Capsicum annum L.*

5.4.2 Medios de cultivo y condiciones de incubación.

Los medios de cultivo fueron preparados a partir de soluciones stock (100x) de sales inorgánicas y reguladores de crecimiento, además de añadir diferentes componentes orgánicos como vitaminas, aminoácidos, bases nitrogenadas y carbohidratos, a diferentes concentraciones según se requiriera. Una vez mezclados estos componentes, el pH se ajustó a 5.7 utilizando HCl (0.1 N y 1.0 N) o NaOH (0.1N y 1.0 N) como fuera necesario y después se añadió un agente gelificante (gelzán). Los medios generales utilizados se presentan en la tabla 5, donde consecuentemente fueron modificados según se requiriera en cada experimento. Los macro y micro nutrientes de las sales en cuestión se pueden revisar en el anexo II del presente trabajo.

Tabla 5. Medios de cultivo generales utilizados en los experimentos del cultivo in vitro de <i>Capsicum annuum</i> L.		
Componentes	MS sin hormonas	N6P
Sales	MS 100%	N6 100%
Sacarosa	3%	
Vitaminas	R2 100%	Coctel 20 100%
Glicina	2.0 mg/L	0
Adenina	0	10 mg/L
2,4-D	0	2.0 mg/L
BAP	0	0.3 mg/L
Prolina	0	2.5 g/L
Caseína hidrolizada	0	200 mg/L
Gelzan	3.0 g/L	
PVP	1 g/L	

El agente gelificante se agregó a razón de 3.0 g/L de forma general, y para los medios de cultivo en donde se bombardeó el material biológico en una concentración de 3.5 g/L. En el caso de que no se añadiera un compuesto termolábil, el agente gelificante se hidrató a la mitad del volumen total del medio a elaborar y se calentó en un microondas (1 min/100 mL de medio de cultivo), para posteriormente mezclarlo con los demás componentes y servirlo en frascos estériles, finalizando el proceso al esterilizar el medio gelificado en una autoclave vertical a 121°C (1.2 psi/18 min). En caso contrario, si se añadía algún compuesto termolábil (antibióticos, agentes selectivos, etc.), la adición del gelificante se realizó directamente en la mezcla de los demás componentes y el volumen total se esterilizó en una autoclave vertical a 121°C (1.2 psi/18 min), posteriormente cuando el medio de cultivo alcanzó 40°C aproximadamente se añadió el compuesto termolábil, y una vez homogeneizado el medio éste se sirvió en frascos estériles. Todo este procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar y en condiciones asépticas.

Todos los cultivos se mantuvieron en incubación en un cuarto de ambiente controlado, a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad, en recipientes adecuados respecto al volumen que los cultivos ocuparan. Adicionalmente, los cultivos de plantas y callos se pasaron cada tres semanas a un medio fresco, conociendo esta operación como subcultivo, eliminando durante esta operación todo aquel tejido oxidado o en malas condiciones.

5.4.3 Germinación *in vitro* de semillas.

Las semillas maduras, una vez desinfectadas, fueron puestas sobre un medio con sales MS (Murashige & Skoog, 1962), Glicina (10 mg/L) y vitaminas R2 para determinar el porcentaje de germinación, bajo la presencia de la fitorregulador AG₃, así como en ausencia de éste, con la finalidad de estimular la germinación y contar con el mayor número posible de plántulas para experimentos posteriores. Fueron incubadas en las condiciones ya mencionadas de la sección 5.4.2 y los datos se tomaron cada tercer día hasta el día 18.

5.5 Regeneración indirecta.

La inducción de callo se llevó a cabo a partir de embriones cigóticos inmaduros, tomados como explante de frutos verdes de edades distintas y provenientes de las plantas cultivadas en el sistema de hidroponía.

5.5.1 Inducción de callo.

En condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo laminar, se disectaron los frutos de chile serrano (figura 11) que contenían en su interior las semillas inmaduras para que, consecuentemente, los embriones inmaduros fueran expuestos al retirar la testa que los protege. Cabe destacar que se utilizaron frutos en diversas etapas de desarrollo y provenientes de diferentes plantas, por lo cual en este experimento no se estandarizó la formación de callo respecto a la etapa de desarrollo del embrión.



Figura 11. Disección de los embriones cigóticos inmaduros de chile serrano en condiciones asépticas.

Una vez extraídos los embriones cigóticos inmaduros, se cultivaron en dos medios generales con la adición de reguladores de crecimiento para la inducción de callo: el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) (Tabla 5) mas 2,4-D (1 mg/L), BAP (0.3 mg/L), ANA (1 mg/L) y AIA (1 mg/L), describiéndose como medio B+, y el medio N6P (Chu et al., 1975) (Tabla 5) con 2,4-D (2 mg/L), BAP (0.3 mg/L), adenina (10 mg/L), caseína hidrolizada (200 mg/L), L-prolina (2.5 g/L) y vitaminas “Coctel 20” que no se detalla su composición y concentración debido a que se encuentra en proceso de patente. Se evaluó cualitativamente a través de observaciones cada tercer día, eligiendo el medio que generó un callo con menor oxidación y se desarrolló en un volumen considerable respecto del otro.

5.5.2 Proliferación y evaluación del crecimiento de callos.

El posterior cultivo *in vitro* de los callos celulares se realizó sobre el medio de cultivo N6P, a través de la metodología descritas por Mineo (1990) para el subcultivo de callos celulares. Los callos una vez desarrollados se subcultivaron cada cuatro semanas, incubándose en un cuarto de ambiente controlado, como se describió anteriormente en la sección **5.4.2**.

La evaluación del crecimiento fue determinada con una cinética de crecimiento durante 21 días realizando cinco repeticiones donde inicialmente se pesaron 0.5 g de callo para cada repetición, midiendo cada tercer día el peso fresco de éstos en el medio N6P. Finalmente se graficó el promedio de estas cinco muestras en cada día de toma de muestra, utilizando el programa Excel 2013 de la paquetería Office.

5.5.3 Inducción de la vía regenerativa

Una vez que se obtuvo la suficiente cantidad de callo proveniente del medio N6P, se procedió a inducir la vía regenerativa de éstos al probar diferentes reguladores de crecimiento. Los callos que se indujeron a la vía regenerativa indirecta fueron expuestos a los medios y reguladores de crecimiento mostrados en la tabla 6, donde cada subcultivo se realizó cada tres semanas, teniendo con anterioridad 6 subcultivos en medio N6P.

La evaluación de la vía regenerativa se realizó cualitativamente, comparando visualmente la diferenciación celular respecto al tratamiento control al que no se le modificaron las sales y reguladores de crecimiento, siendo éste el Tratamiento 2-a.

Tabla 6. Medios de cultivo probados para la regeneración indirecta de plantas de *Capsicum annuum* L. utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (mg/L).

Tratamientos	Subcultivo	% cultivos	Medio de cultivo	Auxina (2,4-D)	Citocininas (BAP)	Giberelinas (AG ₃)
Tratamiento 1	7	100%	N6P	0	0	
	8					
	9a y 10a	50%	MS	0	0	
	9b y 10b				4	
Tratamiento 2	7	100%	N6P	2	0.3	
	8					
	9a y 10a	50%	MS	0	4	
	9b y 10b				4	
Tratamiento 3	7	100%	N6P	1	3	
	8			0.5		
	9a y 10a	50%	MS	0	3	
	9b y 10b				4	
Tratamiento 4	7	100%	N6P	0	3	
	8					
	9a y 10a	50%	MS	0	3	
	9b y 10b				4	
Tratamiento 5	7	100%	N6P	0	3	3
	8					0
	9a y 10a	50%	MS	0	0	3
	9b y 10b				3	0

Nota: En el noveno subcultivo se dividieron los frascos y un 50% (a) pasaron a un medio y el otro 50% (b) se pasó a otro medio diferente, según lo descrito en la presente tabla.

5.6 Regeneración directa.

Con base en la revisión bibliográfica de la sección 2.4, se propuso un experimento que combinó diversas condiciones para la embriogénesis somática directa a partir de embriones cigóticos maduros, siendo las siguientes: dos medios diferentes MS (Murashige & Skoog, 1962) y WPM (Lloyd & Mc Cow., 1980), compuestos orgánicos (vitaminas R2, agua de coco y caseína/glutamina) y el tamaño del explante utilizado.

5.6.1 Germinación *in vitro* de semillas para regeneración directa.

Se germinaron semillas maduras de *Capsicum annuum* L. para este experimento, desinfectando previamente las semillas a través del método de la sección 5.4.1 y germinando en un medio MS (Murashige & Skoog, 1962) sin hormonas, esto último para no influir en el sistema hormonal endógeno de la planta y evitar así un sesgo en el experimento.

5.6.2 Inducción de embriogénesis somática.

La inducción consistió en poner sobre diferentes medios de cultivo embriones cigóticos madurados, los cuales se germinaron previo al experimento por 10 días, presentando desarrollos diferentes a pesar de haberse cultivado bajo las mismas condiciones. Los medios de cultivo utilizados se presentan en la tabla 7 y los tres tipos de estadios que se probaron se muestran en las figuras 12.

Tabla 7. Medios de cultivo probados para la embriogénesis somática directa de <i>Capsicum annuum</i> L.						
Componentes	MS-CW	MS-CG	MS-R2	WPM-CW	WPM-CG	WPM-R2
Sales	MS 100%			WPM 100%		
Sacarosa	8%					
2,4-D	2.0 mg/L					
Orgánicos	CW 10 mL/L	Caseína 500 mg/L Glutamina 200 mg/L	100%	CW 10 mL/L	Caseína 500 mg/L Glutamina 200 mg/L	100%

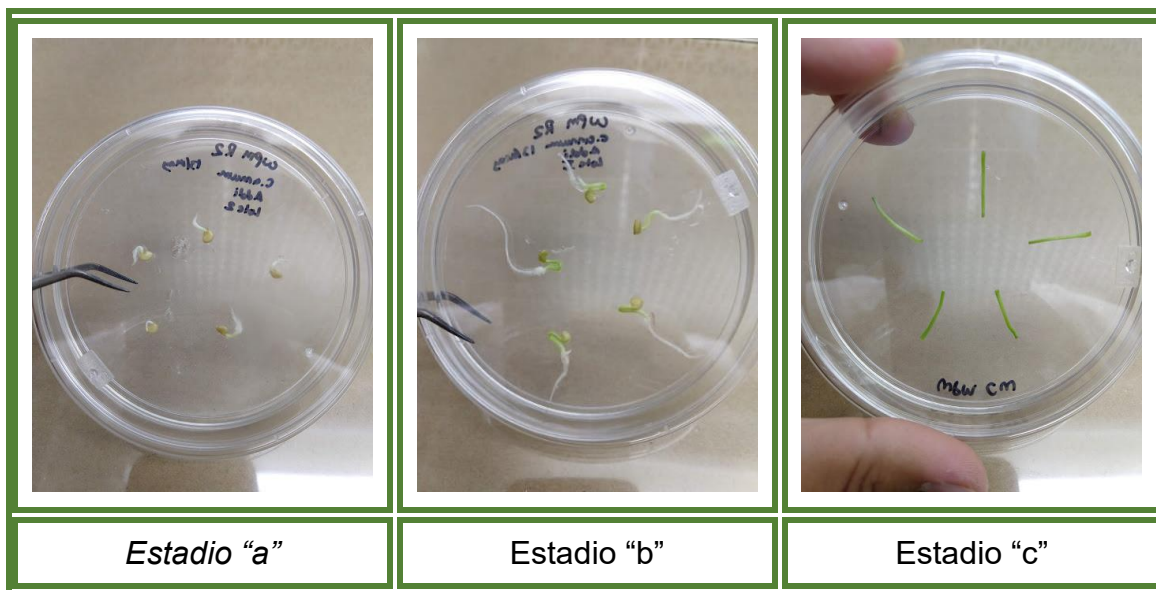


Figura 12. Estadios de las plántulas germinadas de *Capsicum annuum* L. probados para la embriogénesis somática directa junto a los medios de cultivo de la tabla 7; donde “a” son plántulas de 1 a 5 cm, “b” son de 5 a 10 cm y “c” es el hipocótilo de plántulas que se desarrollaron hasta mostrar hojas cotiledonarias.

Los embriones desarrollados se cultivaron en cajas Petri, bajo las condiciones descritas en la sección 5.4.2, teniendo de cada uno de los seis medios de cultivo tres repeticiones, con lo cual cada estadio de desarrollo se cultivó en una de las repeticiones y poniendo cinco explantes en cada caja Petri. Después de 48 días de la inducción de embriogénesis somática, se observaron los explantes en un microscopio estereoscópico para revisar la diferenciación obtenida

5.7 Transformación genética por biobalística.

Debido a la recalcitrancia del chile serrano para su regeneración en cultivos *in vitro*, los protocolos de transformación genética se llevaron a la par con los protocolos de regeneración. De manera general, las transformaciones genéticas se realizaron con una cámara de biobalística de alta presión BioRad® modelo PDS-1000/He solicitando también los plásmidos mencionados en la sección 5.2. Para la transformación genética la M. en D. Aracely Arandal Martínez preparó balas de tungsteno de 0.4 y 0.7 μm , así como los reactivos necesarios tales como: CaCl_2 (2.5 M), espermidina (0.1 M), EtOH (grado HPLC y 70%), agua desionizada estéril y helio como el gas inerte para disparar

las balas dentro de la cámara de biobalística. Los materiales utilizados fueron micropipetas de diferentes volúmenes, puntas para micropipeta, tubos Eppendorf, membranas de ruptura (1100 psi), macrocarriers, holders y stopping screens, todos esterilizados en una autoclave vertical por 121°C (1.2 psi/18 min) y manejados en condiciones de asepsia. La preparación de los reactivos, así como el procedimiento previo a la transformación genética se describen en el anexo III del presente trabajo. El diagrama general de transformación genética se muestra a continuación en la figura 13.

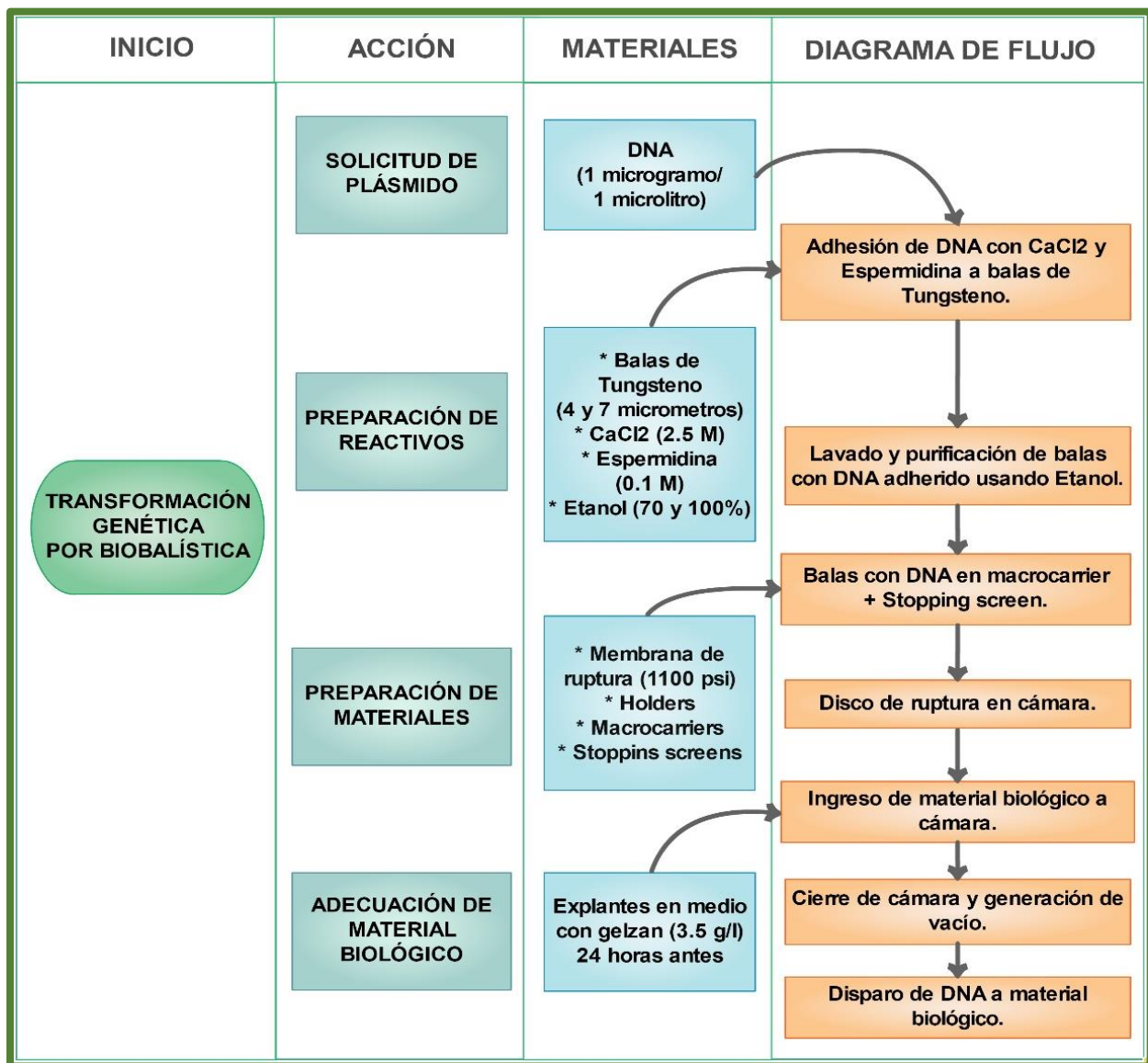


Figura 13. Diagrama general de transformación genética por biobalística para los diferentes explantes de *Capsicum annum L.*

5.7.1 Transformación de callos.

5.7.1.1 Selección de la concentración del agente de selección en cultivo de callos.

Considerando una vía de regeneración indirecta, se propuso establecer con los cultivos de callos una transformación genética por medio de biobalística, definiendo en principio los parámetros para que el agente de selección necrosara completamente a las células, siendo subcultivadas en el medio que mejor resultado tuvo la proliferación de callo, el cual fue el medio N6P. Las concentraciones probadas en este experimento fueron 0, 10, 15, 20 y 25 mg/L de higromicina-B.

Los parámetros evaluados fueron el peso fresco como método cuantitativo y el grado de oxidación en una escala cualitativa, registrando cada tercer día esta información y obteniendo después 21 días la influencia del antibiótico sobre el peso fresco y la oxidación del callo. La curva de resistencia a higromicina se elaboró en el programa Excel 2013 de la paquetería Office, a través de los datos de peso fresco obtenidos de cinco repeticiones que iniciaron con 0.50 g de callo para los cinco tratamientos de higromicina. Así mismo, el grado de oxidación se evaluó al término del experimento, dando calificaciones subjetivas de 0x a 5x, donde 0 fue una oxidación nula y 5x una oxidación total.

5.7.1.2 Selección de las condiciones de transformación genética de callo.

Siguiendo el diagrama de transformación genética, al establecer las condiciones de resistencia a higromicina-B que necrosa totalmente las células de *Capsicum annum* L., se subcultivó en un medio N6P habitual cinco días antes de la transformación genética, con base en los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento.

Veinticuatro horas antes de la transformación genética, se subcultivó el callo en etapa exponencial sobre cajas Petri de poliestireno (60 x 15 mm) con 20 mL de medio fresco N6P y 3.5 g/L de gelzán, poniendo en éstas la cantidad de 0.5 g de callo (Ensayo E1) que cubriera un círculo de diámetro de 20 mm, la cual era necesaria para que las balas proyectadas llegaran adecuadamente a las células vegetales. Los parámetros de experimentación para determinar las mejores condiciones de transformación genética, en la cámara de biobalística, fueron los presentados en la tabla 8.

Tabla 8. Experimento propuesto para la transformación genética de callos de <i>Capsicum annuum</i> L. por medio del sistema de biobalística.				
Condiciones	Experimentos			
Presión	1,100 psi			
Número de disparos	Un disparo			
Medio de Cultivo	Medio N6P			
Tratamientos	T1	T2	T3	T4
Distancia Macrocarrier-Explante	9 cm		12 cm	
Tamaño de bala	0.4 μm	0.7 μm	0.4 μm	0.7 μm

Una vez transformadas las células, después de 48 horas se pasaron del medio para transformación por biobalística a un medio de selección con la cantidad habitual de gelzán (3.0 g/L) y 25 mg/L de higromicina-B, subcultivándolos cada tres semanas a un medio fresco similar.

5.7.1.3 Comprobación de la transformación y visualización de la expresión transitoria de GFP en callos.

La comprobación de las células transformadas de *Capsicum annuum* L. se realizó a través de dos metodologías: la resistencia a higromicina-B observada a través del microscopio Motic SMZ-168 evaluando cualitativamente la oxidación presentada por el callo, así como la expresión transitoria de la proteína verde fluorescente, ambas características otorgadas por el plásmido insertado.

La expresión transitoria de GFP se observó con un microscopio confocal, instrumento perteneciente a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Industria e Investigación (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM, edificio H "Mario Molina". La observación se realizó 5 y 30 días después de la transformación genética; el primer análisis para comprobar que el procedimiento se había realizado adecuadamente y el segundo con la finalidad de comprobar que el gen insertado ya se encontraba estable dentro de las células; en este último, se tomó del callo más sano desarrollado en higromicina-B.

Los callos transformados fueron evaluados visualmente tras 30 días de haber sido subcultivados, definiendo el mejor parámetro como aquel en donde la formación de masa celular se observara en cantidad considerable y ésta no se necrosara, aunado a la visualización de la expresión transitoria de GFP como primer resultado de una transformación genética correcta.

5.7.2 Transformación de embriones cigóticos maduros e inmaduros.

5.7.2.1 Selección de la concentración de higromicina en plantas de chile serrano.

Para la vía de regeneración directa de plantas transformadas se establecieron cultivos asépticos de nudos, los cuales provenían de plantas con 42 días de desarrollo, tomando el primero y el segundo nudo de la parte superior de la planta, cultivándose posteriormente en el medio propuesto por León (2018) (Medio MS-RD, tabla 9) a diferentes concentraciones de higromicina-B (0, 5, 10 y 15 mg/L).

El parámetro evaluado fue únicamente el grado de oxidación del nudo en una escala cualitativa y su desarrollo en caso contrario, con la finalidad de establecer la concentración adecuada del agente de selección; tanto para embriones cigóticos y plantas transformadas como para embriones somáticos regenerados y transformados. La evaluación se realizó cada tercer día durante un mes y se determinó la concentración letal para los explantes ya mencionados para que, en un futuro, una vez desarrollados adecuadamente, se expongan al agente de selección y se determine entonces su viabilidad una vez transformada genéticamente.

5.7.2.2 Selección de las condiciones de transformación genética en embriones cigóticos.

Se realizó la transformación genética de embriones cigóticos maduros (Ensayo E2) e inmaduros (Ensayo E3), usando en ambos ensayos el medio de cultivo propuesto en la investigación de León (2018), del laboratorio 116 de la Facultad de Química, UNAM (Tabla 9), para efectos de este trabajo nombrado como “MS-RD (Regeneración directa)”, así como un medio N6P como experimento adicional al ensayo E2, para observar cómo se comportaban los embriones cigóticos maduros transformados (Ensayo E2).

Tabla 9. Componentes del medio de cultivo (MS-RD) para la regeneración vía organogénesis directa de brotes de <i>C. annuum</i> L.	
<i>Componentes</i>	Medio MS-RD
<i>Sales</i>	MS 100%
<i>Vitaminas</i>	R2 100%
<i>Sacarosa</i>	3%
<i>Antioxidantes</i>	300 mg/L
<i>Glutamina</i>	50 mg/L
<i>Arginina</i>	15 mg/L
<i>Cisteína</i>	100 mg/L
<i>Adenina</i>	25 mg/L
<i>BAP</i>	5 mg/L
<i>Carbón activado</i>	1 g/L
<i>Sulfato de Cobre</i>	8 µg/L
<i>Nitrato de Plata</i>	5 mg/L
<i>PVP</i>	2 g/L
<i>Gelzán</i>	3.0 g/L

El diseño de ambos ensayos se muestra en las tablas 10 y 11, destacando que el ensayo E2 maneja únicamente el plásmido 1 (*pCAMBIA1302::FBP::GFP*) y el ensayo E3 ambos plásmidos *pCAMBIA1302::FBP::GFP* y *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP*. En este procedimiento, los embriones tanto maduros como inmaduros se remojaron en agua estéril por 24 horas previas al cultivo en cajas petri, para ablandar la testa y que las balas penetraran de mejor forma al explante. Una vez remojados los embriones éstos se cultivaron 24 horas antes en cajas Petri con los medios establecidos con 3.5 g/L de gelzán para su transformación genética por biobalística y sin higromicina, añadiendo al centro de cada caja Petri la cantidad de 25 embriones. Las condiciones de la cámara de biobalística en ambos ensayos fueron las siguientes:

Tabla 10. Experimento propuesto para la transformación genética de **semillas maduras** de *Capsicum annuum* L. por biobalística, utilizando diferentes medios de cultivo.

Condiciones	Experimentos							
Presión	1,100 psi							
Número de disparos	Un disparo							
Medio de Cultivo	Medio MS-RD				Medio N6P			
Tratamientos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Distancia Macrocarrier-Explante	9 cm		12 cm		9 cm		12 cm	
Tamaño de bala	0.4 μm	0.7 μm	0.4 μm	0.7 μm	0.4 μm	0.7 μm	0.4 μm	0.7 μm

Tabla 11. Experimento propuesto para la transformación genética de **semillas inmaduras** de *Capsicum annuum* L. por biobalística, utilizando dos plásmidos diferentes.

Condiciones	Experimentos	
Presión	1,100 psi	
Número de disparos	2 disparos	
Medio de Cultivo	Medio MS-RD	
Tratamientos	T1	T2
Distancia Macrocarrier-Explante	12 cm	
Tamaño de bala	0.7 μm	
Plásmido	pCAMBIA1302::FBP::GFP	pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP

Ambos ensayos se subcultivaron 48 horas después de la transformación en medios frescos y sin higromicina para el primer subcultivo, con la finalidad de que los embriones se desarrollaran sin estrés por el antibiótico. Posteriormente, se subcultivaron 5 veces cada tres semanas en medios frescos y a las concentraciones de higromicina que se mencionan a continuación: Al ensayo E2 se le agregó 15 mg/L de higromicina-B desde el segundo subcultivo y así se mantuvo, mientras que el ensayo E3 se aumentó gradualmente la concentración de higromicina-B a razón de 5, 10 y 15 mg/L por subcultivo.

5.7.2.3 Visualización de la expresión transitoria de GFP en embriones cigóticos transformados.

La expresión transitoria fue comprobada para ambos ensayos (E2 y E3), bajo las mismas condiciones descritas del ensayo E1 de la sección **5.7.1.3**. La evaluación de los embriones cigóticos maduros transformados (ensayo E2) fue cinco días después del bombardeo y 32 días después de la transformación genética se observó el desarrollo de las plantas en la concentración de higromicina-B adecuada (15 mg/L) que, al presentarse necrosadas, no fue indispensable observar la expresión de GFP. La observación de la expresión transitoria de GFP en los callos y plántulas obtenidas del ensayo E3, provenientes de embriones cigóticos inmaduros, se realizó cuatro meses después de la transformación genética.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Germinación *ex vitro*.

En la germinación realizada en condiciones *ex vitro*, las semillas que fueron sembradas en hidroponía se dejaron previamente en un remojo de 3 días en AG₃ 1 mg/L, germinando completamente previo a su paso al sustrato de agrolita, obteniendo posteriormente un desarrollo de todas las semillas sembradas de las plantas de chile serrano (figura 14).

Respecto a las plántulas obtenidas, se destaca que al presentar éstas las hojas verdaderas y al regarlas con solución hidropónica, el desarrollo del tallo, hojas y brotes adventicios fue más efectivo que cuando no se regó con la solución en su primera etapa de crecimiento, debido al requerimiento de sales y nutrientes para el óptimo crecimiento en este tipo de metodología (Beltrano & Gimenez, 2015).



Figura 14. Plantas de *Capsicum annuum* L. en condiciones de hidroponía con 60 días de desarrollo.

6.2 Método de desinfección.

La desinfección de los explantes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un punto crítico en el estudio de las plantas o líneas celulares que se establecen bajo esta técnica biotecnológica, siendo entonces la contaminación de bacterias u hongos un factor biótico que daña el cultivo al infectarlo o absorber los nutrientes presentes en el medio. Con lo anterior, es relevante establecer una serie de protocolos con el que se logre la desinfección del material vegetal, ya que se debe adaptar el tejido u órgano en cuestión a las condiciones de asepsia para su establecimiento *in vitro* exitoso (Alcántara et al.,

2017). Zaragoza en 2016 estableció la metodología que permite desinfectar las semillas de chile serrano, lográndose la ausencia de microorganismos en los cultivos *in vitro* debido a la interacción de los componentes utilizados en el tiempo definido, para eliminarlos.

La desinfección se fundamenta en la capacidad antiséptica, así como en la polaridad que tiene el etanol para disolver y desorganizar las capas de lípidos y proteínas que componen la membrana de la semilla, además de inhibir algunos microorganismos, pero no en su totalidad. Posteriormente, el NaClO incrementa la eficiencia de la desinfección al oxidar las proteínas de membrana de los microorganismos, lo cual genera deshidratación celular (Madigan et al., 2015). Cabe resaltar que un exceso de NaClO puede causar el mismo efecto sobre el explante y por tanto dañar al tejido vegetal (Gómez, 2016). Adicionalmente, el Tween 20 es un tensoactivo que genera una emulsión aceite en agua, permitiendo que los lípidos que no se retiraron con el etanol, sean removidos por este componente permitiendo la entrada del agente desinfectante (NaClO), además de tener la misma función con bacterias que se adhieren a la superficie vegetal y no se eliminan con el hipoclorito de sodio (Cruz, 2012). Finalmente, al realizar correctamente esta parte del protocolo, se logró un 100% de desinfección para todos los explantes utilizados dentro de los diferentes experimentos realizados como lo reportado por Zaragoza (2016), López (2016) y León (2018).

6.3 Germinación *in vitro*.

La germinación *in vitro* de semillas de chile serrano tuvo la finalidad de determinar su viabilidad, además de obtener plantas en condiciones asépticas y con ello explantes para los diferentes experimentos, tal fue el caso de la curva de resistencia a higromicina de nudos y la obtención de plantas transgénicas a partir del bombardeo de partículas con ADN a semillas maduras, que más adelante serán discutidos. El porcentaje de germinación obtenido se muestra en la tabla 12, donde se siguió la metodología de la sección **5.4.3** para germinar las semillas mencionadas. Debe destacarse que la germinación en condiciones *in vitro* comenzó entre el quinto y el séptimo día después de la siembra, obteniendo un mayor porcentaje en el séptimo día, después de la siembra en ambos medios.

Tabla 12. Germinación de semillas de chile serrano bajo condiciones *in vitro* en dos medios de cultivo diferentes.

		Tiempo de germinación (días)							
Medio de cultivo	Parámetro estadístico	4	5	7	8	11	15	18	%Germ
MS sin AG ₃	\bar{x}	0.3	2.4	6.4	1.1	0.9	0.4	0.3	79.0%
	D.E.	0.49	0.98	2.15	1.07	0.69	0.53	0.49	
MS + AG ₃ (3 mg/L)	\bar{x}	0.1	1.9	7.4	0.4	1.9	0.1	0.6	82.9%
	D.E.	0.38	1.86	1.81	0.53	1.07	0.38	0.79	

La germinación *in vitro* de chile serrano ofrece una mayor eficiencia en esta fase respecto a lo reportado en condiciones de suelo, que es de 12 a 15 días para el inicio de este fenómeno (González-Cortés et al., 2015). El porcentaje de germinación para ambos demuestra una viabilidad adecuada de las semillas, además de que el medio MS con 3 mg/L de AG₃ como regulador de crecimiento, desarrolló una mayor cantidad de plántulas respecto al medio sin hormonas, debido a que este compuesto influye en la germinación de semillas y el posterior desarrollo de radículas (Umamaheswari & Lalitha, 2007).

Lo anterior se fundamenta en el reporte de Mandujano et al., 2007, donde describen que las giberelinas desinhiben genes que codifican para la enzima α -amilasa la cual degrada el almidón que la semilla tiene como reserva de carbohidratos simples, utilizándolos como fuente de carbono para el desarrollo inicial de la planta aun cuando esta última no es capaz de realizar fotosíntesis por sí misma, por lo cual al añadir este compuesto se complementa a las giberelinas sintetizadas *de novo* por los mismos embriones en desarrollo.

Adicionalmente, debe destacarse que a partir del día 11 se observó el comienzo en el desarrollo de hojas verdaderas sobre las semillas que habían germinado en los primeros días (4 y 5 días), en proporciones similares dentro de los dos medios de cultivo analizados.

El desarrollo que tuvieron las plantas bajo condiciones *in vitro* durante 42 días se muestra en la figura 15, resaltando que durante las primeras cuatro semanas se mantuvieron en el medio con AG₃ (3 mg/L) y al siguiente subcultivo se les quitó el compuesto en mención.

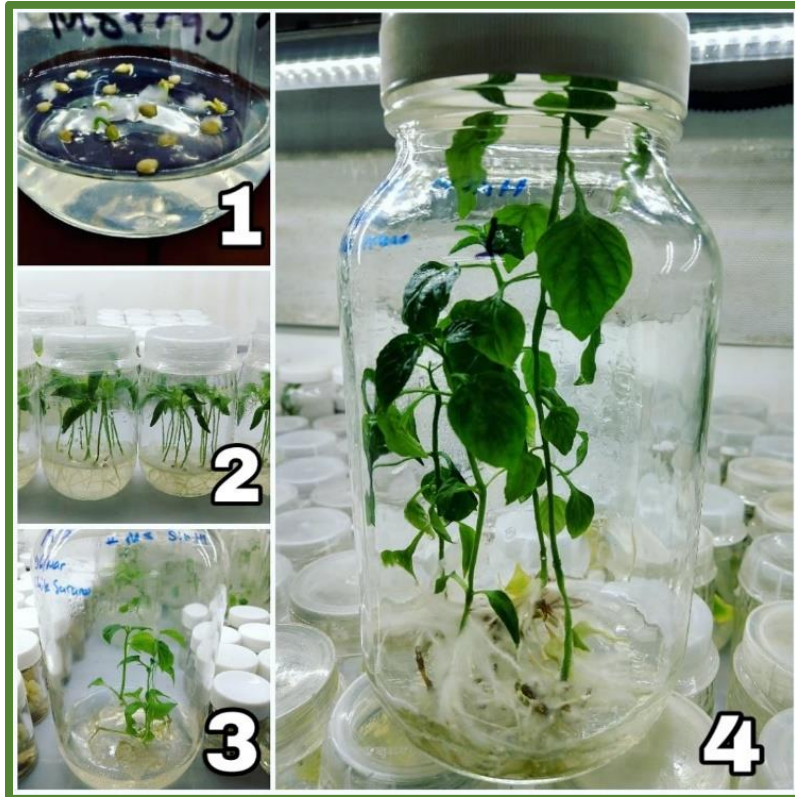


Figura 15. Desarrollo de plantas donadoras de explantes bajo condiciones *in vitro* en medio MS. (1) Semillas de chile serrano germinadas después de 7 días, (2) Plantas en desarrollo tras 18 días de cultivo, (3) Plantas de chile serrano tras 28 días de cultivo, (4) Plantas donadoras de explantes (nudos) para la cinética de resistencia a higromicina-B tras 42 días después del cultivo.

6.4 Regeneración indirecta.

6.4.1 Inducción y proliferación de callo.

El establecimiento de callos de *Capsicum annuum* L., tanto en inducción como en proliferación a partir de embriones cigóticos inmaduros, se llevó a cabo con mejores resultados en el medio N6P (tabla 13), composición descrita con anterioridad en la sección 5.4.2. El uso de los medios B+ y N6P se debió a que éstos son utilizados comúnmente en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales para comenzar con la

promoción de callo, destacando que ambos contienen la auxina 2,4-D (1 y 2 mg/L respectivamente), compuesto que interviene en la formación y proliferación de callo para chile serrano, como lo reportan distintos autores (Harini & Lakshmi, 1993; Binzel et al., 1996; Berljak, 1999; Bodhipadma & Leung, 2002; Kaparakis & Alderson, 2008; Aboshama, 2011), por lo cual se decidió comparar la influencia de las sales así como los diferentes compuestos orgánicos en la formación de la masa celular, diferenciando que en este caso el explante utilizado es el embrión cigótico inmaduro de chile serrano.

Tabla 13. Resultados cualitativos para la inducción de callo a partir de embriones cigóticos inmaduros en dos medios de cultivo diferentes.		
<i>Medio de Cultivo</i>	Medio B+	Medio N6P
<i>Total de explantes evaluados</i>	20	20
<i>Callos inducidos</i>	6	17
<i>Explantes oxidados</i>	14	3

Las observaciones cualitativas (figura 16) demostraron que, para embriones cigóticos inmaduros, el medio N6P, además de inducir y proliferar más callo, brindó un bajo nivel de oxidación respecto al medio B+, destacando que las sales N6P no son reportadas de manera común en la literatura para la regeneración indirecta de *Capsicum annuum* L. Azofeifa en 2009 describió los problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes vegetales cultivados *in vitro* justificando, con esta referencia bibliográfica, lo observado en los explantes cultivados en el medio B+. En primera instancia la elevada concentración de sales en el medio B+ respecto al medio N6P es una posible variable que influye en la respuesta oxidativa de los cultivos, ya que se reporta que, a una menor cantidad de sales, la oxidación es menor, aunado a una menor cantidad de cofactores inorgánicos tales como Cu^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , involucrados en la actividad de enzimas oxidativas (Azofeifa, 2009).

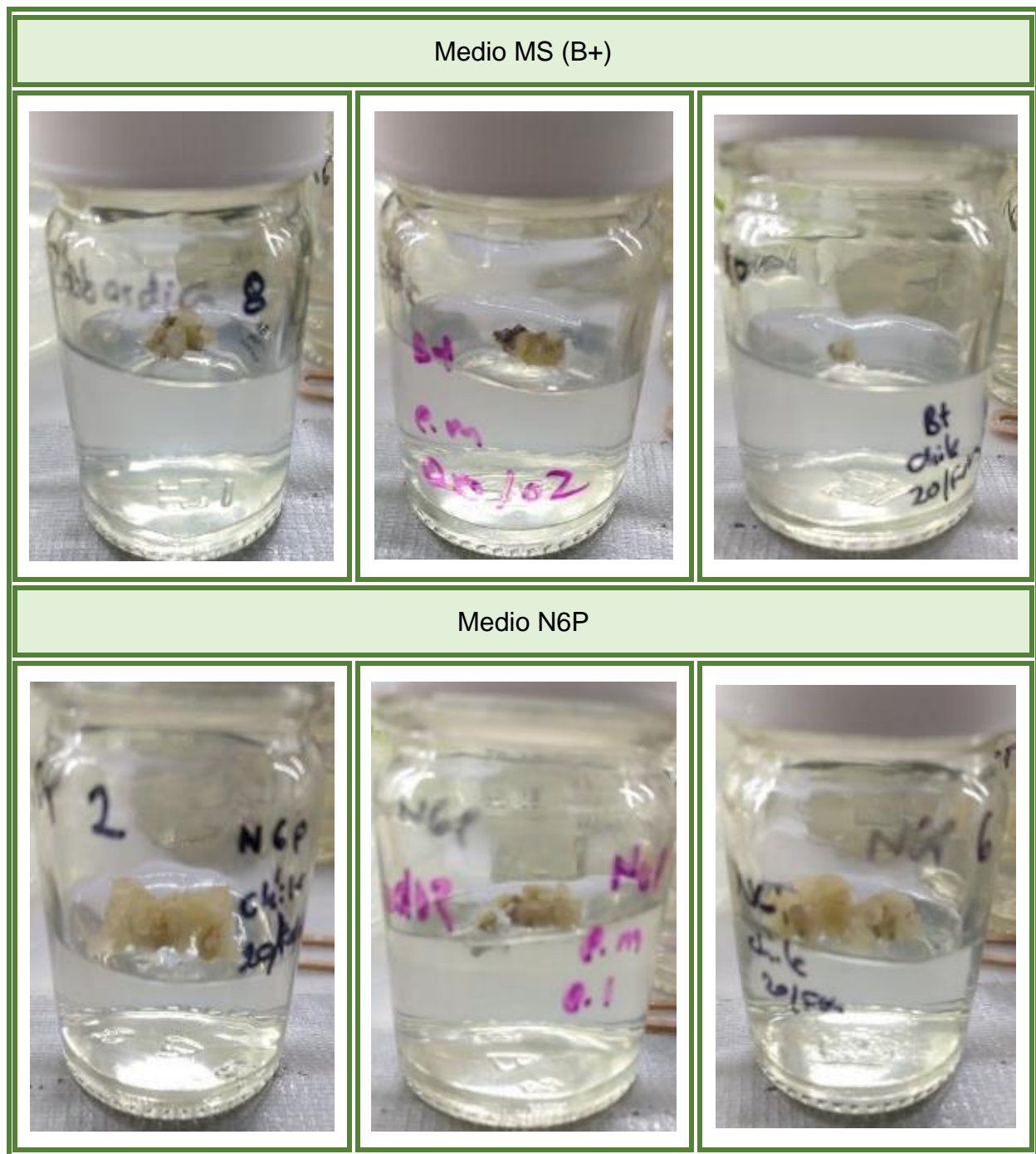


Figura 16. Comparación de dos medios de cultivo (B+ y N6P) para la inducción y proliferación de callo a partir de embriones inmaduros de *Capsicum annuum* L. tras incubarse 6 semanas con un subcultivo en la cuarta semana. Los medios de cultivo se componen de acuerdo a lo descrito en la tabla 5, con la diferencia que el medio MS contiene las siguientes hormonas: 2,4-D (1 mg/L), BAP (0.3 mg/L), ANA (1 mg/L) y AIA (1 mg/L), siendo descrito como medio B+.

De forma similar una mayor concentración de reguladores de crecimiento influye sobre una alta producción de polifenoles, siendo las auxinas más reactivas que las citocininas, hecho que permite una mayor actividad de oxidasas las cuales tienen como producto final quinonas que son reactivas y dañan el tejido celular hasta su necrosis, justificando entonces que el medio B+ al tener tres auxinas (2,4-D, ANA y AIA) es más propenso a la oxidación (Azofeifa, 2009). Cabe resaltar que no en todos los cultivos estos hechos son consistentes, sin embargo, tanto para la especie y explante estudiados, se cumplen y son factores a subrayar en el resultado obtenido.

La sinergia entre las sales N6, los reguladores de crecimiento y los compuestos orgánicos (Coctel 20, Adenina, Caseína y Prolina) formaron un callo friable en los explantes cultivados, resaltando que no todos los embriones formaron callo directamente en el medio N6P ya que algunos germinaron en un inicio y días después, sin llegar a desarrollar hojas cotiledonarias, formaron un callo con características cualitativas similares a los demás. El resultado obtenido del medio N6P es también contrastante respecto a los medios de cultivo reportados por diversos autores en la sección **2.4**, hecho que se destaca y no es reportado hacia la variedad Tampiqueño-74 de *Capsicum annuum* L. así como para el explante probado en este experimento.

6.4.2 Inducción de la vía regenerativa indirecta.

La elección de los reguladores de crecimiento en esta fase regenerativa se basa en los reportes de diferentes autores que utilizaron BAP como regulador de crecimiento, el cual diferenció brotes de *Capsicum annuum* L. en combinación con diversas auxinas y giberelinas, tanto en la inducción como en la elongación de los brotes a través de rutas organogénicas directas e indirectas (Gunay & Rao, 1978; Berljak, 1999; Husain et al., 1999; Arous et al., 2001; Joshi & Kothari, 2007 y Sanatombi & Sharma, 2008). Debe resaltarse, tal como se menciona en la sección **2.4**, que el explante estudiado en esta investigación es diferente a los utilizados en los reportes citados anteriormente, por lo cual la búsqueda de una respuesta regenerativa a través de callo proveniente de embrión inmaduro en la variedad estudiada, condiciona los resultados obtenidos para estas variables.

El establecimiento de la regeneración de plantas de *Capsicum annuum* L. en los medios de cultivo con diferentes reguladores de crecimiento, mostró diferencias cualitativas apreciables en los tratamientos establecidos para el callo proveniente de embriones inmaduros de esta especie la cual se encontró en función del tiempo y a través de los subcultivos consecuentes. En primer lugar, debe remarcarse que las imágenes del séptimo subcultivo, el primero bajo los diferentes tratamientos con los diferentes reguladores de crecimiento, no son mostradas ya que no se obtuvo una diferenciación en las características apreciables de los callos.

La auxina 2,4-D jugó un papel importante sobre el desarrollo de células no diferenciadas en el medio de cultivo, a lo que se le conoce como callogénesis (George et al., 2008) más no en la diferenciación de cloroplastos y, por tanto, una posible inhibición de la regeneración hacia embriones u órganos vegetales. Se ha reportado que el compuesto 2,4-D metila el ADN, afectando de forma aleatoria algunos genes que participan en la diferenciación celular e inhibiendo así esta capacidad en las células vegetales (Féher, 2015), situación que se observa en el tratamiento control (T2-8) y el tratamiento que aún conservaba 50% de auxina (T3-8), en los últimos dos subcultivos donde, a diferencia de los demás, no presentó ninguna coloración (figura 17). De igual forma se destaca en el tratamiento control que al tener una baja concentración de BAP, este compuesto no influyó sobre el desarrollo de cloroplastos en el callo de embrión inmaduro de *Capsicum annuum* L.

Una vez que se realizó el octavo subcultivo, los callos comenzaron a tener una ligera diferenciación de cloroplastos, principalmente en los tratamientos T1-8, T4-8 y T5-8. De esta forma, la ausencia de reguladores de crecimiento como lo es en el tratamiento T1-8 genera callos que desarrollan un color verde (figura 17), al igual que la influencia de la citocinina BAP como diferenciador de cloroplastos al encontrarse en el medio de cultivo (Peter, 2004).

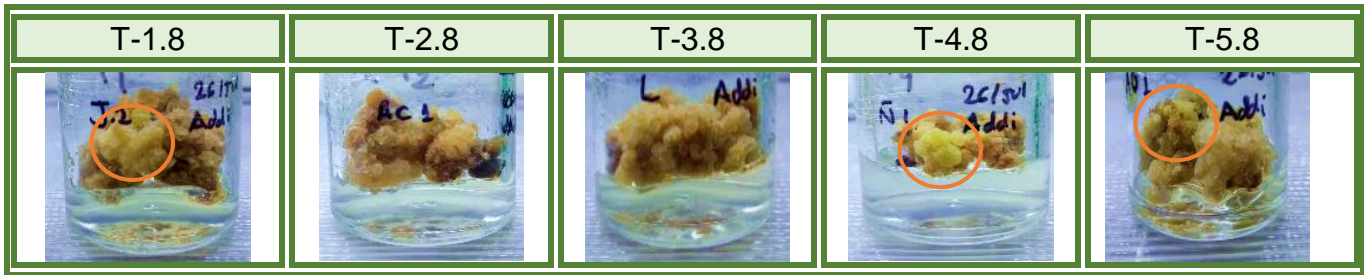


Figura 17. Octavo subcultivo del experimento de reguladores de crecimiento para la regeneración de *C. annuum* L.

En el noveno y décimo subcultivo, en medio MS con diferentes concentraciones de reguladores, según lo indicado en la metodología experimental, se diferenciaron apreciablemente los callos; situación favorable para una posible regeneración de plantas de chile serrano (*Capsicum annuum* L.). Cabe destacar que a excepción del tratamiento control (T2a), todos presentaron una diferenciación mayor en cuestión de color, así como en compactación.

Sobre el tratamiento 1 (figura 18) tanto en el noveno y décimo subcultivo para ambos medios (T1-9ab y T1-10ab), se muestra que aún sin la influencia de algún regulador de crecimiento, la diferenciación de cloroplastos se obtiene. Sin embargo, al décimo subcultivo la presencia de oxidación se observa mayoritariamente en el callo, aunque se destacan ciertas zonas en donde se encuentran agregados de una coloración verde intensa y contrastante.

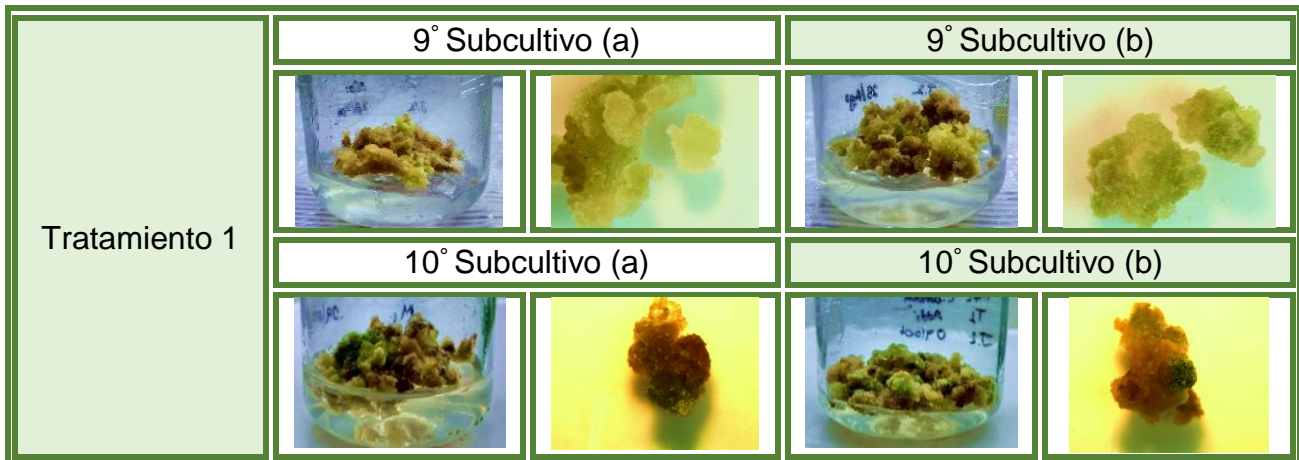


Figura 18. Resultados cualitativos del tratamiento 1 (T1) en callo proveniente de embrión inmaduro de *Capsicum annuum* L.

Respecto al tratamiento 2 (T2-10b), en donde se pasó el callo de un medio N6 a un medio MS con 4 mg/L de BAP, dos meses fueron suficientes para que las células del callo tuvieran una diferenciación celular apreciable (figura 19), sin embargo, este resultado obtenido es muy similar al de los tratamientos T3-9b y T4-9b debido a la presencia de la citocinina BAP.

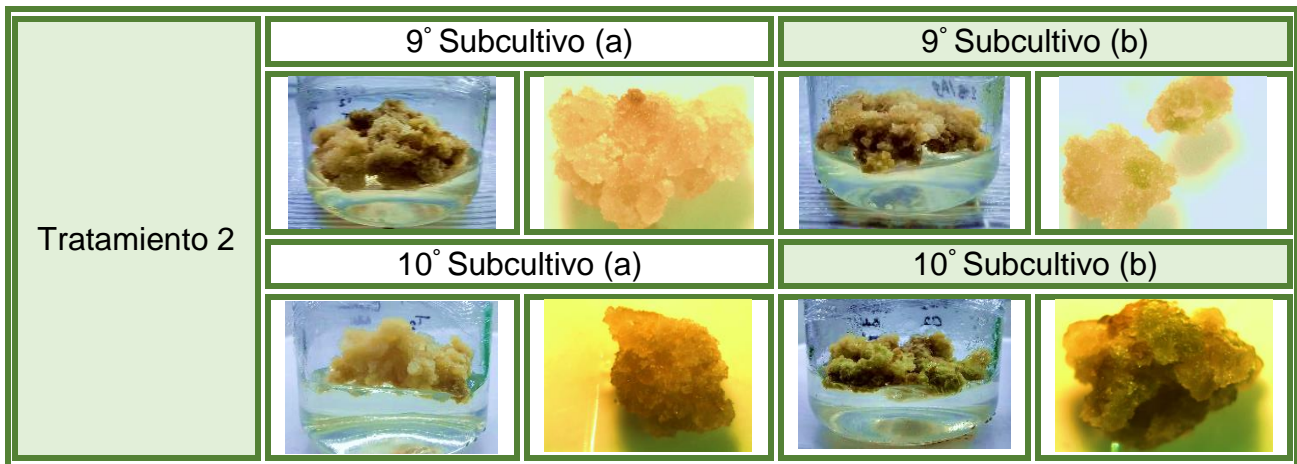


Figura 19. Resultados cualitativos del tratamiento 2 (T2) en callo proveniente de embrión inmaduro de *Capsicum annum L.*

En el tratamiento 3, sobre sus dos variantes en el noveno subcultivo (T3-9a y T3-9b), la influencia de la auxina 2,4-D continúa, ya que muestra una menor coloración respecto a los demás, lo que sugiere que el material genético de algunas células aún se encuentra metilado, situación que en el cuarto subcultivo (T3-10a y T3-10b), ya con la presencia total de BAP se obtiene una diferenciación celular apreciable respecto a la obtención de cloroplastos. Cabe destacar que el medio con 3 mg/L para este tratamiento (T3-10a) es el que marca en mayor proporción la diferenciación (figura 20).

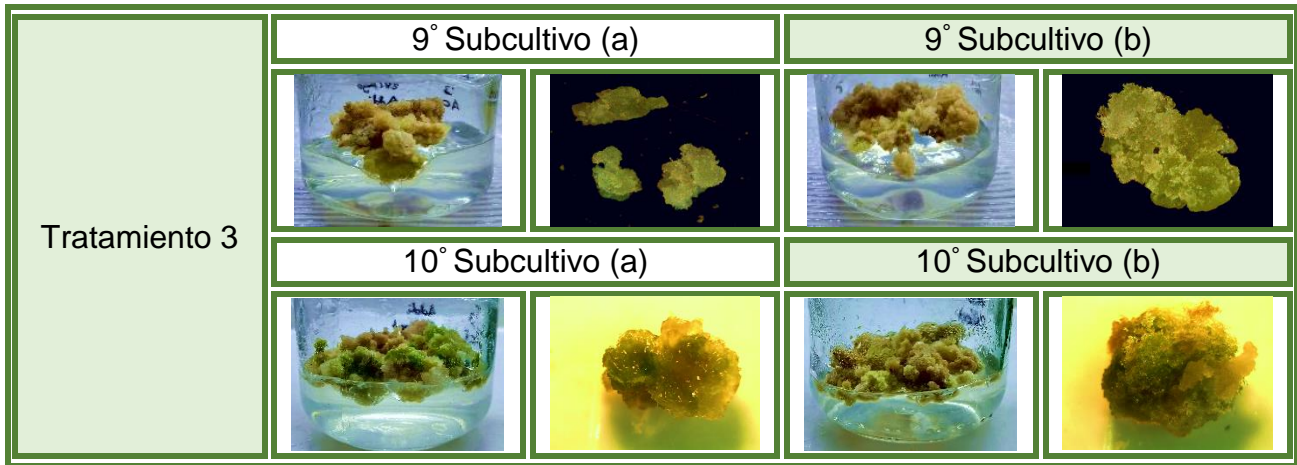


Figura 20. Resultados cualitativos del tratamiento 3 (T3) en callo proveniente de embrión inmaduro de *Capsicum annum* L.

El tratamiento 4 (T4) tanto en el noveno y décimo subcultivo, éste último en sus dos variantes experimentales, muestran características similares, a excepción del callo proveniente de T4-10b, el cual es un callo oxidado, pero en ciertas zonas presenta agregados de color blanco y compacto (figura 21).

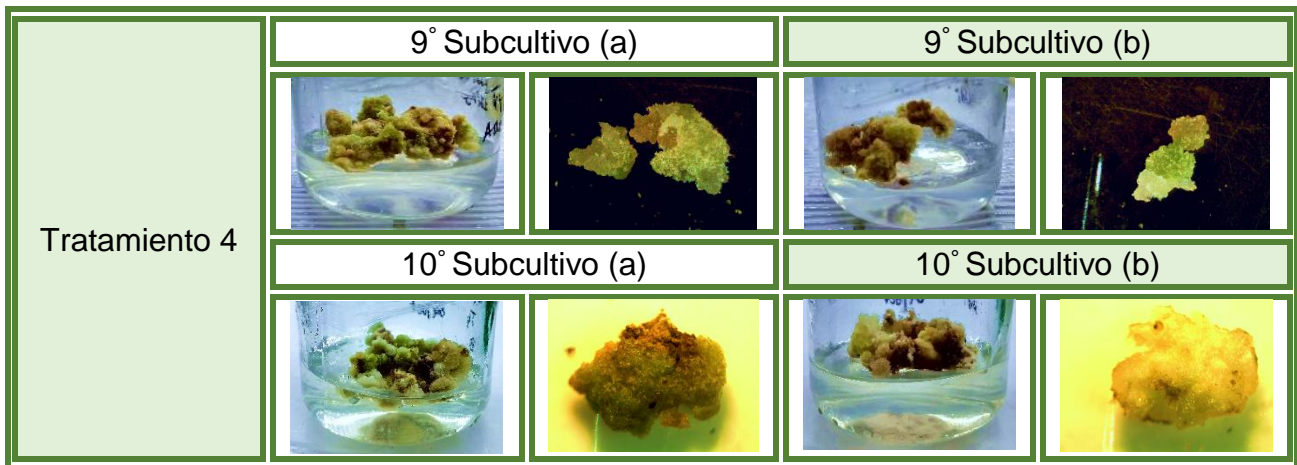


Figura 21. Resultados cualitativos del tratamiento 4 (T4) en callo proveniente de embrión inmaduro de *Capsicum annum* L.

Respecto a los tratamientos T5-a y T5-b, en ambos subcultivos (noveno y décimo), donde el ácido giberélico (AG₃) fue adicionado, son los callos que muestran una mayor compactación al observar al microscopio además de una coloración verde más intensa, sin embargo, en el décimo subcultivo en la variante “b” (T5-10b), se observa que además

de la diferenciación de cloroplastos, existe una considerable oxidación celular debido a la presencia de una concentración elevada de BAP (4 mg/L) (figura 22).

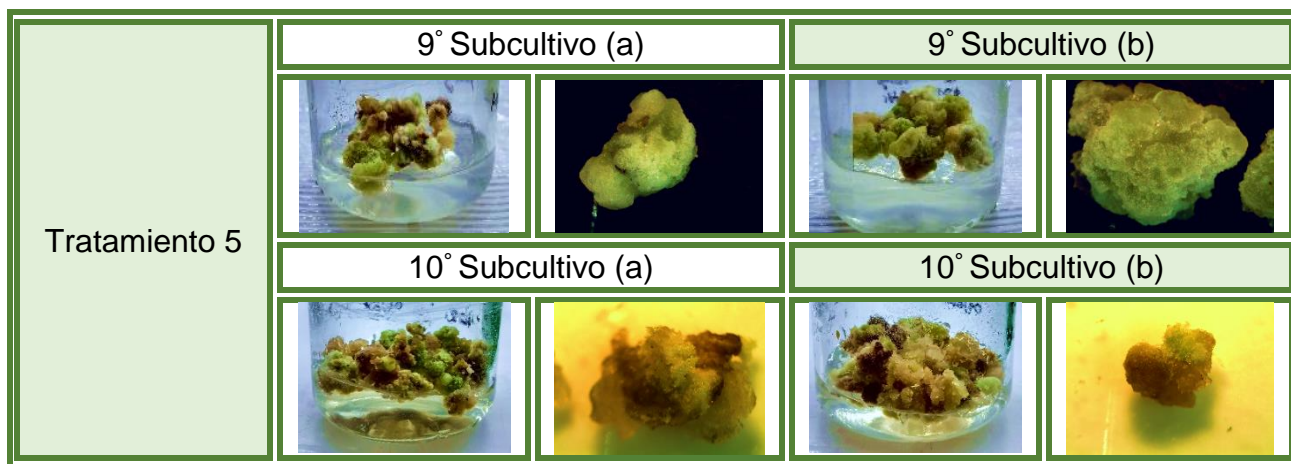


Figura 22. Resultados cualitativos del tratamiento 5 (T5) en callo proveniente de embrión inmaduro de *Capsicum annuum* L.

Con los resultados obtenidos hasta el décimo subcultivo, no se observaron estructuras que se diferencien en órganos (tallos, hojas y/o raíces) o en embriones somáticos, sugiriendo nuevamente que la influencia de la auxina 2,4-D (2 mg/L), en el medio N6 donde se proliferó inicialmente el callo, inhibe la regeneración del mismo, coincidiendo con lo reportado en varios estudios (Gunay & Rao, 1978 y Berljak, 1999). Además, una elevada concentración de BAP (4 mg/L) genera una mayor oxidación del callo respecto a los 3 mg/L en los medios utilizados, sugiriendo que esta última concentración es la ideal para buscar una diferenciación sin ser agresiva para el callo de chile serrano (Peter, 2004).

Respecto a la modificación de sales que hubo en el noveno y décimo subcultivo tampoco hubo una respuesta satisfactoria en la regeneración ya sea organogénica o embriogénica, lo cual sugiere que la regeneración indirecta para esta especie no se obtiene con la metodología propuesta.

Finalmente, debe considerarse que la especie *Capsicum annuum* es recalcitrante bajo condiciones *in vitro* (Gammoudi et al., 2018) y responde de manera variable a los reguladores de crecimiento y tipo de explante hacia una futura regeneración (Kothari et al., 2010), resaltando que en la literatura (sección 2.4) se reportan regeneraciones *in vitro*

para *Capsicum annuum* L. pero las variedades son diferentes a la utilizada en esta investigación (Tampiqueño-74), siendo éste un posible factor que incide en los resultados obtenidos.

6.5 Regeneración directa.

6.5.1 Inducción de la vía regenerativa directa.

La búsqueda de la regeneración directa vía embriogénesis somática se fundamentó en la revisión bibliográfica citada en la sección **2.4**, en donde se destaca que la mayoría de los artículos utiliza una alta concentración de sacarosa (8-10%) en el medio de cultivo, así como la presencia de la auxina 2,4-D (2 mg/L) y agua de coco (10%). Los resultados presentados a continuación utilizaron, como ya se describió en la sección de materiales y métodos, embriones cigóticos maduros germinados previamente, ya que como lo describe Aboshama (2011) al estar ligeramente desarrollada la plántula, los componentes del medio inciden mejor sobre la respuesta deseada.

En la figura 23, correspondiente a la comparación de los diferentes medios de cultivo con los componentes orgánicos en el primer estadio, se observa una formación de callo en todos los casos, siendo contradictorio con lo reportado por autores como Bodhipadma & Leung (2002) y Aboshama (2011) que mencionaron bajo condiciones similares la formación de embriones somáticos después de 4 a 6 semanas. Debe aclararse que los explantes cultivados en sales MS y WPM + CW formaron ciertas protuberancias en el hipocótilo las cuales eran diferentes al callo generado, sin embargo, tiempo después se dirigieron de cualquier forma a un callo blanco, diferente al formado en las hojas cotiledonarias o en la raíz. Se destaca también que en este estadio las sales WPM + Vitaminas R2 fueron las que sin haber formado embriones desarrollaron una cantidad considerable de callo, respecto a las demás sales y compuestos orgánicos.







	Sales MS	Sales WPM
Agua de Coco		
Caseína-Glutamina		
Vitaminas R2		

Figura 23. Visualización de las plántulas (estado “a”) desarrolladas a partir de embriones maduros para la regeneración embriogénesis somática en diferentes medios de cultivo tras 48 días de cultivo.

Los resultados obtenidos para el segundo estadio (figura 24) en la embriogénesis somática directa son muy similares a los obtenidos en el primer estadio, sin embargo, en ninguno de éstos hubo la presencia de protuberancias dentro del explante o el callo. Se destaca en este estadio que, en todos los medios y compuestos orgánicos, hubo visualmente una mayor cantidad de callo respecto al anterior estadio. De forma similar, el callo que se presentó se oxidó más, al igual que la hidratación y friabilidad fue considerablemente mayor.

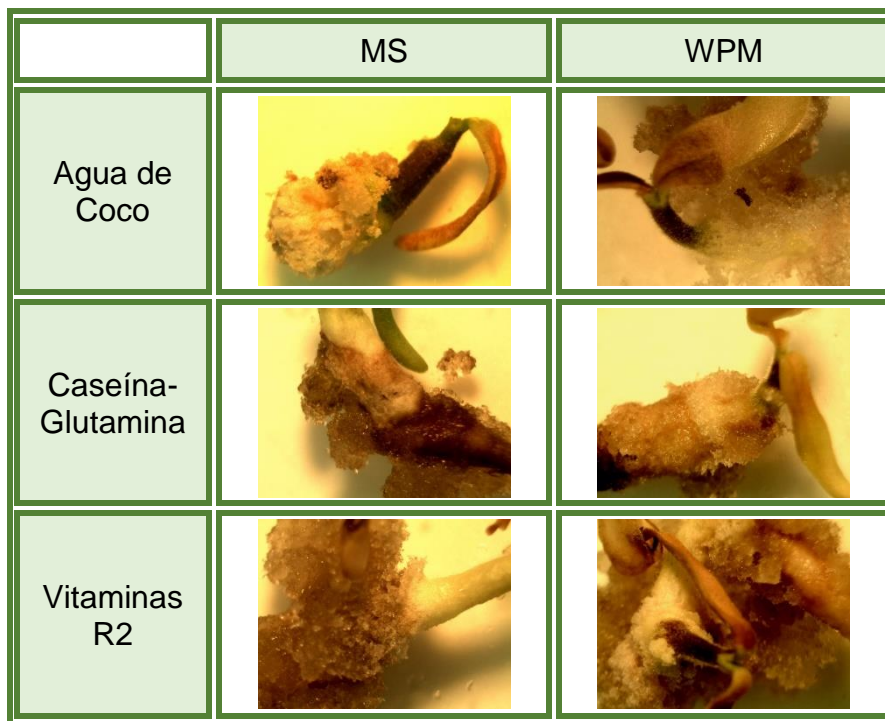


Figura 24. Visualización de las plántulas (estadio “b”) desarrolladas a partir de embriones maduros para la regeneración embriogénesis somática en diferentes medios de cultivo tras 48 días de cultivo.

El tercer estadio, que no fue embrión cigótico maduro sino el hipocótilo de los embriones desarrollados, claramente mostró una diferencia apreciable respecto a los otros dos estadios, formando un callo en toda la extensión del explante. Cabe destacar que tampoco formó embriones somáticos ni mostró alguna diferenciación en órganos, sino que presentó un callo muy friable y con alto nivel de oxidación en las sales MS, pero no en las sales WPM.

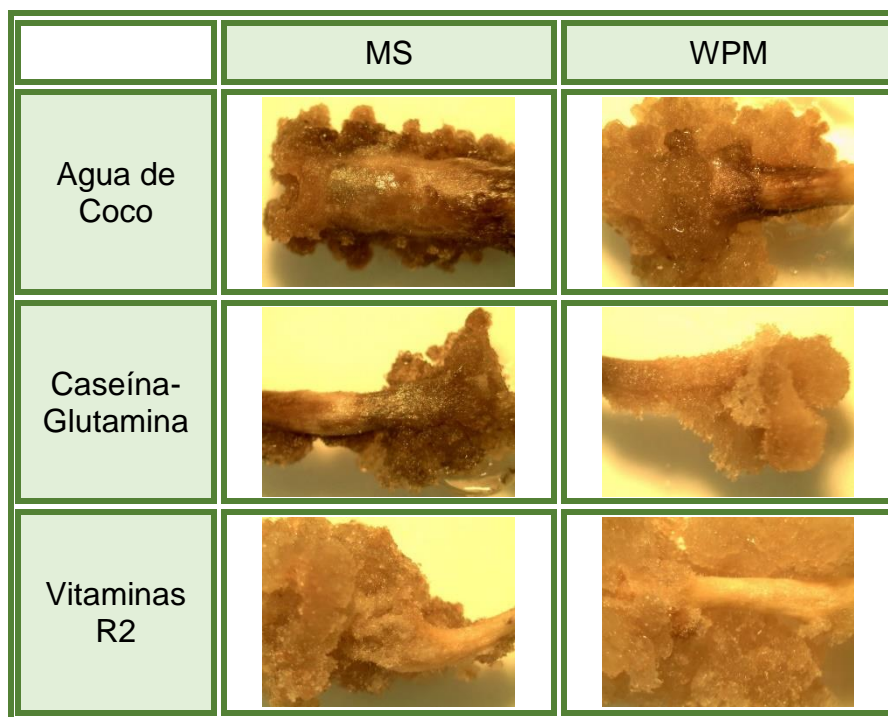


Figura 25. Visualización de las plántulas (estadio “c”) desarrolladas a partir de embriones maduros para la regeneración embriogénesis somática en diferentes medios de cultivo tras 48 días de cultivo.

Bajo la metodología propuesta en estos experimentos, los resultados mostraron que no fue posible obtener embriones somáticos a partir de plántulas desarrolladas en diferentes estadios de crecimiento, obteniendo únicamente el desarrollo de callos sobre el explante cultivado en sus tres estadios y bajo la influencia de los medios de cultivo (MS y WPM) así como de los compuestos orgánicos (Agua de coco, Caseína-Glutamina y Vitaminas R2).

Como ya se mencionó, en la literatura se reporta la obtención de embriones somáticos directamente a partir del mismo explante manejado en este experimento, sin embargo el estadio en que éstos son cultivados así como la variedad de *Capsicum* que se maneja es diferente; tales como ‘California Wonder’ (Harini & Lakshmi, 1993; Bodhipadma & Leung, 2002; Aboshama, 2011), ‘Colombo’ (Kintzios et al., 2000), ‘Sweet banana’ (Bodhipadma & Leung, 2002) y ‘Blue star’ (Kaparakis & Alderson, 2008), factor que es determinante en la regeneración de la variedad estudiada en esta investigación y que coincide con lo mencionado por Kothari et al. (2010) respecto a la recalcitrancia de esta especie, coincidiendo además con lo reportado por Sharma & M.V. Rajam (1995)

quienes encontraron que el genotipo, el explante y la relación entre ellos tienen efectos significativos en los efectos tanto de organogénesis y embriogénesis somática.

Respecto al estadio en que se cultivan los embriones, aun cuando éstos no han germinado, es de gran importancia. Si bien en esta parte de la investigación se optó por utilizar embriones madurados y en diferentes estadios del desarrollo de la plántula, el uso de embriones inmaduros muy pequeños y provenientes de frutos muy inmaduros, generará de igual forma una respuesta de oxidación y sin morfogénesis, llegando hasta la necrosis de los mismos (Binzel et al., 1996). Con lo anterior, la búsqueda del estadio adecuado en un embrión inmaduro y probando los diferentes componentes de los medios de este experimento darían como resultado la embriogénesis somática directa para la variedad Tampiqueño 74 de *Capsicum annuum* L.

6.6 Transformación genética de callos.

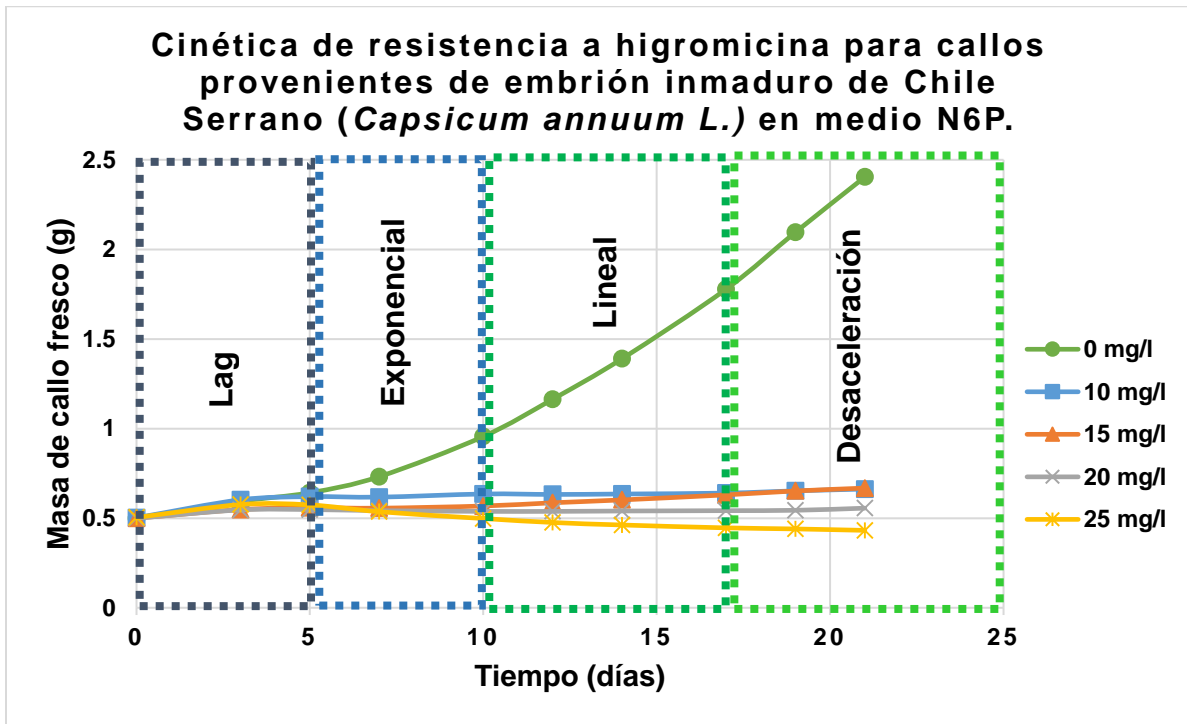
6.6.1 Determinación de la concentración letal de higromicina en callos.

La aplicación de un agente de selección en la transformación genética, con el cual se presente la muerte de las células vegetales que no tengan la capacidad de sintetizar una proteína que lo degrade, en este caso higromicina-B, permite determinar la concentración en la que este agente letal actúa eficientemente en células no transformadas para su posterior aplicación en aquellas que sí lo estén. Conforme a los resultados obtenidos, se observó que la mejor concentración de higromicina-B para causar la muerte celular de callos provenientes de embriones cigóticos inmaduros fue de 25 mg/L. En el caso del callo expuesto a higromicina-B, la reducción en su peso fresco (gráfica 1), así como la oxidación presente al final del experimento (figura 26) fueron los parámetros evaluados para elegir la concentración letal de este agente de selección.

Al realizar el análisis estadístico correspondiente, se determinó que sí existen diferencias significativas entre las concentraciones analizadas (tabla 14), destacando que con la prueba *Tukey* (tabla 15), se definió que las concentraciones de 10, 15 y 20 mg/L no presentan diferencia significativa entre ellas, pero sí con la concentración de 25 mg/L, la cual fue utilizada dentro de los experimentos estudiados, sin embargo al haber muerto

los callos en una concentración de 25 mg/L, es recomendable probar una concentración más baja de higromicina-B para seleccionar mejor los callos transformados.

Resultados similares fueron reportados para la selección de callo celular de chiles transgénicos, donde la concentración de higromicina para los callos fue de 20 mg/L (Moon et al., 2007).



Gráfica 1. Cinética de resistencia a higromicina-B para callos provenientes de embrión inmaduro de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) en medio N6P.

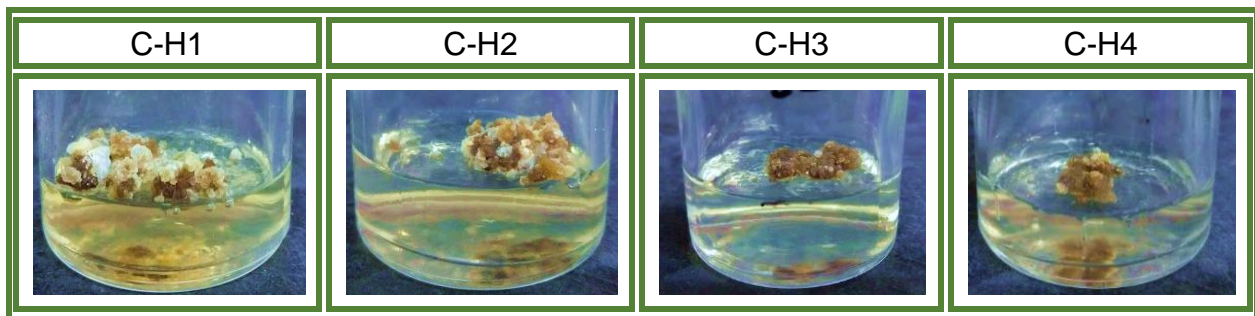


Figura 26. Callos provenientes de embriones cigóticos inmaduros de *Capsicum annuum* L. en medio N6P con un mes de incubación bajo diferentes concentraciones de higromicina-B. C-H1 (10 mg/L), C-H2 (15 mg/L), C-H3 (20 mg/L) y C-H4 (25 mg/L).

Tabla 14. Análisis de varianza de los datos obtenidos para la concentración letal de higromicina-B en callo proveniente de embrión cigótico inmaduro en medio N6P.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	F _c
Entre grupos	0.184735	3	0.061578	17.733	2.4E-05	3.238
Dentro de los grupos	0.05556	16	0.003473			
Total	0.240295	19				

Tabla 15. Prueba Tukey para determinar la diferencia significativa entre los grupos de la concentración letal de higromicina-B para callos de chile serrano.

Cuantil de confianza				
q*	Alpha			
4.05	0.05			
Matriz del umbral HSD (HDS = 0.10673114)				
Abs. (Dif.) - HSD				
	C1 (10 mg/L)	C2 (15 mg/L)	C3 (20 mg/L)	C4 (25 mg/L)
C1 (10 mg/L)		-0.006	0.106	0.23
C2 (15 mg/L)			0.112	0.236
C3 (20 mg/L)				0.124
C4 (25 mg/L)				
Informe de letras de unión				
Nivel	Letra	Media		
C1 (10 mg/L)	A	0.662		
C2 (15 mg/L)	A	0.668		
C3 (20 mg/L)	A	0.556		
C4 (25 mg/L)	B	0.432		
Lo niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.				

6.6.2 Condiciones para la transformación genética de callos.

Dentro del experimento realizado en la cinética de resistencia a higromicina para el callo de *Capsicum annuum* L. también fue analizada la cinética de crecimiento en medio N6P (gráfica 1) con el fin de determinar la etapa exponencial del desarrollo celular y entonces realizar la transformación genética en el momento donde la pared celular es más delgada debido a la acelerada división celular, existiendo entonces una mayor probabilidad del ingreso de los microproyectiles al núcleo. Una vez cultivados los callos provenientes de embriones cigóticos inmaduros en un medio fresco, el lapso en donde comienza el desarrollo exponencial es entre el quinto y séptimo día.

Una vez obtenida la fase exponencial, el bombardeo de las micropartículas se llevó a cabo como se menciona en la metodología experimental, destacando que el callo fue proveniente de un medio N6P para respetar la cinética de crecimiento y ser posteriormente cultivado en el medio de que mejor dé respuesta en la regeneración de *Capsicum annuum* L.

6.6.3 Comprobación de la transformación genética y expresión transitoria de GFP.

El plásmido *pCAMBIA1302::FBP::GFP* insertado tiene, además de la secuencia promotora de fructosa bifosfato aldolasa, dos genes de importancia para la correcta transformación genética: el gen promotor y reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) y el gen que confiere resistencia a higromicina-B (higromicin-fosfotransferasa/*hpt*). Con ello, los resultados obtenidos en la figura 27 demuestran que la transformación genética de las células provenientes del callo celular proveniente de embrión cigótico inmaduro ha sido exitosa.

La expresión transitoria del gen de la GFP demuestra que el plásmido se insertó en el material genético de las células de *Capsicum annuum* L. para los cuatro tratamientos, ya que la transcripción y traducción se llevaron a cabo, tanto 5 días después de la transformación como un mes después, contrastando con el control negativo en donde no se observa la fluorescencia. Con lo anterior se infiere que, si GFP está expresándose un mes después de su inserción, la secuencia de interés (fructosa bifosfato aldolasa) también está siendo transcrita y traducida (Martínez-Antonio, 2011). Cabe mencionar que estos resultados son cualitativos puesto que se debe permitir una

selección adecuada de las células transformadas y no son comparables los cuatro tratamientos, sin embargo, demuestran que en todos ellos la inserción del gen fue exitosa.

	Expresión GFP 5 días	Expresión GFP 30 días	Callo transformado en selección (25 mg/L) (30 días de transformación)
Control negativo			
T1 09 cm 0.4 μm			
T2 09 cm 0.7 μm			
T3 12 cm 0.4 μm			
T4 12 cm 0.7 μm			

Figura 27. Resultados cualitativos de la transformación genética de callos provenientes de embriones cigóticos inmaduros de *Capsicum annuum* L. (chile serrano) probando diferentes parámetros dentro de la transformación genética por biobalística (distancia y tamaño de bala) en el primer ensayo.

El uso de un marcador de selección adecuado es de gran importancia para una selección eficiente dentro de un evento de transformación genética. Diversos compuestos como lo son neomicina y kanamicina han sido utilizados, sin embargo, *Capsicum* sp. ha presentado una resistencia intrínseca dando una baja selección, siendo así que se ha buscado la alternativa de un antibiótico que brinde una mayor selección como lo es higromicina-B (Moon et al., 2007). Se muestra también en la figura 27, en la columna de callo transformado, la selección que han tenido las células que se encuentran transformadas de aquellas que no, y de igual forma se contrastan éstas con el control negativo. Las células transformadas se muestran como un callo habitual y aquellas que no lo están muestran una oxidación y necrosis apreciable, debido a que estas últimas no tienen en su material genético la secuencia que codifica para la proteína higromicín-fosfotransferasa/*hpt* que descompone el antibiótico en mención.

Con estos dos resultados se demuestra que la expresión transitoria de GFP después de un mes de transformación y la resistencia a higromicina-B, dan por hecho que las células del callo de *Capsicum annuum* L. se encuentran transformadas genéticamente por el sistema de biobalística, en las condiciones adecuadas de selección para obtener células con el gen de interés, y una posterior regeneración de plantas transformadas en un medio de cultivo adecuado.

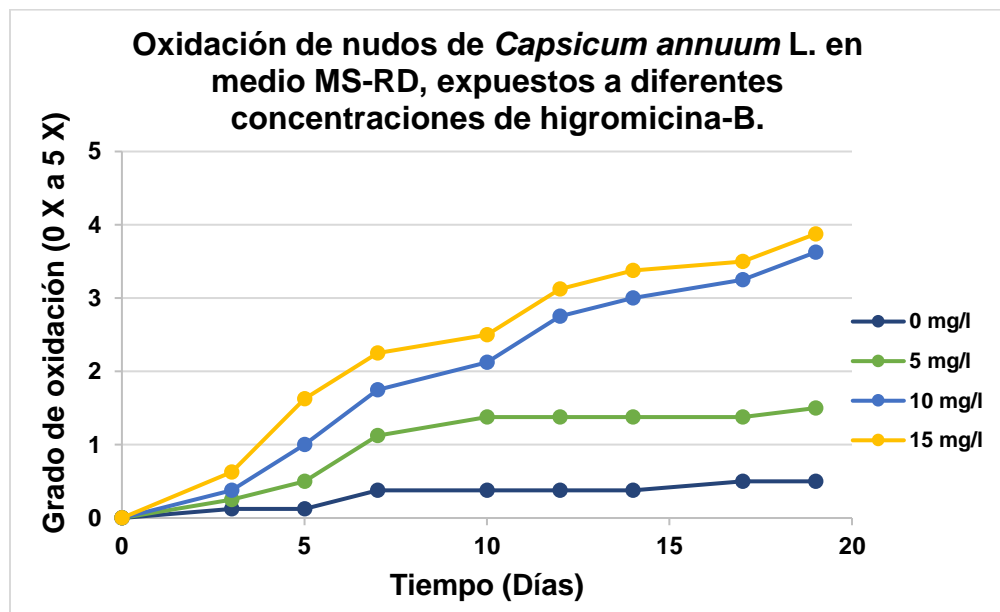
Debe resaltarse que, como resultado final, después de 120 días de incubación en el medio de selección y tras los subcultivos correspondientes, la necrosis del callo fue inminente a pesar de haber tenido la expresión transitoria de GFP. Este resultado se respalda en la agresividad de higromicina-B como agente de selección (Ismail et al., 2005) por lo cual una menor concentración de este antibiótico resultaría adecuada para obtener la selección de las células que sí están transformadas. Cabe resaltar que la muerte del callo también se ve favorecida por la oxidación intrínseca que tienen las células que no están transformadas, como lo reporta Azofeifa (2009).

6.7 Transformación genética de embriones maduros e inmaduros.

6.7.1 Determinación de la concentración letal de higromicina en nudos.

Paralelamente a la selección de la concentración letal de higromicina en callo, se obtuvo la concentración letal de nudos provenientes de plantas maduras, como se describe en la sección de materiales y métodos, siendo la concentración de 15 mg/L la ideal para llevar a cabo la selección de este explante. Cabe mencionar que la elección de esta concentración letal fue tomada cualitativamente para los nudos dando una escala en el grado de oxidación, como se muestra en la gráfica 2 y en la figura 28.

En el caso de los nudos, al realizar el análisis estadístico, se determinó de igual forma que sí existen diferencias significativas entre las concentraciones probadas para oxidar los nudos (tabla 16), destacando que con la prueba *Tukey* (tabla 17) existen diferencias significativas entre 5, 10 y 15 mg/L de higromicina-B, pero entre 10 y 15 mg/L no la hay, por lo cual con el uso de 10 mg/L se obtendrá la selección de forma adecuada. De igual forma que en los callos, el artículo publicado por Moon et al. en 2007 reporta que las plantas regeneradas y transformadas por su metodología, resisten una concentración de 10 mg/L de higromicina-B, resultados similares a los obtenidos en esta investigación.



Gráfica 2. Oxidación de nudos de plantas maduras (4 semanas de cultivo) de *Capsicum annuum* L. en medio MS-RD, expuestas a diferentes concentraciones de higromicina-B.

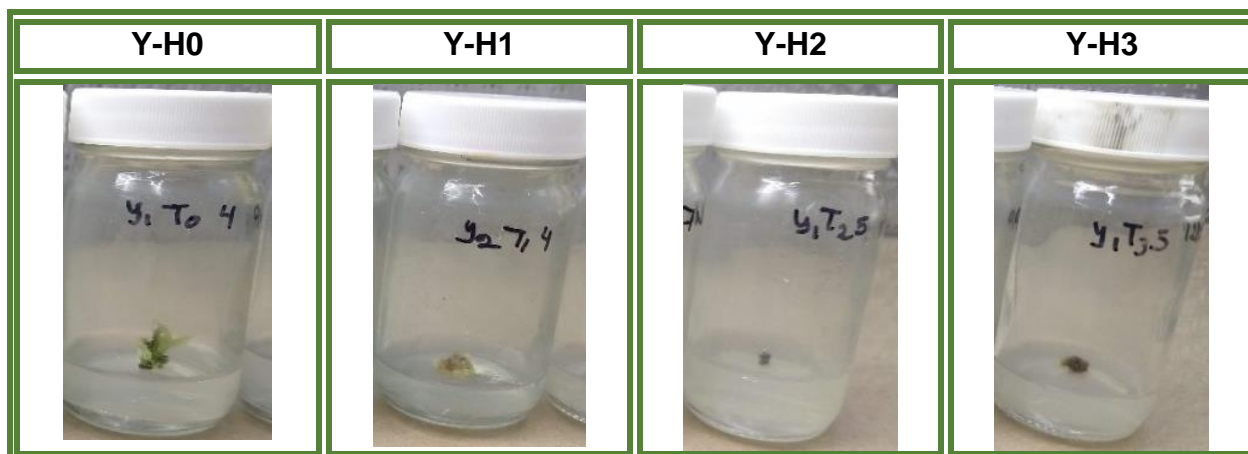


Figura 28. Nudos provenientes de plantas maduras de *Capsicum annuum* L. con 42 días de desarrollo en un medio MS-RD, incubados un mes bajo diferentes concentraciones de higromicina-B. Y-H0 (0 mg/L), Y-H1 (5 mg/L), Y-H2 (10 mg/L) y Y-H3 (15 mg/L).

Tabla 16. Análisis de varianza de los datos obtenidos para la concentración letal de higromicina-B en nudos de plantas de *Capsicum annuum* L. en medio MS-RD.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	F _c
Entre grupos	27.25	2	13.625	42.388	4.22E-08	3.469
Dentro de los grupos	6.75	21	0.32143			
Total	34	23				

Tabla 17. Prueba Tukey para determinar la diferencia significativa entre los grupos de la concentración letal de higromicina-B para nudos de plantas de chile serrano.

Cuantil de confianza		
q*	Alpha	
3.53	0.05	
Matriz del umbral HSD (HDS = 0.70757414)		
Abs. (Dif.) - HSD		

	H1 (5 mg/L)	H2 (10 mg/L)	H3 (15 mg/L)
H1 (5 mg/L)		-2.125	-2.375
H2 (10 mg/L)			-0.25
H3 (15 mg/L)			
Informe de letras de unión			
Nivel	Letra	Media	
H1 (5 mg/L)	A	1.5	
H2 (10 mg/L)	B	3.625	
H3 (15 mg/L)	B	3.875	
Lo niveles no conectados por la misma letra son significativamente distintos.			

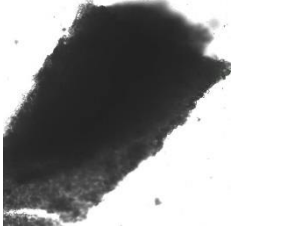

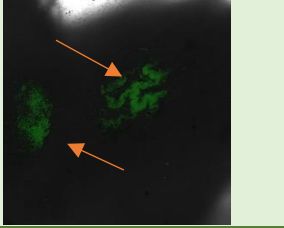

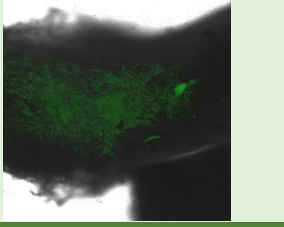
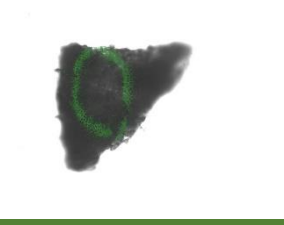
6.7.2 Comprobación de la transformación genética de embriones maduros.

La mayoría de los reportes de transformación genética para *Capsicum annum* L. utilizan como método de transformación a *Agrobacterium* spp., sin embargo la obtención de plantas transgénicas ha sido de baja eficiencia, además de que los métodos físicos aún no han sido probados a gran escala (Kothari et al., 2010; León, 2018). Con lo anterior se decidió implementar metodologías con el explante estudiado (embrión maduro e inmaduro) para elucidar si en alguno de éstos la transformación era exitosa.

Los resultados de la segunda transformación genética se muestran en la figura 29, mostrando que cinco días después del bombardeo de micropartículas la expresión transitoria de GFP se había obtenido, pero a una baja visualización respecto a lo que se obtuvo en callo proveniente de embrión inmaduro (figura 27), justificando lo anterior a que el pericarpio de la semilla es una barrera que impide el paso de partículas al interior de ésta, y el caso de la transformación genética por biobalística no todas las partículas pasaron hacia el centro de la misma. De igual forma se observa que en la distancia de 9 cm, en ambos medios, son aquellas que muestran una mayor cantidad de zonas de expresión transitoria

Una vez que las semillas se incubaron en los respectivos medios, 32 días después se visualizó que éstas comenzaron a morir a pesar de haber tenido expresión transitoria cinco días después de su transformación, destacando que las plantas del medio N6P se desarrollaron normalmente en un inicio, pero su fase final fue entre plántula y callo,

influenciado por el medio en el que se encontraban. Por su parte las plantas en el medio MS-RD se desarrollaron correctamente en un inicio, pero bajo la influencia del agente de selección éstas perecieron. Cabe destacar que se observó una mayor resistencia de las semillas que se transformaron a una distancia de 9 cm con micropartículas de 0.4 μm , mostrando entonces que cualitativamente para las semillas la distancia adecuada es de 9 cm y sin haber obtenido plantas completas, se logró que algunas células de la semilla se transformaran y comenzaran a sintetizar la enzima que degrada el agente de selección respecto a las otras semillas transformadas que se desarrollaron en menor medida.

	Expresión transitoria GFP (5 días)	Plantas transformadas en selección con higromicina-B (15 mg/L) (32 días)
Control Negativo Medio MS-RD		
T1 09 cm 0.4 μm		
T2 09 cm 0.7 μm		
T3 12 cm 0.4 μm		

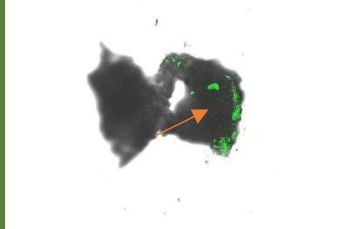
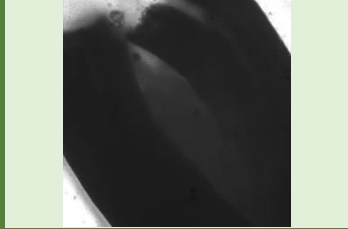



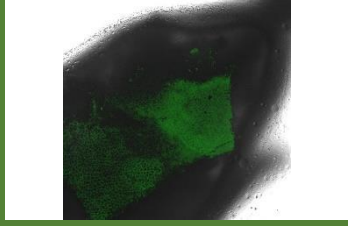



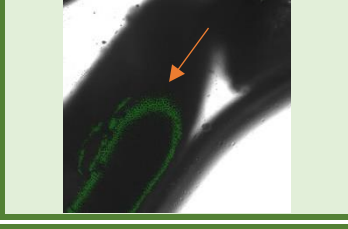
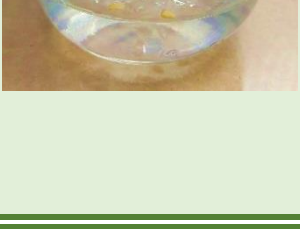
<p>T4 12 cm 0.7 μm</p>		
<p>Control Negativo Medio N6P</p>		
<p>T5 09 cm 0.4 μm</p>		
<p>T6 09 cm 0.7 μm</p>		
<p>T7 12 cm 0.4 μm</p>		
<p>T8 12 cm 0.7 μm</p>		

Figura 29. Resultados cualitativos de la transformación genética de semillas maduras de *Capsicum annuum* L. (chile serrano) probando diferentes parámetros dentro de la transformación genética por biobalística (distancia y tamaño de bala) en el segundo ensayo.

6.7.3 Comprobación de la transformación genética de embriones inmaduros.

A diferencia del ensayo dos (E2), con la finalidad de obtener una mayor eficiencia se utilizaron dos disparos así como el tamaño de partícula más grande y una distancia mayor, ya que lo reportado por Zaragoza (2016) y López (2016), demuestra que para la transformación genética de *Capsicum annuum* L. cuando la distancia de las micropartículas al tejido es de 12 cm, se utilizan balas de diámetro 0.7 μm y se realizan dos disparos en el tejido, se obtiene una mayor expresión transitoria de proteínas fluorescentes, destacando que la aplicación de estas condiciones es para el tejido de callo y no de semillas.

Una vez realizada la transformación genética, los embriones inmaduros formaron inicialmente un callo que fue prolífero en el medio MS-RD, resultado contrario a lo obtenido en los embriones maduros del ensayo dos (E2), esto debido a la inmadurez de las mismas semillas en donde la cantidad de auxinas y citocininas endógenas es mayor respecto a embriones maduros, debido a una fase de histodiferenciación (Matilla, 2007), que en conjunto con los nutrientes del medio formaron células no diferenciadas. El callo obtenido no se desarrolló considerablemente una vez que se fue agregando el agente de selección, quedando prácticamente estático su crecimiento (figura 30); tras cuatro meses de haber sido subcultivado y seleccionado, al observar la expresión transitoria de GFP fue ausente (figura 30), sin embargo, sí se observaron ciertas zonas en donde el callo se desarrolló. Debido a que se contó con una poca cantidad de callo, se tomaron muestras mínimas para la visualización de la expresión transitoria, situación que a pesar de tener callo en desarrollo éste no era el que estaba transformado y resistiendo el agente de selección.

Se desarrollaron cinco plántulas de chile un mes después de la transformación genética, éstas provenientes de las mismas semillas inmaduras bombardeadas; tres plantas provenientes de las semillas bombardeadas con el plásmido 1 y dos plantas provenientes del bombardeo con el plásmido 2. Tras cuatro meses del bombardeo y un subcultivo cada mes en el medio MS-RD, aumentando gradualmente el agente de selección (higromicina-B) hasta 15 mg/L, las únicas plantas que sobrevivieron fueron las que se bombardearon con el plásmido 2 (figura 31).

Al obtener las plantas resistentes al agente de selección tras cuatro meses en él, se observó en el microscopio confocal la expresión transitoria de GFP, siendo positiva para ambas plantas obtenidas, como se muestra en la figura 31. Debe destacarse que la planta “B” es la que mayor cantidad de zonas de expresión transitoria mostró, abarcando prácticamente toda la hoja desarrollada, enfatizando que para esta planta no se tomaron las hojas cotiledonarias sino la primera hoja verdadera desarrollada. La obtención de las plantas genéticamente modificadas, únicamente las transformadas con el plásmido 2 que contiene el gen de interés CaPPa4 (pirofosfatasa 4), se debe posiblemente a la resistencia que ofrece la sobreexpresión de los pirofosfatasa 4, enzima que interviene en la resistencia a factores que generan estrés sobre la planta (Gutiérrez *et al*, 2016).

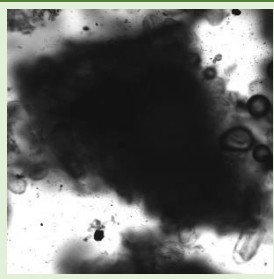




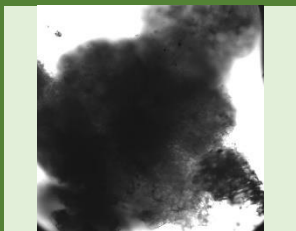

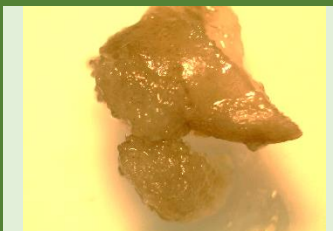
	Expresión GFP 4 meses	Callo transformado en selección con higromicina-B (15 mg/L) (4 meses)	
Callo Tratamiento control			
T1 Plásmido 1			
T2 Plásmido 2			

Figura 30. Observaciones del callo obtenido a partir de embriones cigóticos inmaduros de chile serrano en medio MS-RD después de cuatro meses de haber sido transformados con los plásmidos *pCAMBIA1302::FBP::GFP* (plásmido 1) y *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP* (plásmido 2) en el tercer ensayo.

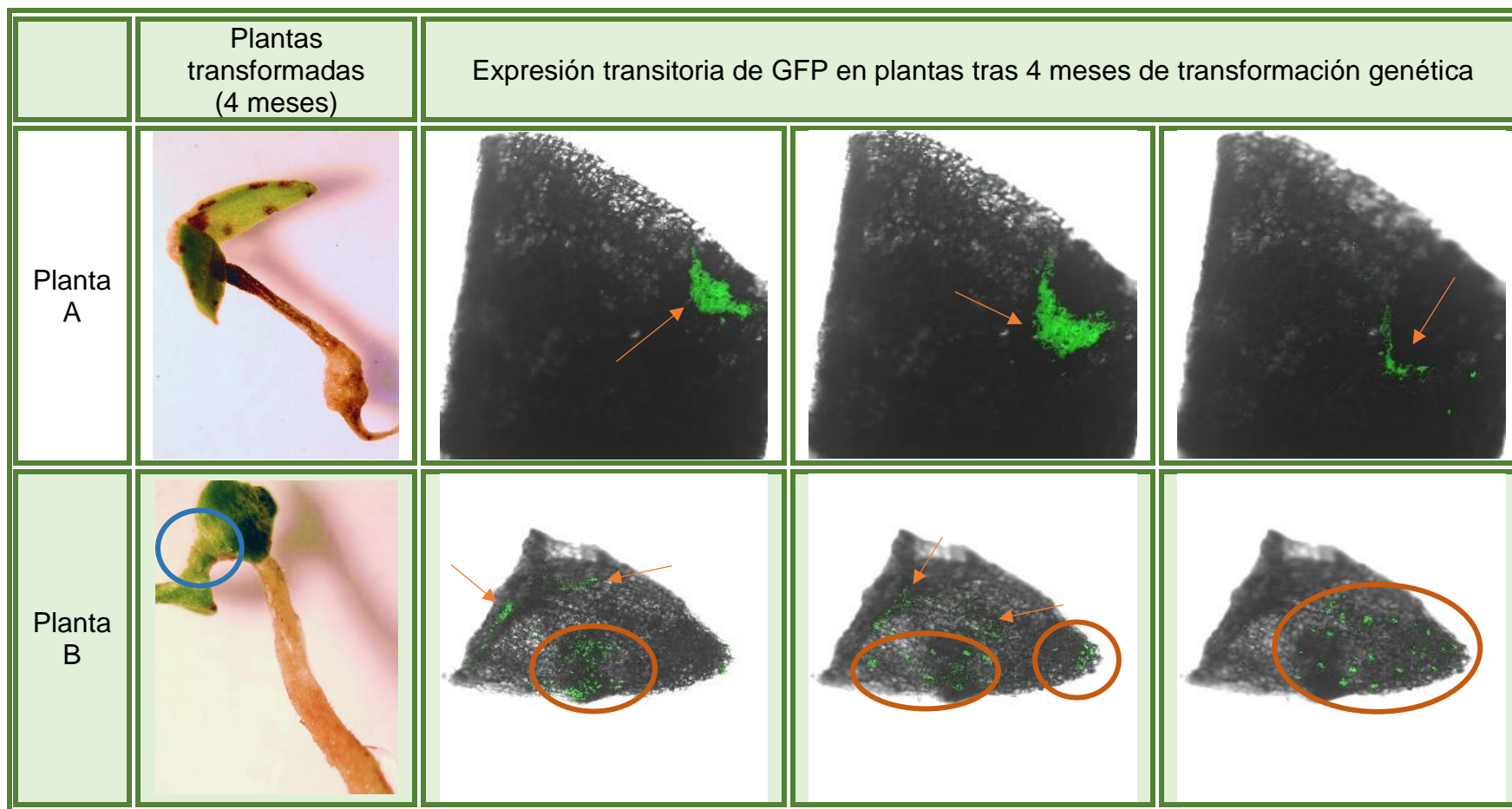


Figura 31. Plantas de chile serrano obtenidas a partir de embriones cigóticos inmaduros en el tercer ensayo tras cuatro meses de la transformación genética con el plásmido 2 (pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP), desarrolladas en medio de selección MS-RD (15 mg/L de higromicina-B).

VII. CONCLUSIONES.

- La viabilidad de las semillas de chile serrano que se tienen en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales es la adecuada para realizar diversos experimentos.
- El método de desinfección es eficaz para evitar la contaminación por hongos y/o bacterias en los cultivos *in vitro* establecidos.
- Se obtiene un callo friable y con un bajo nivel de oxidación, utilizando embriones cigóticos inmaduros como explantes, a través de un medio N6P.
- La citocinina BAP a una concentración de 3 mg/L, en un medio N6P, diferencia el callo obtenido cuando éste pasa desde un medio N6P con 2,4-D (2 mg/L).
- La obtención de embriones somáticos a partir de plántulas de chile serrano fue ausente al probar los medios de cultivo correspondientes al experimento de embriogénesis somática directa, teniendo como respuesta la formación de callo.
- El desarrollo exponencial del callo de embriones cigóticos inmaduros en medio N6P tiene presencia entre el quinto y séptimo día de subcultivo.
- La concentración letal de higromicina-B para el callo del medio N6P presenta diferencias significativas entre las concentraciones analizadas, siendo 25 mg/L la que causa mayor necrosis en callos no transformados.
- Los callos transformados genéticamente no soportaron el agente de selección tras 120 días de cultivo a pesar de haber expresado GFP treinta días después de la transformación.
- La concentración letal de higromicina-B para nudos de plantas de chile serrano presenta diferencias significativas entre las concentraciones analizadas en un medio MS-RD, siendo 15 mg/L la que mayor necrosis causó.
- La transformación de semillas maduras de chile serrano no fue posible tras la metodología utilizada, aún después de tener expresión de GFP cinco días después del bombardeo.
- La obtención de plantas genéticamente modificadas fue exitosa al transformar embriones inmaduros con el plásmido *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP* tras 4 meses de transformación en un medio MS-RD, al resistir 15 mg/L de higromicina-B y expresar la proteína GFP.

VIII. PERSPECTIVAS.

- A partir de las plantas transgénicas obtenidas, permitir el desarrollo de la misma para la posterior regeneración de brotes adventicios a partir de éstas, además de inducir callo transgénico bajo las condiciones establecidas.
- Para facilitar la metodología y evitar un mosaico genético, deben de regenerarse plantas de *Capsicum annuum* L. preferiblemente por una vía embriogénica, para su posterior implementación en la transformación genética.
- Repetir el experimento de embriogénesis somática directa utilizando embriones inmaduros, ayudándose de un método enzimático para retirar el pericarpio de la semilla, facilitando así la entrada de los componentes del medio.
- Una vez obtenido el protocolo para la obtención de embriones somáticos, transformar genéticamente embriones inmaduros bajo las condiciones establecidas, utilizando como innovación enzimas que degraden el pericarpio de la semilla, permitiendo la entrada de los componentes del medio así como de las micropartículas, y regenerando las plantas bajo la metodología de embriogénesis somática directa.
- En caso de obtener la embriogénesis somática directa de plantas transformadas de chile serrano, establecer las condiciones necesarias para madurarlas y establecerlas en condiciones de suelo.
- Realizar un análisis de biología molecular para identificar que los genes insertados estén presentes en las plantas transformadas.

ANEXO I. Vectores de expresión utilizados en la transformación genética.

Se presentan en este anexo las construcciones de los plásmidos utilizados en las transformaciones genéticas reportadas en esta investigación. El plásmido 1 (*pCAMBIA1302::FBP::GFP*) es un vector de expresión diseñado por Vega (2019) en donde buscó la secuencia de un promotor de gran expresión en chile serrano (FBP-aldolasa), ligándolo al vector binario de *Agrobacterium sp.* para la transformación de plantas con la resistencia a Kanamicina e higromicina-B, además de una secuencia de genes para la expresión de GFP (figura 32).

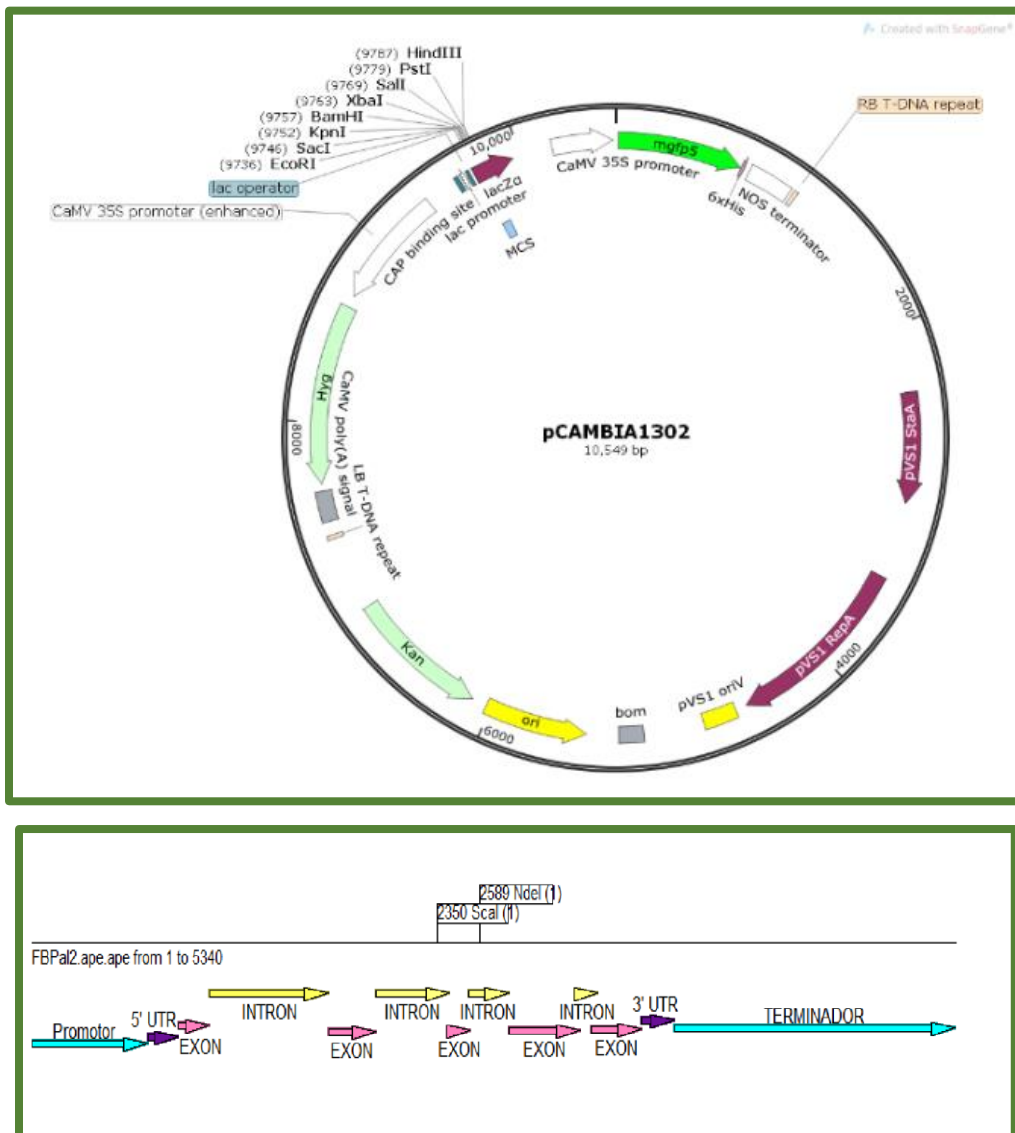


Figura 32. Mapa general del vector de expresión (plásmido) *pCAMBIA1302::GFP* (superior) al que se le añadió la secuencia del promotor FBP-aldolasa (inferior), diseñado por Vega (2019).

El segundo plásmido utilizado (*pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP*) fue elaborado por Salazar (2019), utilizando el plásmido de Vega (2019) al que se le añadió al promotor FBP la secuencia del gen de interés del grupo de investigación del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, siendo aquel que sintetiza la pirofosfatasa 4 del chile serrano (*CaPPa4*), teniendo de igual forma la resistencia a Kanamicina e higromicina-B y los genes para la expresión de GFP (figura 33).

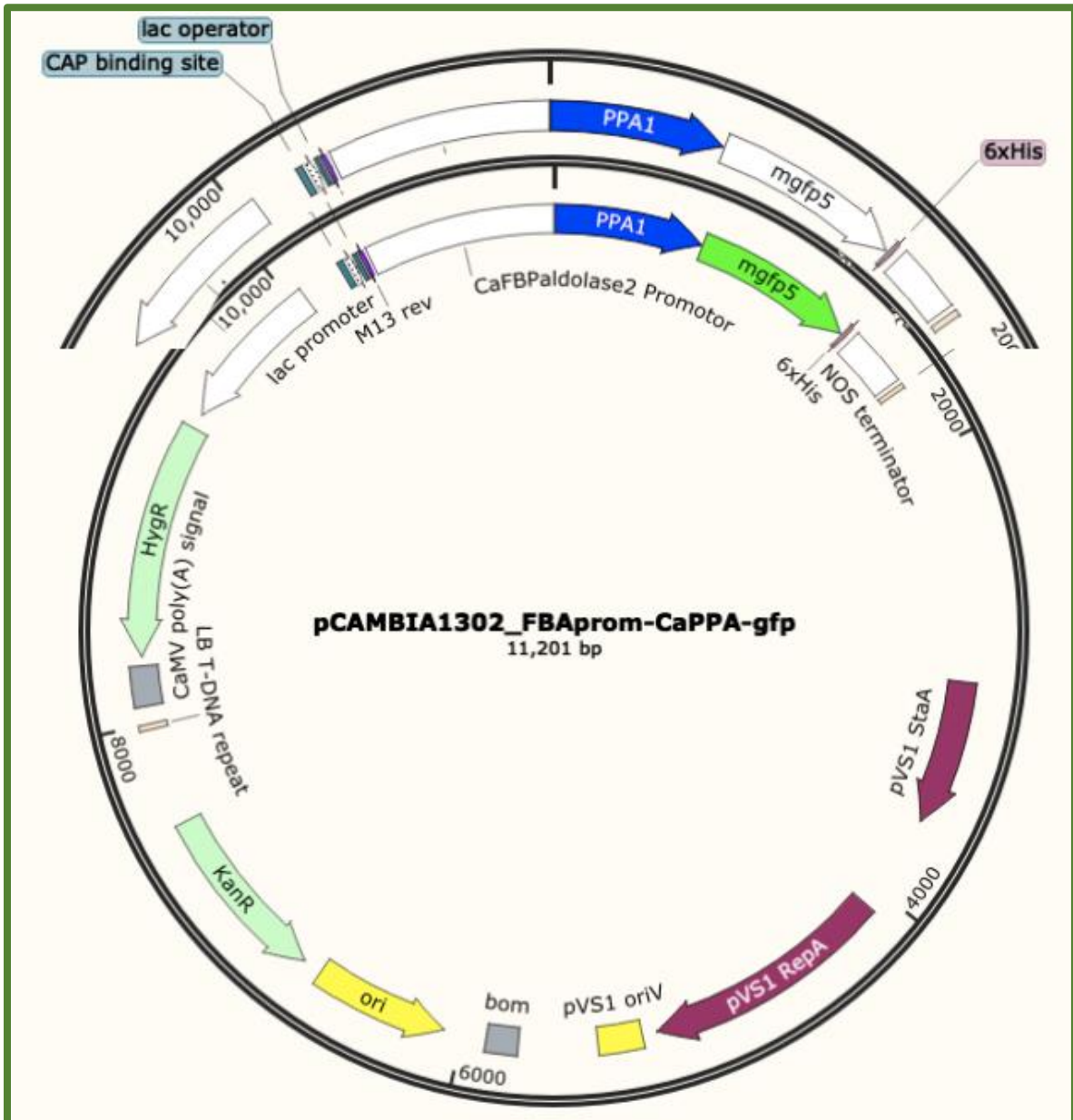


Figura 33. Mapa general de los vectores de expresión (plásmidos) *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4-stp* (superior) y *pCAMBIA1302::FBP::CaPPa4::GFP* (inferior) diseñados por Salazar (2019).

ANEXO II. Composición de macro y micronutrientes de los medios MS, N6 y WPM.

Tabla 18. Macro y micronutrientes de los tres medios generales utilizados.			
	MS (Murashige & Skoog, 1962)	N6 (Chu et al. 1975)	WPM (Lloyd & Mc Cow, 1980)
Macronutrientes (mg/L)			
<i>KNO₃</i>	1900	2830	-
<i>NH₄NO₃</i>	1650	-	400
<i>CaCl₂ * 2H₂O</i>	440	166	96
<i>MgSO₄ * 7H₂O</i>	370	185	370
<i>KH₂PO₄</i>	170	400	170
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	-	463	-
Micronutrientes (mg/L)			
<i>MnSO₄ * H₂O</i>	22.3	-	22.3
<i>MnSO₄ * 4H₂O</i>	-	4.4	-
<i>ZnSO₄ * 7H₂O</i>	8.6	1.5	8.6
<i>H₃BO₃</i>	6.2	1.6	6.2
<i>KI</i>	0.8	0.8	-
<i>CuSO₄ * 5H₂O</i>	25 µg	-	0.25
<i>Na₂MoO₄ * 2H₂O</i>	250 µg	-	0.25
<i>CoCl₂ * 6H₂O</i>	25 µg	-	-
<i>FeSO₄ * 7H₂O</i>	27.8	27.8	27.8
<i>Na₂EDTA * 2H₂O</i>	37.3	37.3	37.3
<i>myo-Inositol</i>	100	-	100
<i>Tiamina-HCl</i>	0.1	1.0	1.0
<i>Ácido Nicotínico</i>	0.5	0.5	0.5
<i>Piridoxina-HCl</i>	0.5	0.5	0.5
<i>Biotina</i>	-	0.05	-
<i>Ácido Fólico</i>	-	0.5	-

ANEXO III. Procedimiento para el bombardeo de micropartículas por el método de biobalística (López, 2016)

- a. Preparación de balas de tungsteno de 0.4 y 0.7 μm
 - Pesar 30 mg de micropartículas de tungsteno en un tubo de 1.5 mL.
 - Agregar 1 mL de etanol al 70%.
 - Agitar de 3 a 4 minutos en vórtex e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
 - Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
 - Eliminar sobrenadante con micropipeta.
 - Lavar tres veces con agua estéril y quitar sobrenadante.
 - Adicionar 500 μl de glicerol al 50% para tener una concentración final de 30 mg/L.
 - Hacer alícuotas de 500 μL y almacenar a -20°C
- b. Preparación de espermidina (0.1 M) y Cloruro de Calcio (2.5 M)
 - Pesar 1.4525 g de espermidina y 2.7745 g de CaCl_2
 - Disolver con 10 mL de agua desionizada estéril la espermidina y el CaCl_2 respectivamente, en tubos falcon previamente etiquetados.
 - Filtrar con una membrana millipore® de 0.22 μm
 - Hacer alícuotas de 500 μL en tubos Eppendorf de cada uno de los reactivos.

Bombardeo con micropartículas de tungsteno en cámara de baja presión.

1. Preparar la siguiente solución para 6 disparos.
 - Agitar las micropartículas de tungsteno en vórtex por 5 minutos.
 - Tomar una alícuota de 50 μL de las balas y colocarlo en la pared del tubo Eppendorf de 1500 μL .
 - Agitar el DNA en vórtex por 5 minutos.
 - Agregar 5 μL de DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en la pared del tubo Eppendorf
 - Tomar 50 μL de CaCl_2 (2.5 M) y poner en la pared del tubo Eppendorf, de forma que se encuentre cerca del DNA y teniendo cuidado de no mezclarlos.
 - Tomar 20 μL de espermidina (0.1 M) y arrastrar toda la mezcla hasta el fondo.

- Homogeneizar con agitación suave.
 - Dejar incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
 - Centrifugar por un minuto y retirar sobrenadante.
 - Resuspender las balas con 140 μL de etanol al 70%, centrifugar y desechar sobrenadante.
 - Resuspender las balas con 140 μL de etanol absoluto, centrifugar y desechar sobrenadante.
 - Resuspender las balas con 48 μL de etanol absoluto.
 - Agregar 8 μL de las balas preparadas al holder.
2. Realizar disparo en la cámara de biobalística.

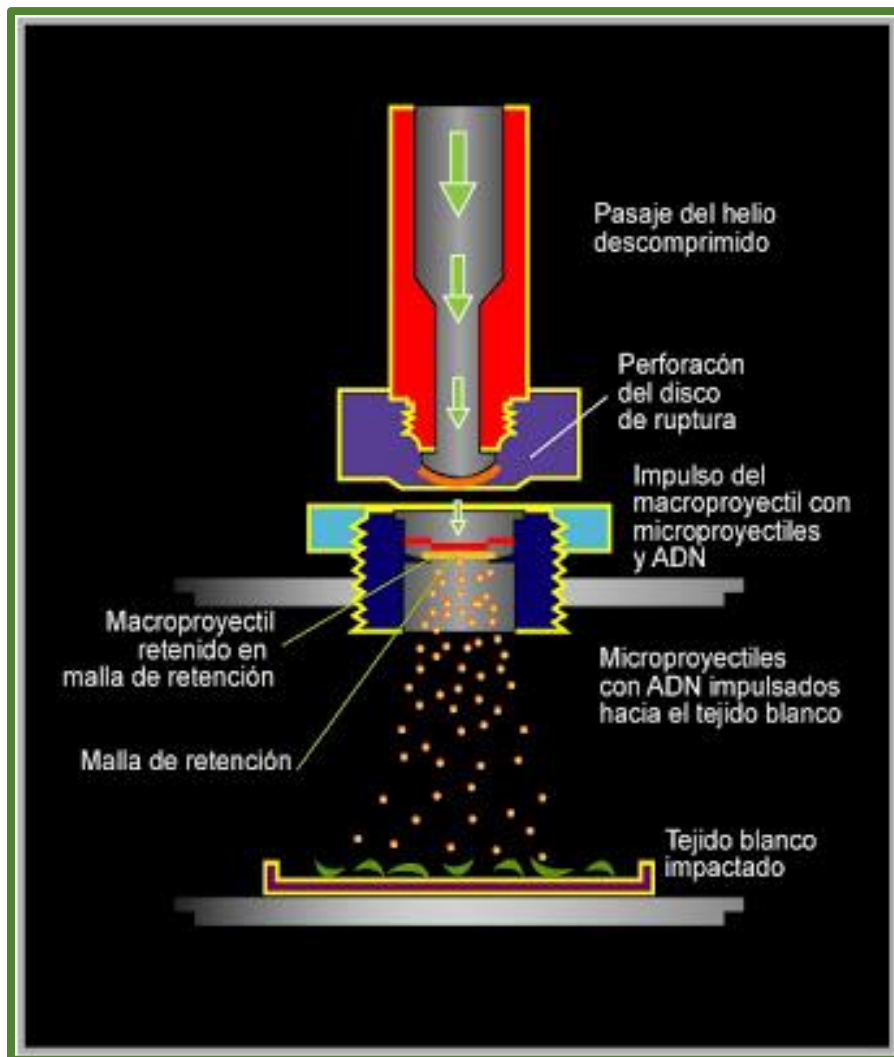


Figura 34. Esquema general del procedimiento de bombardeo de micropartículas a cultivos vegetales a través del sistema de biobalística (Fran Espinosa, 2012).

BIBLIOGRAFÍA:

- Aboshama, H.M.S. (2011) Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(6), 755-762.
- Adamczuk, A., Ciereszko, I. & Siegien, I. (2012) Morphogenesis of plants *in vitro* under stress conditions. En: Laska, G. (Eds). *Biological diversity – from cell to ecosystem*. Polish Botanical Society – Branch in Bialystok 25-40 pp.
- Aditi Raj (2016) Vectors Used in Genetic Engineering, Biotechnology. [Figura: Vectores] Recuperada el día 14 de mayo de 2019 en: <http://www.biologydiscussion.com/genetic-engineering/vectors-used-in-genetic-engineering-biotechnology/61382>
- Aguirre-Mancilla, CL., Iturriaga de la Fuente, G., Ramírez-Pimentel, J., Covarrubias-Prieto, J., Chablé-Moreno, F. & Raya-Pérez, J. (2017) El chile (*Capsicum annuum* L.), cultivo y producción de la semilla. *Ciencia y tecnología agropecuaria*, 5(1), 19-31.
- Alcántara, J., Castilla, M. & Sánchez, R. (2017). Importancia de los cultivos vegetales *in vitro* para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. *Biociencias*, 1, 71-83.
- Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S. & Van Lijsebettens, M. (2013) Higher plant transformation: principles and molecular tools. *International Journal of Developmental Biology*, 57, 483-494.
- Anguiano, J. (2010) *Comparación en la respuesta fisiológica en plantas de chile bajo el efecto de tres temperaturas nocturnas* (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Arous, S., Boussaid, M. & Marrakchi, M. (2001) Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 3(1), 17-22.
- ASERCA (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios), 2018. Chile verde - símbolo de identidad nacional. Consultado el día 18 de marzo de 2019 en: <https://www.gob.mx/aserca/articulos/chile-verde?idiom=es>
- Athanasiou, A., Smith, P., Vakilpour N., Kumaran, N., Turner, A. & Bagiokou, D. (2007) Vanilloid receptor agonists and antagonist are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364, 50-55.

- Azofeifa, Á. (2009) Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Beltrano, J. y Gimenez, D. 2015. *Cultivo en hidroponía*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Capítulo 1: Introducción al cultivo hidropónico. Pág. 10-34
- Berljak, J. (1999) *In vitro* plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. 'Soroksari') seedling explants. *Phyton (Austria)*, 39(3), 289-292.
- Breilkopf & Härtel (1901) *Capsicum annuum* L. – Antique botanical lithograph. Leipzig, Alemania.
- Bhoite, H.A. & Palkishar, G.S. (2014) Plant Tissue Culture: A review. *World Journal of pharmaceutical sciences*, 2(6), 565-572.
- Bhojwani, S. & Dantu, P. 2013. Culture Media. En: S. Bhojwani y P. Dantu eds. *Plant tissue culture: An introductory text*. India: Springer, Caps. 3, 4, 5, 6 y 15. págs. 27-28, 31-34, 39-40, 51-52, 63-64, 67, 73, 199-200 y 205-209.
- Binzel, M., Sankhla, N., Joshi, S. & Sankhla, D. (1996) Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15, 536-540.
- Bodhipadma, K. & Leung, D. (2002) Factors important for somatic embryogenesis in zygotic embryo explants of *Capsicum annuum* L. *Journal of plant biology*, 45(1), 49-55.
- Buyakalaca, S. & Mavituna, F. (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46, 227-235.
- Calva, G. & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11), 1-16.
- Carbonero, P. (1997) Plantas transgénicas. *Revista de la real academia de ciencias exactas, físicas y naturales*, 91(2), 115-120.
- Chu, C.-C., Wang, C., Sun, C., HSU, C., Yin, K., Chu, C.-Y. & Bi, F. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 18, 659-668.
- Cruz, F. 2012. Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas). FES-Cuatitlán, UNAM. [En línea] (Actualizado al 25 de marzo de 2012). Disponible en: http://asesorias.cuatitlan2.unam.mx/fondo_editorial/comite_editorial/manuales/cultivos_detejidosvegetales_manualprac.pdf (Último acceso el 01 de julio de 2019).

- Dabauza, M. & Peña, L. (2001) High efficiency organogenesis in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) tissues from different seedling explants. *Plant Growth Regulation*, 33, 221-229.
- Eshbaugh, W. (1970) A biosystematics and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, 22, 31-43.
- Fehér, A. (2015) Somatic embryogenesis – Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849, 385-402.
- Fran Espinosa (2012) Modificación genética de plantas. [Figura: Método de transformación mediante el cañón de partículas] Recuperada el día 24 de julio de 2019 en: <http://franepinosaweb.blogspot.com/2012/04/modificacion-genetica-de-plantas.html>
- Freire, M. (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 3(4), 195-209.
- Gammoudi, N., San Pedro, T., Ferchichi, A. & Gisbert, C. (2018) Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 54, 145-153.
- George, E., Hall, M. & De Klerk, G.-j (2008) *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3a Edición. AA Dordrecht: Springer.
- Godoy-Hernández, G. & Vázquez-Flota, F. 2006. Growth Measurements: Estimation of cell division and cell expansion. En: V. Loyola-Vargas y F. Vázquez-Flota eds. *Plant cell culture protocols*, 2nd ed. New Jersey, USA: Humana Press, Cap.4 Págs. 51-53 y 57.
- Gómez, L. (2016) *Establecimiento de un protocolo para la inducción de la androgénesis en Capsicum chinense Jacq.* (tesis de maestría). Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., México.
- González-Cortés, N., Jiménez, R., Guerra, E., Silos, H. & Payro, E. (2015) Germinación del chile amashito (*Capsicum annuum* L. var. *Glabriusculum*) en el sureste mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11 (16 de mayo – 29 de Junio), 2211-2218.
- Gunay, A. & Rao, P. (1978) *In vitro* plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Science Letters*, 11, 365-372.
- Gutierrez, F., Navarro, E., Valencia, L., Vázquez, S. & Rodríguez, R. (2016) Evidence for a non-overlapping subcellular localization of the family I isoforms of soluble inorganic pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant science*, 253, 229-242.

- Harini, I. & Lakshmi, S. (1993) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89, 107-112.
- Heike, V. (ed.), Hanan A., Mondragón, J. (2009) Malezas de México – *Capsicum annuum* L. Acceso: 17 de marzo de 2019. Recuperado de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/capsicum-annuum/fichas/ficha.htm>
- Hernández-Verdugo, S., Dávila, P. & Oyama, K. (1999) Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 64, 65-84.
- Husain, S., Jain, A. & Kothari, S. (1999) Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Reports*, 19, 64-68.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A. & Sugimoto, K. (2016) Plant regeneration: celular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143, 1442-1451.
- Ismail, I., Zamri, Z. & Ariffin, H. (2005) Seed transformation system using hygromycin-B selection for Malaysian chili varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 12(1), 1-7.
- Jo, J-Y., Choi, E-Y., Choi, D. & Lee, K-W (1996) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryo culture in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biology*, 39, 127-135.
- Jordán, M. & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Squeo, F, A., & Cardemil, L. (eds). Fisiología Vegetal*, 1-28.
- Joshi, A. & Kothari, S. (2007) High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 88, 127-133.
- Kaparakis, G. & Alderson, P. (2008) Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)?. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 110-114.
- Khan, H., Siddique, I. & Anis, M. (2006) Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneratlon in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*, 50, 789-792.
- Kim, M., Jang, I-C. & Kim, J-A. (2008) Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27, 425-434.

- Kintzios, S., Drossopoulos, J.B., Shortsiianitis, E. & Peppes, D. (2000) Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulture*, 85, 137-144.
- Kothari, S.L., Joshi, A., Kachhwaha, S. & Ochoa-Alejo, N. (2010) Chilli peppers – A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28, 35-48.
- León, G. (2018) *Selección de las condiciones nutrimentales que modulen la organogénesis in vitro de chile serrano (Capsicum annuum L.)* (tesis de licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Lloyd, G. & Mccow, B. (1980) Commercially feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Proceeding International Plant Propagator's Society*, 30, 421-427.
- Long-Solis, J. 1998. *Capsicum y cultura: La historia del chilli*. 2ª Edición. México. Fondo de Cultura Económica: Cap.1, 203 pp.
- López, A. (2016) *Cultivo de callos de chile serrano (Capsicum annuum L.) como modelo biológico: su caracterización transformación genética* (tesis de licenciatura). Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Loyola-Vargas, V. & Vázquez-Flota, F. 2006. An introduction to plant cell culture. En: V. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota eds. *Plant cell culture protocols, 2nd ed.* New Jersey, USA: Humana Press, Cap.1 Pág. 3-4.
- Luiz, F. & Maria, G. (2016) Production and Breeding of Chilli Peppers (*Capsicum* spp.): Chapter 2 “Physiology and Postharvest of Pepper Fruits”. Editorial: Springer. Suiza.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. 2015. *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S.A., Madrid, 2015. Cap. 5: Crecimiento y control microbiano. Página 185.
- Martínez-Antonio, A. (2011) Diseño y construcción de un minicromosoma con capacidad autorreplicativa. Memoria de congreso: XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Recuperado el día 20 de Noviembre de 2018 en: <https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/trabajos/X/orales/OX-02.pdf>

- Mandujano, M., Golubov, J. & Rojas-Aréchiga, M. (2007) Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 52(2), 46-52.
- Matilla, Á. 2007. Desarrollo y germinación de semillas. En: J. Azcón-Bieto y M. Talón eds. *Fundamentos de fisiología vegetal*, 2nd ed. Madrid, España: McGraw Hill, Cap. 27 Pág. 537-558.
- Melgar-Lalanne, G., Hernández-Álvarez, A., Jiménez-Fernández, M. & Azuara, E. (2016) Oleoresins from *Capsicum* spp.: Extraction Methods and Bioactivity. *Food Bioprocess Technology*, 10(51), 76.
- Mendoza, R. (2006) Sistemática e historia del ají *Capsicum* Tourn. *Universalia*, 11(2), 80-88.
- Mineo, L. 1990. Plant tissue culture techniques En: C. Goldman, ed. *Tested studies for laboratory teaching*. Vol. 11. Easton, Pennsylvania: Conference Association for Biology Laboratory Education (ABLE), Capítulo 9.
- Misra, P. & Saema, S. 2016. Plant tissue culture for *in vitro* mutagenesis, large-scale propagation, and genetic transformation. En: M. Anis y N. Ahmad. eds. *Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement*. Singapore: Springer, Cap. 14 Págs. 311 y 312.
- Moon, K.K. & Soh, Hyunchul & Kim, K.-M & Young, S.K. & Im, Kyunghoan. (2007). Stable Production of Transgenic Pepper Plants Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *HortScience*, 42, 1425-1430.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Neumann, K., Kumar, A. & Imani, J. 2009. *Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology. Basics and application*. Alemania: Springer, Cap. 3 y 13, págs. 22, 26-27, 31, 32, 258-259 y 265-269.
- Orellana-Escobedo, L., García-Amezquita, L., Olivas, G., Ornelas-Paz, J. & Sepulveda, D. (2013) Capsaicinoids content and proximate composition of Mexican chili peppers (*Capsicum* spp.) cultivated in the State of Chihuahua. *CyTA – Journal of Food*, 11(2), 179-184.

- Peter, J. 2004. Hormone biosynthesis, metabolism and its regulation En: P. Davis ed. *Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Traduction, action!* 3a Ed. Dordrecht: Springer, 36-203.
- Peña-Álvarez, A., Ramírez-Maya, E. & Alvarado-Suárez, L. (2009) Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2843-2847.
- Rose, R., Mantiri, F., Kurdyukov, S., Chen, S., Wang, X., Nolan, K. & Sheahan, M. 2010. Developmental biology of somatic embryogenesis. En: E. Pua y M. Davey. eds. *Plant developmental biology – Biotechnological perspectives. Vol. 2* Alemania: Springer, Cap. 1, Pág. 20.
- Salazar, P. (2019) *Diseño y obtención de un vector para la expresión de la pirofosfatasa inorgánica soluble isoforma 4 de Capsicum annum L. bajo el control del promotor de la Fructosa-1,6-Bifosfato Aldolasa de dicha especie.* (tesis de licenciatura en preparación). Facultad de Química, UNAM.
- Sanatombi, K. & Sharma, G. (2008) In vitro plant regeneration in six cultivars of *Capsicum* spp. using different explants. *Biologia Plantarum*, 52(1), 141-145.
- Sanford, J. (2000). The development of the biolistic process. *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant*, 36, 303-308.
- Sharma, P. & M.V. Rajam (1995) Genotype, explant and position effects on organogenesis and embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena*). *Journal of Experimental Botany*, 46, 135-141.
- Smith, R. 2013. *Plant Tissue Culture: Techniques and experiments*, 3rd ed. USA: Elsevier, Cap. 3, 6 & 7. Págs. 31-33, 36-37, 63-64, 71-72, 81-82 y 84.
- Stoller, J. (2004) Crop health guide maximizing plant genetic expression. Stoller Enterprises Inc. Houston, Texas, E.E.U.U. 19 pp.
- Thorpe, T. 2013. History of plant cell culture. En: R. Smith ed. *Plant Tissue Culture: Techniques and experiments*, 3rd ed. USA: Elsevier, Cap. 1, Págs. 1 y 2.
- Umamaheswari, A. & Lalitha, V. (2007) *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annum* L. on the callus induction and production of capsaicin. *Journal of Plant Sciences*, 2(5), 545-551.

- USDA Nutrient Data Base. Oranges, raw, all comercial varieties, 2019. Consultado el día 20 de Octubre de 2019 en: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169097/nutrients>.
- Usman, M., Raffi, M., Ismail, M., Malek, A. & Latif, M. (2014) Capsaicin and Dihydrocapsaicin determination in Chili Pepper genotypes using ultra-fast liquid chromatography. *Molecules*, 19, 6474-6488.
- Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, M., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C. & Nieto-Pelayo, Y. (2007) La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 353-360.
- Vega, J. (2019) *Búsqueda, clonación y construcciones con promotores de alta expresión en Capsicum annum L. serrano*. (tesis de licenciatura en preparación). Facultad de Química, UNAM.
- Venkataiah, P., Thamidala, C. & Karampuri, S. (2006) *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. *Scientia Horticulturae*, 107, 117-122.
- Yáñez, P., Balseca, D., Rivadeneira, L. & Larenas, C. (2015) Características morfológicas y de concentración de capsaicina en cinco especies nativas del género *Capsicum* cultivadas en Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 22(2), 12-32.
- Zaragoza, F. (2016) *Establecimiento, caracterización y transformación de cultivos in vitro de dos especies del género Capsicum (C. annum L. y C. chinense Jacq.)* (tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.