

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



Respuesta cultural y morfogénica en explantes de cultivares de pimiento

Trabajo final de grado

Autor: Rose Ann Tee Castillo

Primer tutor: Alejandro Atarés Huerta

Segundo tutor: Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental: Marybel Jáquez Gutiérrez

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2019



Título: Respuesta cultural y morfogenética en explantes de cultivares de pimiento

Resumen: El cultivo *in vitro* incluye un conjunto de técnicas que permiten la multiplicación, mejora sanitaria y mejora genética vegetal. Algunas de estas técnicas son la micropropagación, el método haplo-diploide, la transformación genética y la edición génica, entre otros. Algunas de las principales ventajas del cultivo *in vitro* frente a la mejora genética por métodos clásicos son el mayor control sanitario, mayor rapidez en la obtención de logros y la posibilidad de superar barreras sexuales. La base sobre la que se fundamenta estas técnicas es la morfogénesis *in vitro* el cual puede seguir dos rutas alternativas: organogénesis (axilar o adventicia) o embriogénesis somática.

El objetivo de este trabajo es obtener un sistema de regeneración eficiente y reproducible mediante organogénesis adventicia para cinco variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.) que pueda ser útil para futuros programas de mejora en los que se apliquen técnicas de cultivo *in vitro*. Esta especie presenta, en general, una menor capacidad de regeneración y, como consecuencia, la puesta a punto de estas metodologías resulta más complicada que en otros miembros de la familia *Solanaceae* (como el tomate o el tabaco). En este caso se ha trabajado con diferentes tipos de explante y de medios de cultivo para alcanzar el objetivo planteado.

Palabras clave: *Capsicum annuum*- Organogénesis adventicia- Cultivo *in vitro*.

Autor: Rose Ann Tee Castillo

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2019

Primer tutor: Alejandro Atarés Huerta

Segundo tutor: Vicente Moreno Ferrero

Directora experimental: Marybel Jáquez Gutiérrez

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG/M: Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc)

Title: Cultural and morphogenetic response in explants of pepper cultivars.

Abstract: Plant tissue culture includes a set of techniques that allow the multiplication, sanitary improvement and plant genetic improvement. Some of these techniques are micropropagation, the haplo-diploid method, genetic transformation and gene editing, among others. Some of the main advantages of plant tissue culture against genetic improvement by classical methods are greater health control, faster achievement and the possibility of overcoming sexual barriers. The basis on which these techniques are based is in vitro morphogenesis which can follow two alternative routes: organogenesis (axillary or adventitious) or somatic embryogenesis.

The objective of this work is to obtain an efficient and reproducible regeneration system through adventitious organogenesis for five varieties of pepper (*Capsicum annuum* L.) that may be useful for future improvement programs in which in vitro cultivation techniques are applied. This species presents, in general, a lower capacity for regeneration and, therefore, the development of these methodologies is more complicated than in other members of the Solanaceae family (such as tomato or tobacco). In this case we have worked with different types of explant and culture media to achieve the stated objective.

Keywords: *Capsicum annuum*- Adventitious organogenesis- Plant tissue culture

Títol: Resposta cultural i morfogenética en explants de cultivars de pimentó

Resum: El cultiu *in vitro* inclou un conjunt de tècniques que permeten la multiplicació, millora sanitària i millora genètica vegetal. Algunes d'aquestes tècniques són la micropropagació, el mètode haplo-diploide, la transformació genètica i l'edició gènica, entre d'altres. Algunes de les principals avantatges del cultiu *in vitro* enfront de la millora genètica per mètodes clàssics són el major control sanitari, major rapidesa en l'obtenció d'èxits i la possibilitat de superar barreres sexuals. La base sobre la qual es fonamenta aquestes tècniques és la morfogènesi *in vitro* el qual pot seguir dues rutes alternatives: organogènesi (axil·lar o adventícia) o embriogènesi somàtica.

L'objectiu d'aquest treball és obtenir un sistema de regeneració eficient i reproduïble mitjançant organogènesi adventícia per a cinc varietats de pebrot (*Capsicum annuum* L.) que pugui ser útil per a futurs programes de millora en els quals s'apliquin tècniques de cultiu *in vitro*. Aquesta espècie presenta, en general, una menor capacitat de regeneració i, com a conseqüència, la posada a punt d'aquestes metodologies resulta més complicada que en altres membres de la família Solanaceae (com el tomàquet o el tabac). En aquest cas s'ha treballat amb diferents tipus d'explants i de medis de cultiu per a assolir l'objectiu plantejat.

Paraules clau: *Capsicum annuum* – Organogènesi adventícia – Cultiu *in vitro*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a lo largo de estos años.

A Vicente Moreno por permitirme formar parte de su grupo de investigación en el laboratorio 0.07 donde he conocido a tantas buenas personas con las que he compartido un año de risas, comida internacional y café. Gracias también a Alejandro Atarés por estar siempre dispuesto a resolver todas mis dudas con paciencia y dedicación.

A mis amigos que tanto aprecio y a la gente tan maravillosa que he conocido este año.

Tito y tita, gracias por escucharme desde tan lejos. Y desde aún más lejos, a mi lola Santa. Doy gracias a mis padres. Por permitirme estudiar y abrirme tantas puertas aún por descubrir. Y, por último, a mis hermanas por escucharme y apoyarme siempre.

A todos vosotros, *Salamat*.

ÍNDICE

1	Introducción	1
1.1	Origen y domesticación del <i>Capsicum annuum</i> L.....	1
1.2	Descripción botánica	1
1.3	Usos e importancia económica del pimiento.....	3
1.4	Mejora genética del pimiento mediante métodos clásicos	5
1.5	Fundamentos del cultivo <i>in vitro</i>	7
1.6	Aplicaciones de técnicas de cultivo <i>in vitro</i> en la mejora genética del pimiento	8
2	Objetivos	11
3	Materiales y métodos.....	12
3.1	Material vegetal	12
3.1.1	Genotipos	12
3.2	Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	12
3.2.1	Trabajo en condiciones asépticas.....	13
3.2.2	Preparación y esterilización de los medios de cultivo	13
3.2.3	Esterilización de semillas.....	14
3.2.4	Obtención del material vegetal.....	14
3.2.5	Cultivo de explantes	18
3.2.6	Condiciones de crecimiento del material vegetal	19
3.3	Regeneración de plantas.....	19
3.3.1	Inducción de la organogénesis adventicia	19
3.3.2	Elongación de los ápices.....	21
3.3.3	Enraizamiento de los brotes y aclimatación de las plantas	22
3.4	Análisis estadístico	23
4	Resultados y discusión	24
4.1	Esterilización y germinación de las semillas de pimiento	24
4.2	Evaluación de la capacidad organogénica del pimiento	26
4.2.1	Eficacia de la regeneración de explantes de hoja	26
4.2.3	Eficacia de regeneración de explantes de cotiledón e hipocótilo.....	30
4.3	Obtención de brotes elongados.....	33
4.4	Enraizamiento y aclimatación de las vitroplantas.....	34
5	Conclusiones.....	36
6	Bibliografía	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de una planta de <i>Capsicum annuum</i>	2
Figura 2. Principales países productores de pimiento en el año 2017	4
Figura 3. Principales Comunidades Autónomas productoras de pimiento en España en 2018... 4	4
Figura 4. Fenotipo de alguna de las variedades de pimiento empleadas.....	12
Figura 5: Plántulas axénicas de pimiento obtenidas a partir de la germinación en MG de semillas previamente esterilizadas..	15
Figura 6. Cortes realizados (línea amarilla) a la plántula axénica de pimiento para obtener explantes de cotiledón (c) e hipocótilo (h).....	16
Figura 7. Obtención de planta axénica de pimiento a partir de una plántula A) Cultivo de ápice meristemático en medio MB3. B) Planta axénica en medio MB3 al cabo de 30 días de cultivo.17	17
Figura 8. Cortes realizados (línea amarilla) a la planta axénica de pimiento para obtener explantes de limbo (l) y peciolo (p)	17
Figura 9. Cultivo de explantes obtenidos a partir de plántula axénica. A) Cultivo de explantes de hipocótilo. B) Cultivo de explantes de cotiledón	18
Figura 10. Cultivo de explantes obtenidos a partir de planta axénica. A) Cultivo de explantes de limbo. B) Cultivo de explantes de peciolo.....	18
Figura 11. Etapas de la organogénesis adventicia en pimiento. A) Callo desorganizado. B) Yemas adventicias. C) Ápice. D) Brote	21
Figura 12. Enraizamiento y aclimatación de una planta de pimiento cultivada <i>in vitro</i> . A) Planta de pimiento cultivada <i>in vitro</i> . B) Raíz de la planta de pimiento cultivada <i>in vitro</i> . C) Planta de pimiento en proceso de aclimatación.....	23
Figura 13. Contaminación endógena procedente de semilla contaminada en medio de germinación.....	25
Figura 14. Crecimiento asincrónico de las semillas previamente esterilizadas de pimiento.	26
Figura 15: Eficacia de regeneración de los explantes de limbo de las accesiones CA2, CA4 y CA5 en función del medio organogénico	27
Figura 16: Eficacia de regeneración de los explantes de limbo de las accesiones CA2, CA4 y CA5 en función del medio organogénico	28
Figura 17: Formación de callo desorganizado en los cuatro explantes evaluados: cotiledón, hipocótilo, limbo y peciolo (de izquierda a derecha).....	29
Figura 18: A) Yemas en explante de limbo de la accesión CA2 cultivado en medio NTdz. B) Yemas en explante de peciolo de la accesión CA4 en medio ITdz.....	30
Figura 19. Eficacia de la regeneración de los explantes de cotiledón e hipocótilo de la accesión CA4 en los medios IZ, NZ e ITdz.....	31
Figura 20. Eficacia de la regeneración de los explantes de cotiledón e hipocótilo de la accesión CA5 en los medios IZ, NZ e ITdz.....	31
Figura 21: Yemas en explante de cotiledón de la accesión CA4 cultivado en medio NTdz. B) Yemas en explante de peciolo de la accesión CA5 en medio ITdz.....	32
Figura 22. Brotes en explantes de distintas condiciones en medio de elongación FCu. A) Brote del explante de hipocótilo de la accesión CA5 cultivado primero en medio ITdz y subcultivado a medio de elongación FCu. B) Brote del explante de cotiledón de la accesión CA2 cultivado primero en medio IZ y subcultivado a medio de elongación FCu.....	34
Figura 23. Planta de pimiento aclimatada y cultivada en el invernadero	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de germinación (MG).....	15
Tabla 2. Composición del medio base MB3	16
Tabla 3. Combinaciones de hormonas, auxinas y citoquininas, que tenían los medios empleados para inducir la organogénesis adventicia.	20
Tabla 4. Composición del medio de elongamiento FCu.....	21
Tabla 5. Proporción de semillas pregerminadas y de plántulas libres de contaminación obtenidas en cada uno de los genotipos y condiciones de esterilización respecto del número de semillas esterilizadas.....	24

1 Introducción

1.1 Origen y domesticación del *Capsicum annuum* L.

Dentro de la familia *Solanaceae* existen 25 especies del género *Capsicum*, de las cuales sólo cinco han sido domesticadas y cultivadas mundialmente: *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. annuum*. Aunque las cuatro primeras tienen variedades comestibles, muchas de ellas utilizadas como condimento picante, *Capsicum annuum*, es la especie más conocida y cultivada en los países de clima subtropical y templado y sobre la que hay mayores trabajos de mejora genética en este género. Además, es la especie que presenta la mayor variabilidad en cuanto a forma, tamaño y color de los frutos.

El centro de origen y domesticación del pimiento se sitúan en México según investigaciones recientes (Kraft et al., 2014). Los Nativos Americanos, basándose en su intuición y sentido común (selección automática), fueron los encargados de su domesticación para adaptarlo a sus necesidades. Cristóbal Colón fue el encargado de introducir el pimiento en España, en 1493, desde donde se distribuyó rápidamente al resto de Europa y del mundo. La posibilidad de sustituir a la carísima pimienta (*Piper nigrum* L.) procedente de oriente y la facilidad de cultivo por su capacidad de adaptación a las condiciones edafoclimáticas de muchos países fueron las causas principales de su rápida expansión mundial a lo largo del siglo XVI (Bartolomé et al., 2015).

1.2 Descripción botánica

Las plantas de la especie *Capsicum annuum* son herbáceas y perennes con un ciclo de cultivo anual. Su sistema radicular es pivotante y profundo, provisto de numerosas raíces adventicias que pueden alcanzar entre 50 cm y 1 m horizontalmente. El tallo es de crecimiento limitado y erecto. A partir del punto denominado 'cruz', emite 2 o 3 ramificaciones dependiendo de la variedad y continúa ramificándose hasta el final del ciclo. Las hojas son lampiñas, enteras, ovales o lanceoladas con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un peciolo largo y poco aparente. El haz es de color verde más o menos intenso, brillante y

glabro. La inserción de las hojas en el tallo es de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad. Existe cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto.

Las flores son pequeñas de corola blanca. Aparecen solitarias en cada nudo del tallo e insertadas en las axilas de las hojas. La polinización es autógama, aunque existe un 10% de alogamia. El fruto es una baya semicartilaginosa y deprimida de color variable (rojo, amarillo, verde, naranja, violeta o blanco). Se pueden insertar pendular o enhiestamente y son de forma y tamaño muy variables en función de la variedad. Las semillas son redondeadas y reniformes, de 3 a 5 mm de longitud y suelen ser de color amarillo pálido. Además, se encuentran insertadas sobre una placenta cónica de disposición central.



Figura 1. Ilustración de una planta de *Capsicum annuum*. Fuente: Köhler's Medicinal Plants, 1887.

1.3 Usos e importancia económica del pimiento

El pimiento tiene gran importancia económica mundial por los diversos usos que tiene debido a la gran variedad de formas, colores, sabores, pungencia y aromas de sus frutos.

El pimiento es un componente importante de la dieta humana en casi todos los países del mundo, ya sea como alimento cocido o como alimento crudo, destacando por su alto contenido en las vitaminas A y C. Además, en la industria alimentaria, el pimiento tiene diversas aplicaciones. En primer lugar, se emplea como colorante, a partir de la extracción de pigmentos de ciertas variedades del pimiento (Lobo et al., 2017). También se puede usar como saborizante, a partir de la extracción de la capsicina la cual se emplea para aportar pungencia controlada a los alimentos procesados. Por último, otro uso basado en la pungencia de algunas variedades de la especie *Capsicum annuum* es como principio activo de cremas y parches relajantes de la musculatura presentes en la industria farmacéutica.

El pimiento también se puede encontrar como planta ornamental debido, de nuevo, a la gran diversidad de formas, tamaños y colores de sus frutos. Además, su uso se ve favorecido por su buena adaptación a crecimiento tanto en maceta de interior como en un jardín al aire libre.

De acuerdo con la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas, durante el año 2017, en el mundo se produjeron 36 millones de toneladas de pimiento repartidas en 2 millones de hectáreas. China es el mayor productor de esta hortaliza con un promedio de 17 millones de toneladas de pimiento (47,2% de la producción mundial) cosechadas en más de 761.000 hectáreas. El segundo lugar lo ocupa México con una producción de 3,3 millones de toneladas (9.2% de la producción mundial) cosechadas en un área de 160.000 hectáreas. España ocupa el primer lugar de los países europeos y quinto a nivel mundial en producción del pimiento con 1,3 millones de toneladas en un área cultivada de 20.000 hectáreas (Figura 2).

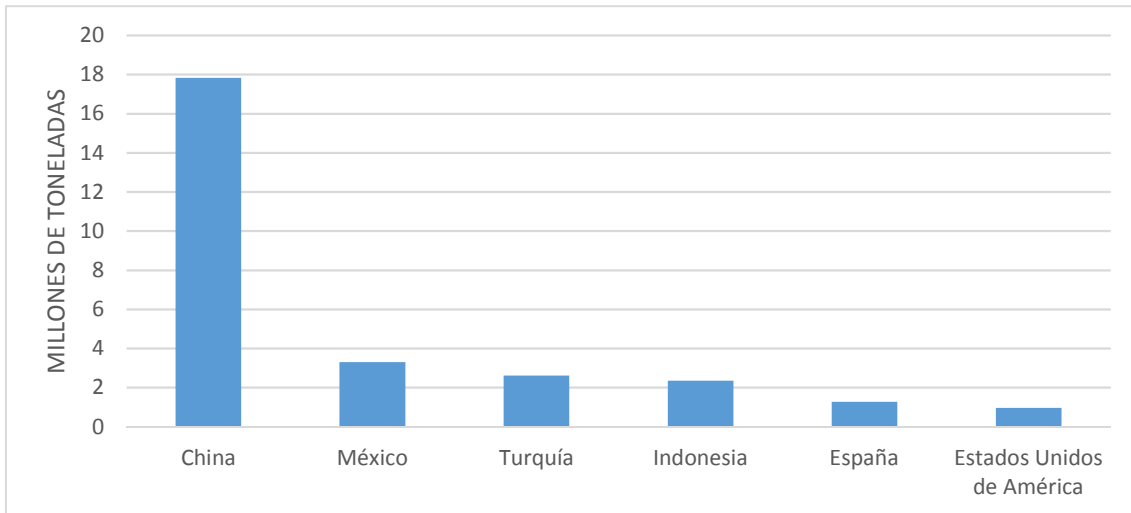


Figura 2. Principales países productores de pimiento en el año 2017. Fuente: FAOSTAT,2017.

En España, el pimiento es un cultivo con tres destinos de consumo: pimiento fresco, para pimentón y para conserva. Según los datos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el 58% de pimiento producido en España en el año 2018 proviene de Andalucía, concretamente de Almería, con 732.989 toneladas repartidas en 10.181 hectáreas. A mucha distancia le siguen Murcia con 163.989 toneladas en 1.549 hectáreas y Galicia con 68.499 toneladas en 1.190 hectáreas (Figura 3).

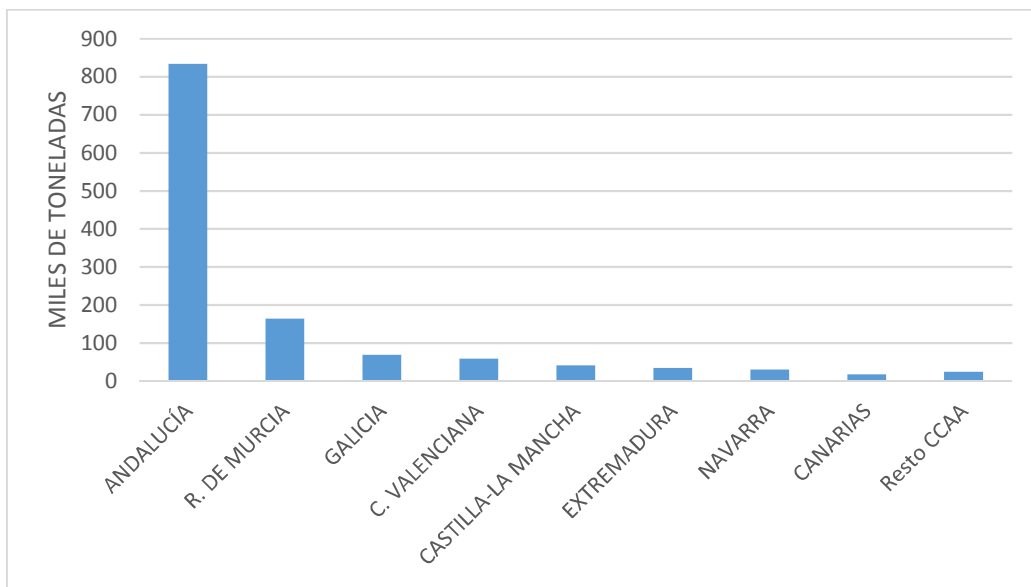


Figura 3. Principales Comunidades Autónomas productoras de pimiento en España en el año 2018. Fuente: MAPA,2018.

La Comunidad Valenciana ocupa el cuarto lugar con 58.092 toneladas de pimiento repartidas en 830 hectáreas. Valencia produce el 35% de pimiento dentro de esta Comunidad Autónoma (20.136 toneladas de pimiento producido en 353 hectáreas).

1.4 Mejora genética del pimiento mediante métodos clásicos

Una de las consecuencias de la domesticación de muchas especies vegetales, en la que el hombre seleccionó caracteres deseables para él como la ausencia de espinas, amargor y toxinas dañinas, es la pérdida de resistencias a plagas y enfermedades, debido a la disminución o desaparición de sustancias tóxicas o caracteres morfológicos que servían de defensa natural a la planta.

El mejoramiento genético clásico o convencional consiste en la introducción de características procedentes de otras variedades domesticadas, silvestres o mutantes sexualmente compatibles con la variedad a mejorar basándose en la aplicación de técnicas de hibridación y selección. Estas características, que pueden ir variando en función de las necesidades de los productores o de los consumidores, suelen incluir buena productividad, tolerancia a estreses bióticos y abióticos y determinadas cualidades morfológicas y organolépticas.

Con el fin de mejorar la productividad de los cultivos de pimiento, la mejora genética se ha dirigido hacia la disminución de la susceptibilidad de dichos cultivos a plagas, enfermedades y factores de estrés abiótico (sequía, salinidad, temperaturas extremas, disponibilidad de nutrientes, ...). Los factores bióticos para los que se ha intentado mejorar el pimiento incluyen varios tipos de hongos fitopatógenos (tales como *Phytophthora capsici*, *Fusarium spp.* y *Rhizoctonia solani* los cuales provocan marchitez de la planta), bacterias (marchitez causada por *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas solanacearum*) y virus (virus del mosaico deformante del pimentón PepDMV, entre otros).

Se han aplicado diferentes técnicas de mejoramiento clásico a *Capsicum annuum* para la resistencia a factores bióticos. El primer paso en este tipo de metodologías es conocer el modo de herencia del carácter a introducir. De esta

forma, Pardey y García (2009) determinaron el modo de herencia de la resistencia al virus del mosaico deformante del pimentón PepDMV en distintas variedades de pimiento. Una vez se conoce el modo de herencia se pueden llevar a cabo las tareas necesarias para transferir los genes deseables a la variedad cultivada. Así, podemos encontrar estudios para la resistencia del pimiento a *Phytophthora capsici* utilizando como método la introgresión de genes mediante un programa de hibridación con una línea resistente y posteriores retrocruces con el parental receptor (Bartual et al, 1994).

En el caso de los factores abióticos, hay un menor interés actual en su mejora genética por el uso de sistemas altamente controlados de producción como los invernaderos. Respecto a los factores de calidad, la mejora genética clásica en el pimiento también se ha dirigido hacia la mejora de parámetros de calidad tales como: madurez temprana, longitud del pedicelo, tamaño, sabor, color y pungencia de los frutos, entre otros.

Por último, el mejoramiento convencional si bien ha permitido proporcionar la mayor parte de las variedades que tenemos hoy en día en el mercado, presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, en un cruzamiento convencional, se pueden transmitir características no deseadas junto con las deseadas, y puede que esas características no deseadas tengan que ser eliminadas a través de sucesivas generaciones de retrocruces. Esta selección basada en el fenotipo es por consiguiente un proceso lento que puede llegar a durar más de diez años. Además, solamente se puede utilizar como fuente de variación genética la que hay en la propia especie o la de los materiales sexualmente compatibles.

La mejora biotecnológica puede ayudar a solventar estas limitaciones. Por un lado, los marcadores moleculares ayudan a acelerar y a hacer más eficientes los procesos de hibridación y selección ya que se pueden anticipar las características que van a tener las plantas analizándolas en sus primeras etapas de desarrollo. Además, existen toda una gama de técnicas en las que interviene el cultivo *in vitro* que permiten tanto ampliar las fuentes de variación genética intraespecíficas (aprovechamiento de la variación somaclonal) y extraespecíficas (rescate de embriones, fusión de protoplastos, transformación genética, edición génica, etc.) como acortar los plazos a la hora de alcanzar el objetivo de mejora.

1.5 Fundamentos del cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* se define como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo de células vegetales en condiciones axénicas y el aprovechamiento de su totipotencia, así como de su aptitud para la variación y la capacidad de modificación genética mediante transformación y edición génica. Las principales ventajas del cultivo *in vitro* frente a métodos clásicos o tradicionales es la posibilidad de recurrir a nuevas fuentes de variación genética, así como poder acortar los plazos necesarios para alcanzar los objetivos marcados previamente.

Algunas de las aplicaciones biotecnológicas que derivan del cultivo *in vitro* son la mejora genética, la mejora sanitaria y la multiplicación vegetativa. Esta última incluye técnicas como la micropropagación, que permite la multiplicación homogénea y a gran escala del material vegetal en poco espacio. Esta técnica se puede emplear también para la conservación de germoplasma ya que se puede multiplicar una variedad de la cual existan pocos individuos y/o que esté en peligro de extinción de forma rápida y eficiente. La mejora sanitaria se logra a través de técnicas como el cultivo de meristemos o el microinjerto. Gracias a ellas se puede obtener clones sanos a partir de plantas infectadas cualquier patógeno, incluidos los virus.

Por último, existen diferentes técnicas basadas en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales que han permitido la mejora genética del material vegetal. Para ello se han desarrollado métodos que dan lugar a híbridos sexuales mediante métodos de fusión de gametos y la transferencia de núcleos, la obtención de híbridos somáticos mediante fusión de protoplastos y la superación de barreras de incompatibilidad sexual mediante el rescate de embriones. También se puede incrementar la variación intraespecífica empleando la variación somaclonal, variación genética producida por el cultivo *in vitro*, como forma de obtener nuevos mutantes. Por otra parte, a través de técnicas basadas en el cultivo *in vitro*, se han desarrollado métodos para acelerar programas de mejora como el método haplo-diploide que permite la obtención de líneas puras (todos sus genes se encuentran en homocigosis) que servirán para la obtención de híbridos F1. Este método consiste en la obtención de plantas haploides a partir del cultivo de anteras, microsporas u óvulos para posteriormente obtener doble-haploides tras

una duplicación cromosómica. Por último, la transformación genética permite la transferencia controlada de uno o varios genes que contienen características deseables. En la transformación genética, es posible la transferencia de genes desde genotipos de la misma especie (intragénesis), entre especies sexualmente compatibles (cisgénesis) o incluso entre especies sexualmente incompatibles (transgénesis). En los últimos años también disponemos de herramientas como el sistema CRISPR para no sólo poder introducir nuevos genes sino también poder editar de forma controlada los presentes en el genoma de la variedad a mejorar.

Uno de los pilares sobre los que se fundamentan todas estas aplicaciones es la morfogénesis *in vitro*. La morfogénesis se define como la formación o génesis de órganos o embriones y comprende la división y la diferenciación celular. Esto se da gracias a la totipotencia celular, es decir, la capacidad de las células o tejidos cultivados *in vitro* a desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo bajo determinados estímulos para conseguir la formación de nuevas plantas (Skoog y Miller, 1957). La respuesta morfogenética puede manifestarse siguiendo dos rutas alternativas: organogénesis (axilar o adventicia) o embriogénesis somática. La organogénesis es un proceso de tipo unipolar que determina la formación de un brote o de una raíz a partir tanto de células meristemáticas (organogénesis axilar) como de células no meristemáticas o explantes sin meristemas preexistentes (organogénesis adventicia). La embriogénesis somática se refiere al proceso morfogenético de tipo bipolar que determina el desarrollo de embriones. En las dos rutas, la organogénesis adventicia y la embriogénesis somática, es posible distinguir dos modelos de desarrollo morfogénico: morfogénesis directa o morfogénesis indirecta. Si la regeneración se da sin una fase previa de crecimiento desorganizado o callo, la morfogénesis es directa y si hay esta fase se denomina indirecta.

1.6 Aplicaciones de técnicas de cultivo *in vitro* en la mejora genética del pimiento

En la actualidad los procesos de mejora deben hacerse en el menor tiempo posible y con el mayor rango posible de variabilidad genética disponible. Pese a

las mejoras logradas tanto en la productividad como en la calidad del pimiento mediante métodos clásicos o tradicionales de mejora genética, es necesario el desarrollo de técnicas de cultivo *in vitro* para obtener resultados más eficaces y en menor periodo de tiempo.

Al igual que el pimiento, dentro de la familia *Solanaceae* existen plantas de gran importancia económica tales como el tomate, la patata o el tabaco. Pero en comparación con estos géneros, los avances en las técnicas de cultivo *in vitro* en la planta de pimiento se han llevado de forma más lenta. Según un trabajo realizado por Kothari y colaboradores (2010) en el que se recogen diversos trabajos realizados sobre técnicas biotecnológicas aplicadas al género *Capsicum*, la baja utilización de este tipo de técnicas en la mejora del pimiento se debe fundamentalmente a la dificultad en la puesta a punto de métodos de regeneración eficaces y a la enorme dependencia genotípica en estos procesos, es decir, un mismo protocolo puede funcionar muy bien para una variedad pero ser totalmente ineficaz en otra.

Los trabajos de regeneración *in vitro* en *Capsicum* que mejor funcionan están basados en la regeneración mediante organogénesis adventicia. En distintos trabajos (Ebida y Hu, 1993; Christopher y Rajam, 1996; Golegaonkar y Kantharajah, 2006) se han observado diferencias en la capacidad organogénica del pimiento según el genotipo, tipo de explante y medio de cultivo (medios con distintas hormonas). También se puede encontrar algunos trabajos de regeneración vía embriogénesis somática en *Capsicum annuum*, aunque esto es menos frecuente (Joshi et al., 1996).

Para acelerar los programas de mejoramiento genético se utilizan técnicas desarrolladas a partir del cultivo *in vitro* para la obtención de plantas haploides y dihaploides. Así, podemos encontrar trabajos en los que se han empleado técnicas de androgénesis *in vitro* como el cultivo de anteras (Sibi et al., 1979; Morrison et al., 1986; Irikova et al., 2011) o el cultivo de microsporas aisladas (Supena et al., 2006; Kim et al., 2008) en distintas variedades de pimiento. Otra herramienta biotecnológica para acelerar programas de mejora es el uso de marcadores moleculares, es decir, biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. En diversos trabajos podremos encontrar el desarrollo de esta

técnica en diversas variedades de pimiento (Paran et al., 1998; Ilbi 2003; Djian-Caporalino et al., 2001)

Por último, también podemos encontrar trabajos de transformación genética en *Capsicum annuum* (Zhu et al., 1996; Jung et al., 2011; Heidmann et al., 2011) en los que el vector más utilizado es el *Agrobacterium tumefaciens*.

2 Objetivos

El objetivo de este trabajo es establecer una metodología de regeneración de plantas mediante cultivo *in vitro* a partir de explantes primarios para distintas variedades de *Capsicum annuum* que pueda servir de base para el desarrollo de futuros protocolos de mejora biotecnológica en esta especie de elevado interés económico.

Este objetivo principal se puede desglosar en diferentes aspectos:

- a) Establecer las mejores condiciones de esterilización, germinación y crecimiento de plántulas axénicas a partir de semillas de pimiento.
- b) Identificar las mejores condiciones de regeneración mediante organogénesis adventicia en los cinco genotipos analizados. Para ello se pretende trabajar con explantes procedentes de plántulas (cotiledón e hipocótilo) y de planta axénica (limbo y peciolo de hoja).
- c) Establecer las mejores condiciones para la elongación y el enraizamiento de los brotes regenerados, así como para la aclimatación de las vitroplantas obtenidas.

3 Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

En este trabajo se han empleado materiales procedentes del Banco de Germoplasma del COMAV.

3.1.1 Genotipos

Se han empleado cinco variedades de la especie *Capsicum annuum* procedentes todas ellas de México: Guajillo (CA1), Chilhuacle (CA2), Chile mulato (CA3), Chile jalapeño (CA4) y Mirasol rojo (CA5). Todas estas variedades tienen fruto de pequeño calibre y pungencia media y elevada (Figura 4).



Figura 4. Fenotipo de alguna de las variedades de pimiento empleadas. Imágenes cedidas amablemente por el COMAV.

3.2 Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

Se explicará el trabajo realizado en el laboratorio para poder disponer de material necesario para el cultivo *in vitro* en condiciones axénicas y, de esta manera,

poder obtener el material vegetal libre de contaminación para los experimentos de regeneración.

3.2.1 Trabajo en condiciones asépticas

Para evitar la contaminación de los cultivos por agentes ambientales se trabaja en cabina de flujo laminar. En este equipo el aire pasa a través de un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) el cual retiene partículas de más de 0,1 micras. El aire filtrado inyectado a la zona de trabajo genera una corriente continua desde el interior al exterior de la cabina impidiendo la entrada de contaminantes ambientales.

Previo a cualquier trabajo realizado en las cabinas, la superficie de ésta se limpió con etanol. Para la manipulación del material vegetal se dispuso de los siguientes instrumentales: mechero de gas, recipiente con etanol, bisturí, pinzas y papel. El bisturí y las pinzas se esterilizaron mediante flameado con etanol. El papel sobre el cual se trabajó el material vegetal se esterilizó previamente en el autoclave (121°C durante 20 minutos).

3.2.2 Preparación y esterilización de los medios de cultivo

En este trabajo se han utilizado cuatro tipos de medios de cultivo: medio de germinación (MG), medio de enraizamiento (MB3), medios para inducir la organogénesis y medio de elongación (FCu).

Se elaboraron diluyendo los componentes de cada uno de ellos en agua desionizada (ver más adelante la composición de cada uno de ellos). En un pH metro, se ajustó el pH mediante la adición de KOH o HCl hasta el valor de 5,7. A continuación la solución se trasvasó a matraces a los que se añadió agar bacteriológico a una concentración de $7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Los medios se esterilizaron en el autoclave (121°C durante 20 minutos) y se dejaron enfriar hasta su gelificación. En algunos medios se añadió vancomicina, un antibiótico que limita la contaminación endógena de las semillas, o determinadas hormonas que perderían su actividad si pasaran por el proceso de esterilización en la autoclave. La termolabilidad de todas estas sustancias requirió su esterilización previa por filtración para poder añadirlo al medio justo antes de su gelificación.

3.2.3 Esterilización de semillas

Para esterilizar las semillas de pimiento, previamente se prepararon cuatro botes de vidrio (tres de ellos con agua destilada y uno vacío) y se esterilizaron en el autoclave. En la cabina de flujo laminar se añadió al bote vacío la solución de lejía y 2-3 gotas de detergente TWEEN 20 para disminuir la tensión superficial de los tejidos y mejorar el contacto entre el tejido y la solución desinfectante. Se sumergieron las bolsas (un máximo de 5) hechas con gasas de algodón y en cuyo interior se colocaron las semillas (15-30 semillas por bolsa) durante 30 minutos. Seguidamente se eliminó la solución desinfectante pasando las bolsas con las semillas a los botes con agua destilada estéril durante 5, 10 y 15 minutos.

En este trabajo se han esterilizado, mediante tres protocolos diferentes, más de 1500 semillas de cinco variedades de pimiento. Estos protocolos de esterilización variaban en la concentración de lejía y en las veces que se realizó el tratamiento. Estas condiciones de esterilización fueron: 1) lejía al 50% durante 30 minutos, 2) lejía al 50% durante 30 minutos en dos días consecutivos y 3) lejía al 70% durante 30 minutos.

3.2.4 Obtención del material vegetal

A continuación, se describirán los procesos y condiciones de obtención y posterior cultivo de los explantes de cotiledón, hipocótilo, limbo y peciolo.

3.2.4.1 Germinación de semillas. Explantes de cotiledón e hipocótilo

Al finalizar el proceso de esterilización, las semillas se colocaron en placas Petri sobre dos papeles circulares estériles y 10 mL de agua destilada también estéril. Estas placas se cultivaron en una cámara en oscuridad a 28°C. Las semillas que iniciaban el proceso de germinación (emisión de la radícula) se sembraron en botes con MG (Tabla 1).

Tabla 1. Composición del medio de germinación (MG)

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Sales minerales	MS ^a
Sacarosa	10 g·L ⁻¹

^a(Murashige y Skoog, 1962)

Se colocaron 5-6 semillas pregerminadas por bote con MG. Estos botes se llevaron a las cámaras de cultivo con $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y condiciones de fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad – intensidad luminosa de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Transcurridos 7-10 días, las semillas pregerminadas se desarrollaron en plántulas de las cuales se obtuvieron los explantes de cotiledón e hipocótilo (Figura 5).



Figura 5: Plántulas axénicas de pimiento obtenidas a partir de la germinación en MG de semillas previamente esterilizadas. La barra representa 1 cm.

Para obtener los explantes de cotiledón se realizaron dos cortes transversales al eje central de cada cotiledón. El primer corte eliminó la zona distal del cotiledón y el siguiente corte separó el explante de cotiledón de la plántula. Los explantes de hipocótilo se obtuvieron mediante un corte transversal en la zona cercana a la raíz y otro corte transversal en la zona cercana al ápice meristemático (Figura 6). Los cortes se realizaron de manera que los explantes tuvieran el tamaño más

homogéneo posible y de manera que no dañara el ápice meristemático para subcultivarlo en medio base MB3 (Tabla 2).

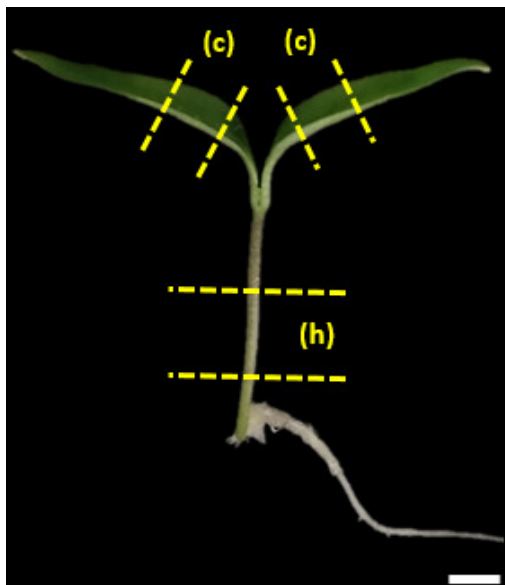


Figura 6. Cortes realizados (línea amarilla) a la plántula axénica de pimiento para obtener explantes de cotiledón (c) e hipocótilo (h). La barra representa 1 cm.

3.2.4.2 Plantas axénicas. Explantes de limbo y peciolo

La planta axénica se obtuvo a partir del desarrollo del ápice meristemático de la plántula tras realizar los cortes antes descritos y obtener los explantes de cotiledón e hipocótilo. Los ápices meristemáticos se cultivaron en medio MB3 (Tabla 2) para conseguir su enraizamiento y el desarrollo de la parte aérea.

Tabla 2. Composición del medio base MB3

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Sales minerales	MS ^a
Sacarosa	30 g·L ⁻¹
Inositol	0,1 g·L ⁻¹
Tiamina clorhídrica	1 mg·L ⁻¹

^a(Murashige y Skoog, 1962).

A los 30 días, la planta axénica ya tenía un tamaño suficiente para obtener los explantes procedentes de las hojas (Figura 7).

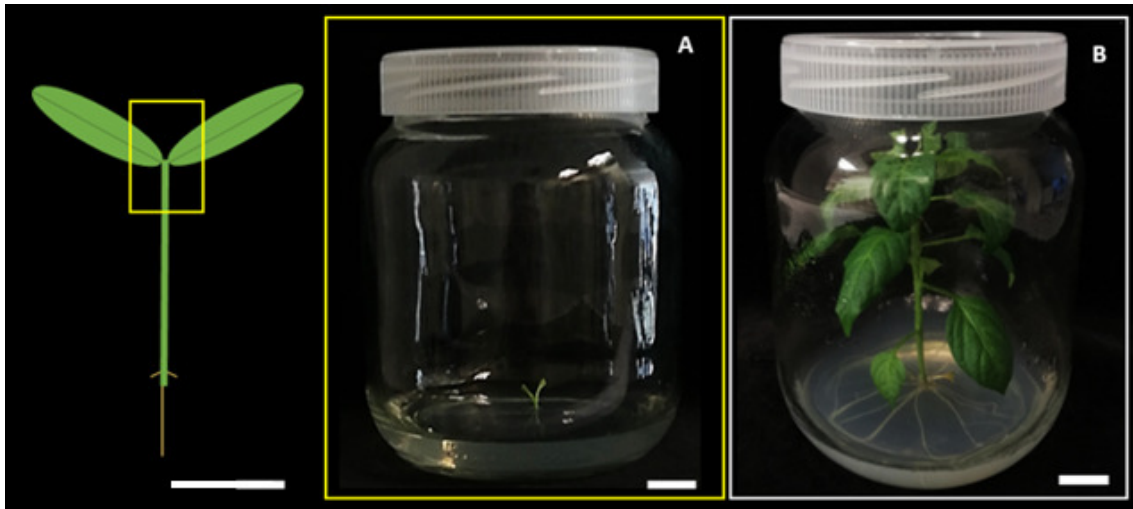


Figura 7. Obtención de planta axénica de pimiento a partir de una plántula A) Cultivo de ápice meristemático en medio MB3. B) Planta axénica en medio MB3 al cabo de 30 días de cultivo. La barra representa 1 cm.

Para obtener los explantes de hoja primero se separaron de la planta realizando un corte en el peciolo lo más cercano posible al tallo. Los explantes de peciolo tenían parte del peciolo y la base del limbo de la hoja. Los explantes de limbo se obtuvieron con cuatro cortes de forma que fueran cuadrados, que incluyeran el nervio central y de tamaño los más homogéneo posible, aproximadamente 1 cm² (Figura 8).

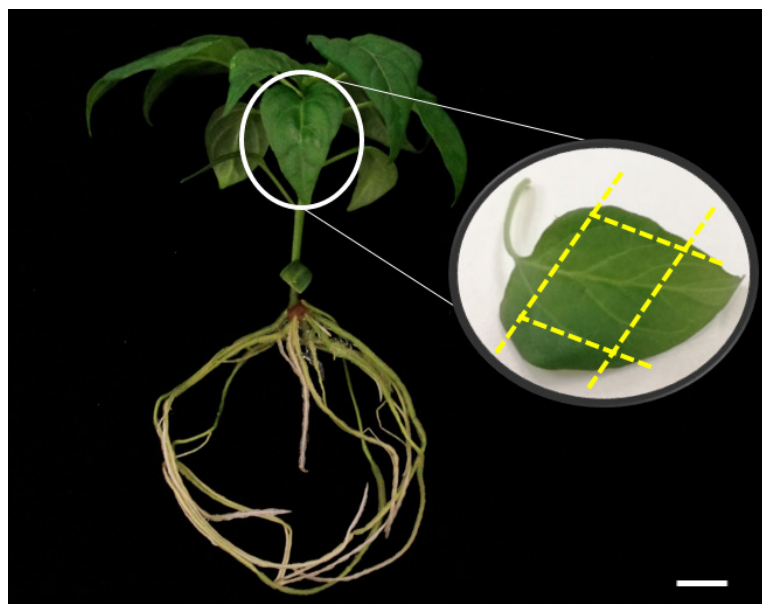


Figura 8. Cortes realizados (línea amarilla) a la planta axénica de pimiento para obtener explantes de limbo (l) y peciolo (p). La barra representa 1 cm.

3.2.5 Cultivo de explantes

Una vez realizados los cortes que permitieron obtener los cuatro tipos de explantes, se cultivaron en medios organogénicos distribuidos en placas Petri (Figuras 9 y 10). Los explantes se colocaron de tal forma que hicieran contacto total con la superficie del medio gelificado. En el caso de los explantes de cotiledón, limbo y peciolo, se sembraron de manera que el envés estuviera en contacto con el medio. Los de hipocótilo se cultivaron horizontalmente. Se cultivaron 30 explantes por cada condición (tipo de explante, genotipo y medio organogénico), lo cual ha hecho un total de más de 1980 explantes.

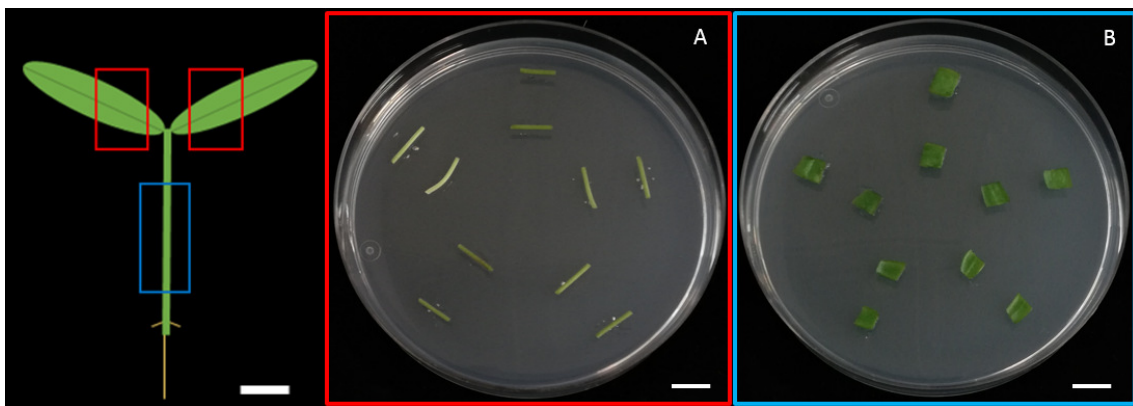


Figura 9. Cultivo de explantes obtenidos a partir de plántula axénica. A) Cultivo de explantes de hipocótilo. B) Cultivo de explantes de cotiledón. La barra representa 1 cm.

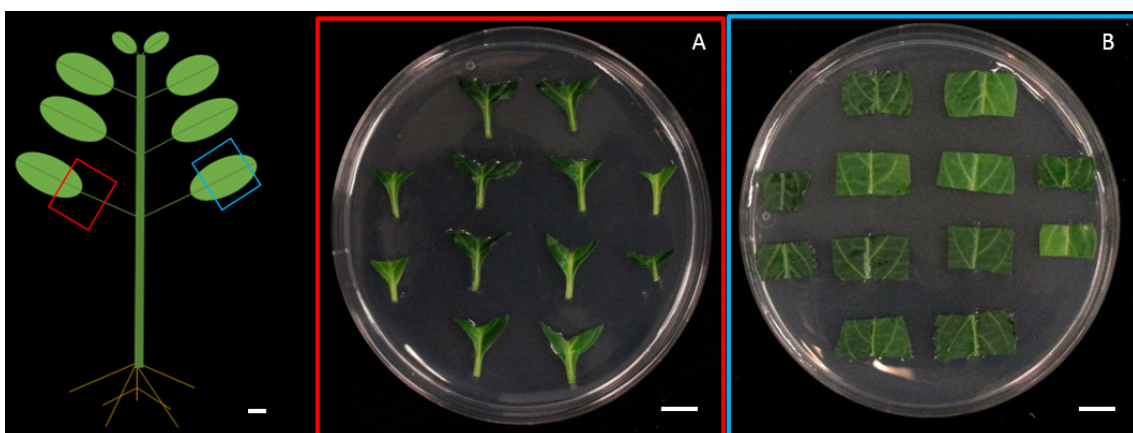


Figura 10. Cultivo de explantes obtenidos a partir de planta axénica. A) Cultivo de explantes de limbo. B) Cultivo de explantes de peciolo. La barra representa 1 cm.

3.2.6 Condiciones de crecimiento del material vegetal

Todo el material vegetal se cultivó en cámaras de cultivo en condiciones de fotoperiodo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad – intensidad luminosa de $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3 Regeneración de plantas

En este trabajo se ha evaluado la capacidad de regeneración de distintas variedades de *Capsicum annuum* mediante el estudio del desarrollo de callo desorganizado, yemas, ápices y brotes a partir de explantes sin meristemos preexistentes (organogénesis adventicia) procedentes de plántulas y de plantas axénicas en distintos medios de regeneración.

3.3.1 Inducción de la organogénesis adventicia

Para inducir la organogénesis adventicia, se diseñaron doce medios de cultivo en función de la bibliografía existente y de la experiencia previa del grupo en materiales similares. Los medios de regeneración se prepararon a partir de medio base MB3 al que se le añadió distintas hormonas para favorecer la organogénesis. En este caso lo más habitual es probar diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas. En nuestro diseño se incluyeron combinaciones entre una de las dos auxinas (I: ácido indolacético, N: ácido naftalenacético) y una o dos de las seis citoquininas (B: 6-Benzilaminopurina, Z: Zeatina, Tdz: Thidiazurón, Mt: Metatopolina, K: Kinetina y P: 2iP) para completar los doce medios de cultivo empleados en el presente trabajo (Tabla 3).

Tabla 3. Combinaciones de hormonas, auxinas y citoquininas, que tenían los medios empleados para inducir la organogénesis adventicia.

HORMONAS	CONCENTRACIÓN (mg·L⁻¹)
IB	1,0/2,0
NB	0,5/2,0
IZ	1,0/2,0
NZ	0,5/2,0
ITdz	1,0/2,0
NTdz	0,5/2,0
IMt	1,2/2,0
NMt	0,5/2,0
IKZ	1,0/2,0/1,0
NKZ	0,5/2,0/1,0
IPZ	1,0/2,0/1,0
NPZ	0,5/2,0/1,0

La evaluación de la regeneración de los explantes se realizó mediante la lectura de las placas a los 30 días de cultivo en los distintos medios organogénicos. Esta lectura consistió en cuantificar el porcentaje de los explantes que desarrollaron callo desorganizado (masa indiferenciada de células en división activa de color verde-blanquecino que surge tras la reacción de herida producida en el explante) y los que presentaron alguna de las estructuras organogénicas (Figura 11):

Yema adventicia: Abultamientos de color verde intenso que aparecen a partir del callo desorganizado que indican la organización de las células en estructuras meristemáticas

Ápice: Estructuras organogénicas en las que ya se pueden observar hojas expandidas, pero aún no presentan un tallo elongado.

Brote: Estructura originada tras el elongamiento del tallo del ápice que se puede aislar para que pueda enraizar y obtener así una planta entera.

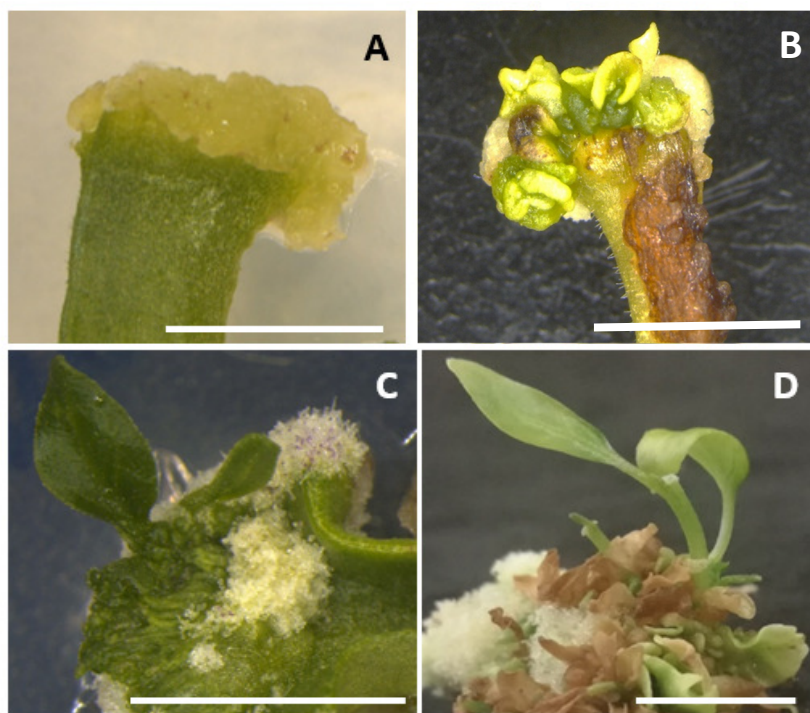


Figura 11. Etapas de la organogénesis adventicia en pimienta. A) Callo desorganizado. B) Yemas adventicias. C) Ápice. D) Brote. La barra representa 1 cm.

3.3.2 Elongación de los ápices

El medio utilizado en este trabajo para la elongación del tallo del ápice es el medio FCu (Tabla 4).

Tabla 4. Composición del medio de elongamiento FCu

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Sales minerales	MS ^a
Sacarosa	30 g·L ⁻¹
Inositol	0,1 g·L ⁻¹
Tiamina clorhídrica	1 mg·L ⁻¹
Ácido naftalenacético	0,01 mg·L ⁻¹
6-Benzilaminopurina	0,1 mg·L ⁻¹
Cobre	1 mg·L ⁻¹

^aMurashige y Skoog, 1962.

En este caso se ha elegido este medio por su buen resultado en especies relacionadas (datos no mostrados). En este medio se han cultivado aquellos explantes que tras uno o dos cultivos en los medios organogénicos han presentado la formación de ápices.

3.3.3 Enraizamiento de los brotes y aclimatación de las plantas

Una vez obtenido un brote con un tallo de tamaño suficiente, éste se separó del callo organogénico con un bisturí y se cultivó en medio base MB3 para que enraizara y finalmente desarrollara a una planta entera en condiciones de fotoperiodo.

La aclimatación es la etapa final en el que las plantas cultivadas *in vitro* deben adaptarse a nuevas condiciones ambientales *ex vitro* tales como baja humedad relativa, alta intensidad de luz, menor disponibilidad de nutrientes y presencia de plagas y enfermedades.

Para aclimatar las plantas de pimiento se extrajeron del bote donde habían enraizado y se lavaron con abundante agua para eliminar el agar adherido a las raíces. A continuación, las plantas se cultivaron en macetas con un sustrato compuesto de 50% turba y 50 % perlita. Finalmente, la planta se cubrió con un vaso de plástico transparente para evitar que se deshidratara (Figura 12).

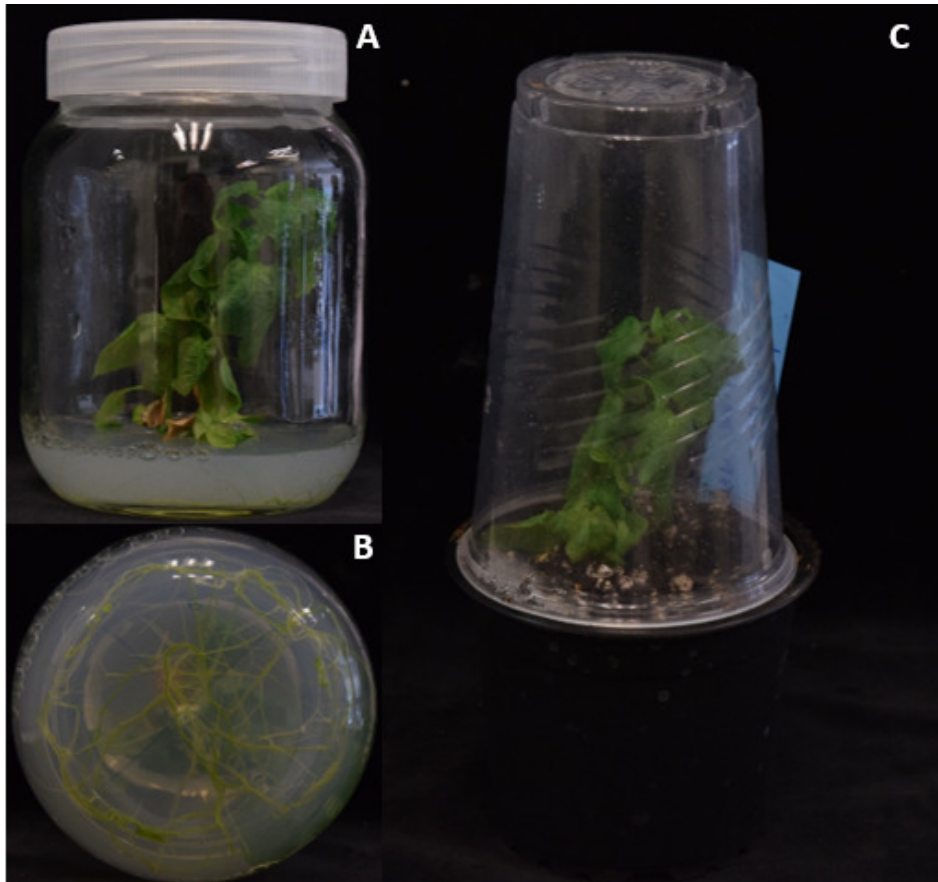


Figura 12. Enraizamiento v aclimatación de una planta de pimiento cultivada *in vitro*. A) Planta de pimiento cultivada *in vitro*. B) Raíz de la planta de pimiento cultivada *in vitro*. C) Planta de pimiento en proceso de aclimatación. La barra representa 1 cm.

3.4 Análisis estadístico

Se ha calculado el error típico de las proporciones mediante la fórmula $\sqrt{p * \frac{1-p}{n}}$

Siendo p la proporción observada y n el número de muestras empleadas para obtener dicho resultado.

4 Resultados y discusión

Este trabajo se realizó para evaluar la capacidad organogénica del pimiento y poder disponer de un protocolo de regeneración para cada uno de los genotipos seleccionados. Ésta es la primera etapa para poder aprovechar estas metodologías en técnicas de mejora biotecnológica en esta especie.

4.1 Esterilización y germinación de las semillas de pimiento

En este trabajo se evaluaron tres condiciones de esterilización distintas. La evaluación consistió en calcular la proporción de semillas pregerminadas respecto el total de semillas esterilizadas y la proporción de plántulas axénicas obtenidas respecto el total de semillas esterilizadas de cada uno de los 5 genotipos (Tabla 5).

Tabla 5. Proporción de semillas pregerminadas y de plántulas libres de contaminación obtenidas en cada uno de los genotipos y condiciones de esterilización respecto del número de semillas esterilizadas.

	Proporción de semillas pregerminadas (%)			Proporción de plántulas libres de contaminación (%)		
	Lejía 50%-30min	Lejía 50%-30min (x2)	Lejía 70%-30min.	Lejía 50%-30min	Lejía 50%-30min (x2)	Lejía 70%-30min.
CA 1	53 ± 9	80 ± 7	61 ± 9	7 ± 5	0	7 ± 5
CA 2	100	80 ± 7	87 ± 6	40 ± 9	7 ± 5	47 ± 9
CA 3	47 ± 9	60 ± 9	70 ± 8	0	7 ± 5	10 ± 5
CA 4	67 ± 9	100	100	33 ± 9	20 ± 7	69 ± 8
CA 5	80 ± 7	67 ± 9	72 ± 8	0	13 ± 6	43 ± 9

Como podemos observar en la Tabla 5, la mitad o más de las semillas consiguieron pregerminar en cada una de las 5 accesiones en la condición lejía 50%-30min. Sin embargo, todas las semillas de las accesiones CA3 y CA5 se contaminaron y sólo el 7% de las semillas CA1 dieron plántulas libres de contaminación. Por ello se decidió probar con otra condición (lejía 50%-30min. en dos días consecutivos). En este caso sólo se pudieron obtener plántulas libres

de contaminación de las accesiones CA3 y CA5. Sin embargo, la eficacia obtenida en general seguía siendo muy baja. Por último, se decidió probar la condición de lejía 70%-30 minutos. Con esta condición, que fue la que se mantuvo en el resto de los experimentos, se consiguió aumentar la proporción de plántulas libres de contaminación a valores por encima del 40% en tres de las accesiones evaluadas (CA2, CA4 y CA5). Esto nos permitió abordar los siguientes experimentos con estos materiales. Sin embargo, las accesiones CA1 y CA3 se dejaron de utilizar debido a la dificultad que seguíamos teniendo de obtener plántulas no contaminadas. En este caso se llevaron plantas al invernadero para obtener nueva semilla y poder abordar estos mismos experimentos en el futuro.

Después de haber fijado las mejores condiciones de esterilización de las semillas se evaluó la conveniencia de añadir un antibiótico que pudiera limitar la presencia de contaminación endógena en estos materiales (Figura 13).

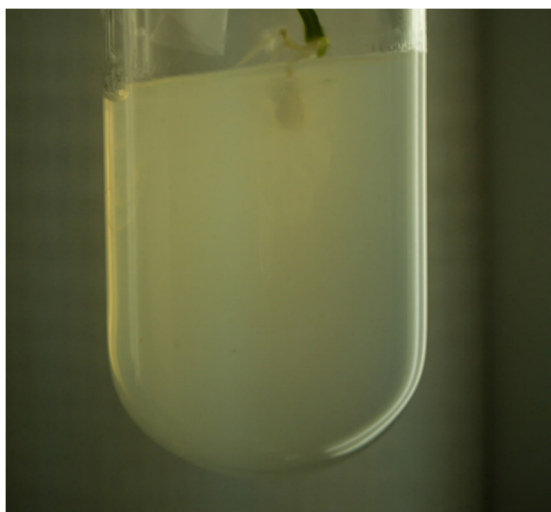


Figura 13. Contaminación endógena procedente de semilla contaminada en medio de germinación.

En este caso hemos evaluado la adición de vancomicina en los medios utilizados en este trabajo. De esta manera, se ha logrado, en los últimos experimentos realizados, disminuir la incidencia de plántulas contaminadas a valores menores del 5%. Por tanto, esperamos que en un futuro se pueda emplear esta modificación del protocolo para poder obtener material libre de contaminación a partir de semillas de pimiento.

4.2 Evaluación de la capacidad organogénica del pimiento

La evaluación de la capacidad de regeneración del pimiento se clasificó en función de los tipos de explantes utilizados. Aunque inicialmente se planificó evaluar la capacidad organogénica de explantes de cotiledón e hipocótilo por su mayor capacidad morfogénica según nuestra experiencia con materiales similares, la falta de material vegetal (pocas semillas disponibles, problemas de contaminación...) y el crecimiento asincrónico observado en las plántulas obtenidas (Figura 14) nos hizo descartar esa idea.

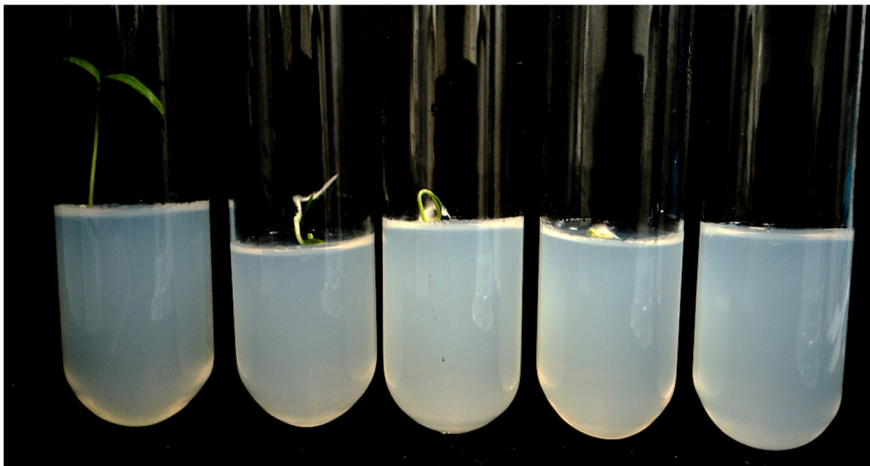


Figura 14. Crecimiento asincrónico de las semillas previamente esterilizadas de pimiento.

En lugar de la planificación inicial, se decidió utilizar los ápices meristemáticos para obtener una colección suficientemente amplia de plantas axénicas que nos permitiera evaluar la capacidad organogénica de los explantes de hoja (limbo y peciolo) en los distintos medios de regeneración.

4.2.1 Eficacia de la regeneración de explantes de hoja

En este experimento se cultivaron 30 explantes por condición (2 tipos de explantes x 3 accesiones x 12 medio de cultivo) cultivando un total de 2160 explantes. Tras 30 días de cultivo en condiciones de fotoperiodo se contabilizaron el número de explantes con callo desorganizado y con callo organogénico (presencia de yemas, ápices o brotes). A partir de esos datos se

ha calculado la eficacia de formación de callo desorganizado y de callo organogénico en los explantes de limbo (Figura 15) y peciolo (Figura 16).

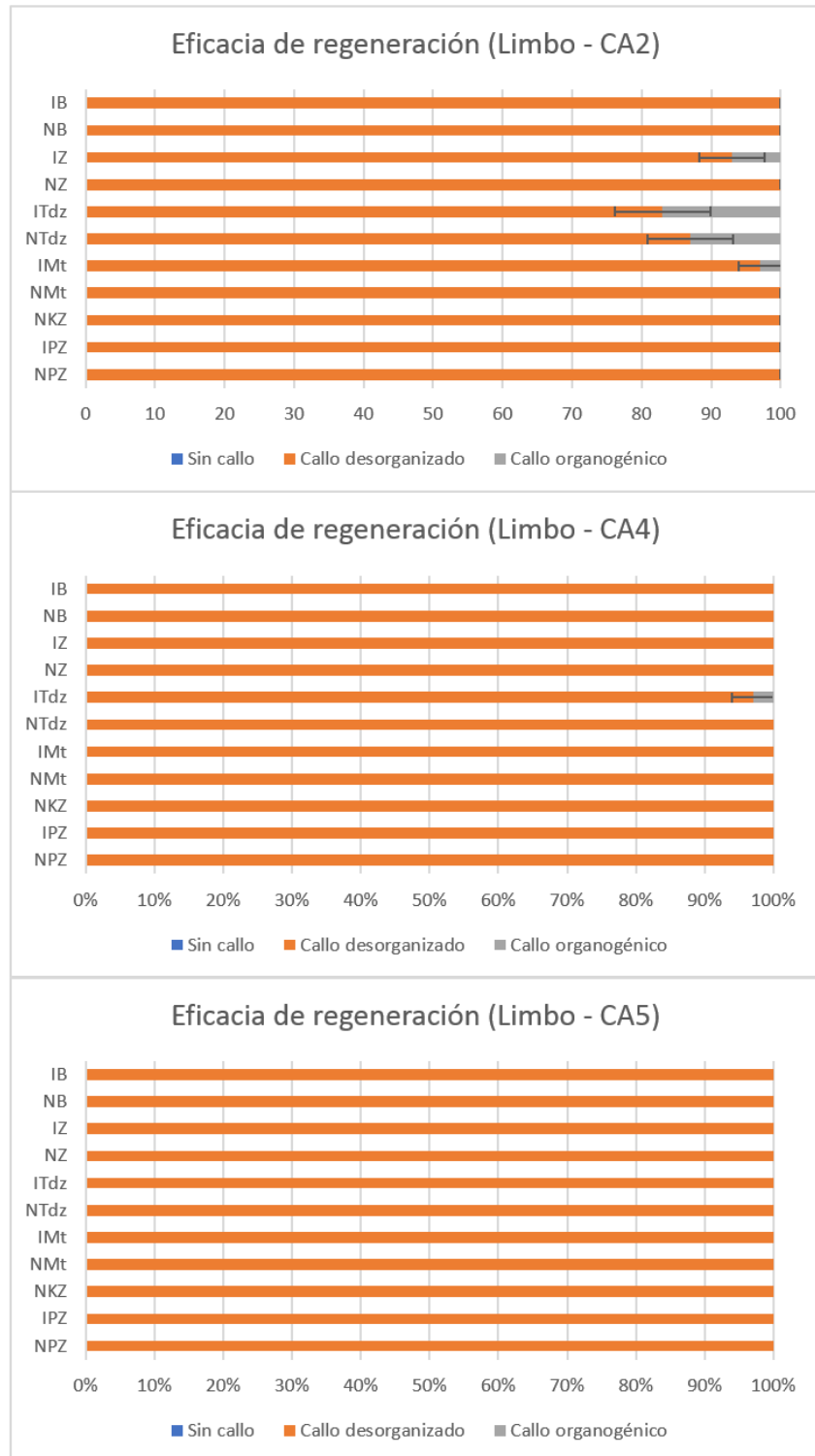


Figura 15: Eficacia de regeneración de los explantes de limbo de las accesiones CA2, CA4 y CA5 en función del medio organogénico. Las barras representan el error típico de la proporción.

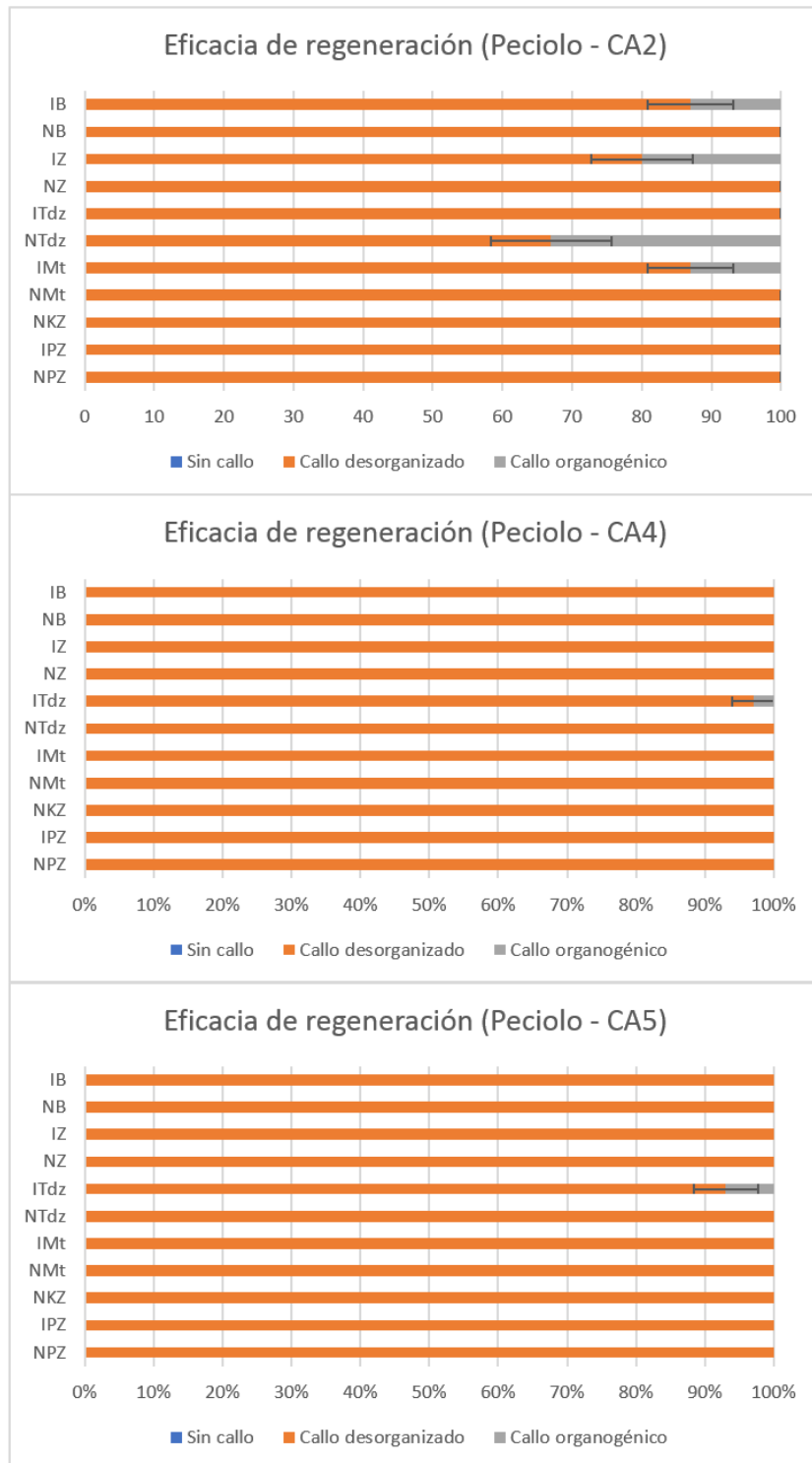


Figura 16: Eficacia de regeneración de los explantes de limbo de las accesiones CA2, CA4 y CA5 en función del medio organogénico. Las barras representan el error típico de la proporción.

Como se puede apreciar en las figuras anteriores, todos los explantes de limbo y peciolo de las 3 accesiones formaron, al menos, callo desorganizado, la primera etapa del proceso de regeneración (Figura 17)

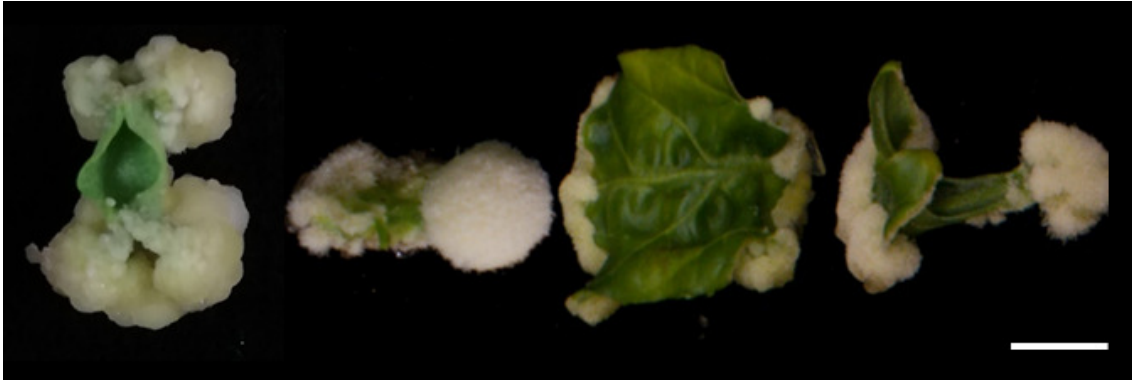


Figura 17: Formación de callo desorganizado en los cuatro explantes evaluados: cotiledón, hipocótilo, limbo y peciolo (de izquierda a derecha). La barra representa 1 cm.

Sin embargo, la formación de estructuras organogénicas no superó el 35% en ninguna de las condiciones evaluadas y, en muchos de los medios utilizados, no se observaron en ningún explante. Esto remarca la dificultad que existe en desarrollar protocolos de regeneración en pimiento con una eficacia relativamente alta.

La variedad CA2 es la que mejor respuesta organogénica dio ya que se observaron estructuras organogénicas en los dos tipos de explante y en cuatro de los doce medios probados. Los medios de regeneración ITdz (17%) y NTdz (13%) en los explantes de limbo y los medios NTdz (33%) e IZ (20%) en los explantes de peciolo tuvieron la mejor respuesta organogénica. En cuanto a la variedad CA4, los explantes de limbo y peciolo sólo consiguieron regenerar en el medio ITdz con una eficacia de regeneración del 3% en ambos casos. Por último, la variedad CA5 sólo fue capaz de regenerar estructuras organogénicas a partir de explantes de peciolo. En este caso, al igual que en la accesión CA4, el medio ITdz es el que presentó mejor resultado, eficacia de regeneración del 7% (Figura 18).

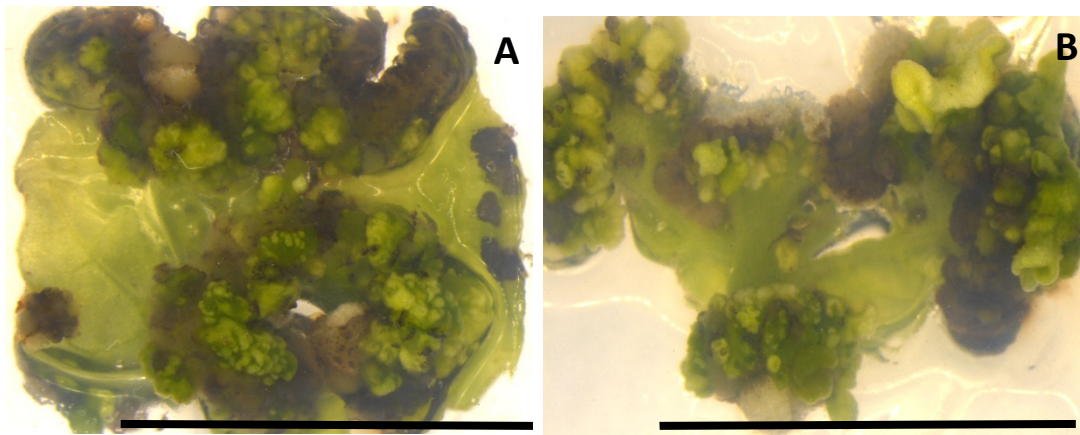


Figura 18: A) Yemas en explante de limbo de la accesión CA2 cultivado en medio NTdz. B) Yemas en explante de peciolo de la accesión CA4 en medio ITdz. La barra representa 1 cm.

Un trabajo en el que también han conseguido buenos resultados con thidiazurón en explantes de hoja es el realizado por Ju y colaboradores (2010) en el que consiguieron regenerar dos variedades de *Capsicum annuum* ('Hivita Red' y 'Hivita Yellow') en medios enriquecidos con esta citoquinina. Observaron además que añadiendo la auxina ANA obtenían mejores porcentajes de regeneración obteniendo los mejores resultados con concentraciones parecidas a las de nuestro trabajo ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ANA y $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Tdz).

4.2.3 Eficacia de regeneración de explantes de cotiledón e hipocótilo

Como ya se ha comentado se había abandonado la idea de evaluar la capacidad morfogénica de los explantes de cotiledón e hipocótilo debido a la baja disponibilidad de semillas y a los problemas de falta de sincronía en el desarrollo de las plántulas lo cual dificulta el cultivo de los explantes en determinado estado ontogénico de la plántula. Sin embargo, vistas las bajas eficacias de regeneración observadas en las accesiones CA4 y CA5 se decidió probar estos explantes en los tres medios que mejor resultado habían dado en CA2 (Figura 19). En diferentes tandas de esterilización se lograron las plántulas suficientes para poder cultivar 30 explantes de cada tipo en cada medio de cultivo.

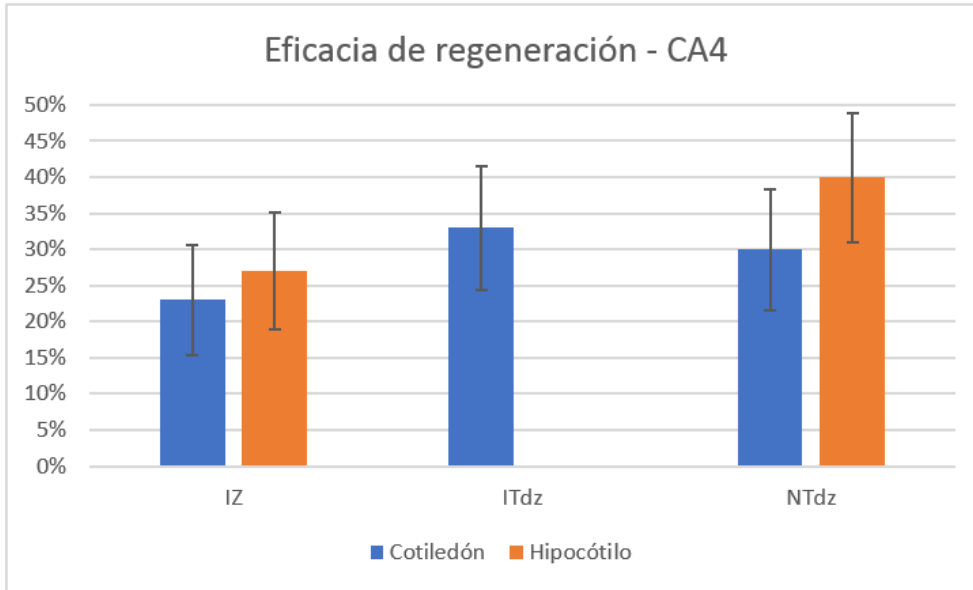


Figura 19. Eficacia de la regeneración de los explantes de cotiledón e hipocótilo de la accesión CA4 en los medios IZ, NZ e ITdz. Las barras representan el error típico de la proporción.

La Figura 20 muestra que los explantes de cotiledón de la accesión CA4, mostraron el mejor resultado en ITdz (33%) seguido de NTdz (30%). Los explantes de hipocótilo, en el medio NTdz mostraron el mejor resultado (40%) seguido de IZ (27%).

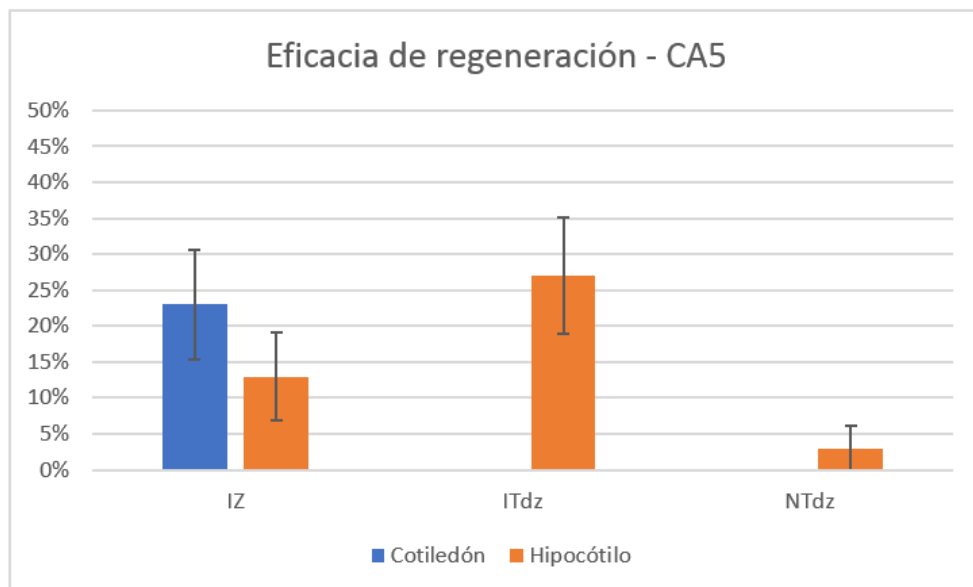


Figura 20. Eficacia de la regeneración de los explantes de cotiledón e hipocótilo de la accesión CA5 en los medios IZ, NZ e ITdz. Las barras representan el error típico de la proporción.

La Figura 19 indica que los explantes de cotiledón de la accesión CA5 sólo dieron respuesta organogénica en el medio IZ (23%). En cambio, los explantes de hipocótilo dieron respuesta organogénica en los tres medios siendo el medio ITdz en el que mejor respuesta generó (27%) seguido del medio IZ (13%) y por último NTdz (3%). En todos estos casos se formaban las yemas adventicias 30 días después de realizar el cultivo de los explantes (Figura 21).

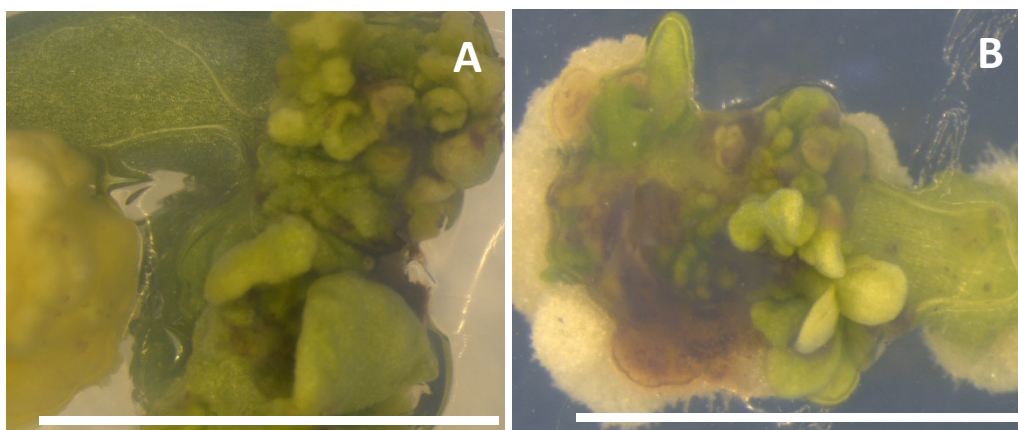


Figura 21: Yemas en explante de cotiledón de la accesión CA4 cultivado en medio NTdz. B) Yemas en explante de peciolo de la accesión CA5 en medio ITdz. La barra representa 1cm.

En la parte final del trabajo, con la experiencia adquirida hasta ese momento se probaron los explantes de cotiledón e hipocótilo disponibles de la accesión CA2 en varios medios de cultivo. En este caso, aunque no se pudieron probar las mismas condiciones que en las accesiones anteriores, cabe destacar que la mejor eficacia de regeneración alcanzada con explantes de cotiledón fue del 13% en NZ (0,5/2,0) y del 27% en IZ (1,0/2,0) al cultivar explantes de hipocótilo. Aunque este resultado habrá que completarlo probando más medios de cultivo, se puede concluir que en tres de las cinco accesiones con las que se inició el trabajo se ha conseguido la regeneración de estructuras organogénicas.

En trabajos previos realizados por Venkataiah y colaboradores (2003) con esta especie se ha conseguido la regeneración a partir de explantes de cotiledón e hipocótilo en medio con thidiazurón. Además, observaron que las diez variedades que investigaron (distintas a las de este trabajo) obtuvieron mejor respuesta organogénica mediante la combinación de thidiazurón y la auxina AIA. La concentración óptima de AIA y Tdz varió según el genotipo estudiado.

Finalmente, al comparar los resultados por tipo de explante vieron que, al contrario de lo que nos ha pasado a nosotros, los explantes de cotiledón e hipocótilo tuvieron peor respuesta organogénica que los explantes de hoja.

Por último, hay que destacar que, además de las diferencias en las respuestas organogénicas mostradas por los explantes de hoja (Figuras 15 y 16) y las mostradas por los explantes de cotiledón e hipocótilo (Figuras 19 y 20) en los distintos medios organogénicos, también es muy importante la diferencia en la capacidad de regeneración en función del genotipo. Estas diferencias se han visto en múltiples trabajos de investigación tanto en pimiento como en prácticamente todas las especies de interés agronómico. Por poner algunos ejemplos donde se observa este fenómeno en pimiento, citaremos los trabajos de Kothari y colaboradores (2010) y de Ochoa-Alejo e Ireta-Moreno (1990) entre otros.

4.3 Obtención de brotes elongados

En el apartado anterior se ha analizado la eficacia de regeneración hasta la formación de, al menos, yemas adventicias. Sin embargo, el proceso de regeneración mediante organogénesis adventicia finaliza con el desarrollo de los brotes. Por tanto, para llegar a regenerar plantas, se subcultivaron todos los explantes con callo organogénico al mismo medio en el que se había producido. De esta forma se favoreció la amplificación de la respuesta morfogenética y el desarrollo de ápices a partir de las yemas adventicias. Posteriormente se ha utilizado el medio FCu para conseguir que los ápices elonguen hasta convertirse en brotes. Aunque no se ha cuantificado esta respuesta por el bajo número de explantes organogénicos obtenidos en las etapas anteriores, hemos podido comprobar que este medio es altamente eficaz en la producción de brotes a partir de ápices. En algunos trabajos anteriores se reportó con otras variedades ciertas dificultades a la hora de conseguir la elongación de los brotes (Kothari et al., 2010). En este trabajo se ha conseguido la producción de brotes de suficiente tamaño como para poderse individualizar y subcultivar en medio de enraizamiento (Figura 22).



Figura 22. Brotes en explantes de distintas condiciones en medio de elongación FCu. A) Brote del explante de hipocótilo de la accesión CA5 cultivado primero en medio ITdz y subcultivado a medio de elongación FCu. B) Brote del explante de cotiledón de la accesión CA2 cultivado primero en medio IZ y subcultivado a medio de elongación FCu. La barra representa 1 cm.

Por otra parte, algunos autores coinciden en el efecto beneficioso que tiene el ion cobre en este proceso y sugieren su utilización también en los medios de regeneración para mejorar la calidad de las estructuras organogénicas obtenidas (Joshi y Kothari, 2007). Ésta podría ser una de las modificaciones para tener en cuenta en trabajos futuros para mejorar los resultados obtenidos.

4.4 Enraizamiento y aclimatación de las vitroplantas

El enraizamiento de los ápices meristemáticos en medio MB3 ya se había comprobado que funcionaba al cultivar este explante para la obtención de plantas axénicas y su posterior clonación. Por tanto, decidimos probar si también servía para enraizar los brotes elongados. En todos los casos probados, los brotes adventicios enraizaron sin problema produciendo una vitroplanta lista para su aclimatación.

Por último, algunos brotes enraizados se aclimataron para comprobar si la metodología que usamos de forma rutinaria en el laboratorio para otras especies funciona también en pimiento. La aclimatación se produjo sin ningún problema

en el material evaluado permitiendo el posterior crecimiento de la planta en el invernadero con un desarrollo vegetativo normal (Figura 23).



Figura 23. Planta de pimiento aclimatada y cultivada en el invernadero. La barra representa 10 cm.

En diversos trabajos de regeneración de diferentes variedades de *Capsicum annuum* (Venkataiah et al., 2003; Golegaonkar y Kantharajah, 2006; Ju et al., 2010) se ha comprobado que la fase de aclimatación, con metodologías similares a la nuestra, no presenta problemas en esta especie.

5 Conclusiones

Tras los resultados obtenidos de los experimentos realizados en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- La técnica de esterilización y germinación de las semillas de pimiento permite trabajar con unos porcentajes de obtención de plántulas axénicas suficiente para alcanzar los objetivos planteados, aunque esto depende de la variedad empleada. Sería recomendable seguir trabajando en la mejora de estos protocolos para conseguir una metodología que permita la germinación uniforme de la mayoría de las semillas esterilizadas. La utilización de lotes de semilla recién obtenidos puede ayudar a alcanzar ese logro.
- Se ha conseguido la regeneración de plantas a partir de explantes primarios en tres de las cinco accesiones utilizadas. Esto se ha logrado tanto a partir de explantes de hoja como a partir de explantes procedentes de la plántula (cotiledón e hipocótilo). Aunque el porcentaje de explantes con formación de callo organogénico no es muy elevado en las condiciones evaluadas (menor del 40%), se han establecido las bases para poner a punto técnicas de mejora biotecnológica en esta especie de interés agronómico.
- En concreto las mejores condiciones para la regeneración en este trabajo han sido el empleo de explantes de peciolo de la variedad CA2 en NTdz 0,5/2,0 (33%) e hipocótilo de las variedades CA4 y CA5 en NTdz 0,5/2,0 (40%) e ITdz 1,0/2,0 (27%) respectivamente.
- La obtención de brotes elongados al cultivar el callo organogénico en FCu, brotes enraizados al subcultivarlos en MB3 y plantas aclimatadas ha permitido completar todos los pasos necesarios en un protocolo de regeneración. Estas vitroplantas en el invernadero presentaron un desarrollo vegetativo normal.

6 Bibliografía

- Bartolomé T., Coletto J.M., Velázquez R. (2015)** Universidad de Extremadura. Historias de plantas (II). Historia del pimiento. <<https://www.unex.es/conoce-la-uex/centros/eia/archivos/iag/2015/2015-14-historias-de-plantas-ii-la-historia-del.pdf>>
- Bartual R., Lacasa A., Marsal J., Tello J. (1994)** Epistasis in the resistance of pepper to phytophthora stem blight (*Phytophthora capsici* L.) and its significance in the prediction of double cross performances. *Euphytica*, 72(1-2), pp.149-152.
- Christopher T. y Rajam M. (1996)** Effect of genotype, explant and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3), pp.245-250.
- Djian-Caporalino C., Pijarowski L., Fazari A., Samson M., Gaveau L., O'Byrne C., Lefebvre V., Caranta C., Palloix A., Abad P. (2001)** High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 103(4), pp.592-600.
- Ebida A. y Hu C. (1993)** *In vitro* morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, 13(2), pp.107-110.
- FAOSTAT (2017)** Food and Agriculture of Organization of the United Nations. Statistics Division. <<http://www.fao.org/faostat/es/#home>> [Consulta: 29 Mayo 2019].
- Golegaonkar P. y Kantharajah A. (2006)** High-frequency adventitious shoot bud induction and shoot elongation of Chile pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 42(4), pp.341-344.

- Heidmann I., de Lange B., Lambalk J., Angenent G., Boutilier K. (2011)** Efficient sweet pepper transformation mediated by the BABY BOOM transcription factor. *Plant Cell Reports*, 30(6), pp.1107-1115.
- Iibi H. (2003)** RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pepper, *Capsicum annuum*. *Scientia Horticulturae*, 97(3-4), pp.211-218.
- Irikova T., Grozeva S., Rodeva V. (2011)** Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), pp.1559-1570.
- Joshi S., Sankhla N., Binzel M., Sankhla D. (1996)** Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15(7), pp.536-540.
- Joshi A. y 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 and Organ Culture*, 88(2), pp.127-133.
- Ju Y.S., Iyyakkannu S., Chul G., Byoung R. (2010)** Adventitious shoot regeneration from leaf explants of miniature paprika (*Capsicum annuum*) 'Hivita Red' and 'Hivita Yellow'. *African Journal of Biotechnology Vol. 9 (19)*, pp. 2768-2773.
- Jung M., Shin S., Park J., Lee S., Lee M., Ryu K., Paek K., Harn C. (2011)** Detection of transgene in early developmental stage by GFP monitoring enhances the efficiency of genetic transformation of pepper. *Plant Biotechnology Reports*, 5(2), pp.157-167.
- Kim M., Jang I.C., Kim J.A., Park E.J., Yoon M., Lee Y. (2008)** Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Rep* 27:425–434
- Kothari S.L., Joshi A., Kachhwaha S., Ochoa-Alejo N. (2010)** Chili peppers – A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnol. Adv.* 28, 35-48.
- Kraft K., Brown C., Nabhan G., Luedeling E., Luna Ruiz J., Coppens d'Eeckenbrugge G., Hijmans R., Gepts P. (2014)** Multiple lines of

evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), pp.6165-6170.

Lobo F., Silva V., Domingues J., Rodrigues S., Costa V., Falcão D., de Lima Araújo K. (2017) Inclusion complexes of yellow bell pepper pigments with β -cyclodextrin: preparation, characterisation and application as food natural colorant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), pp.2665-2671.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación <<https://www.mapa.gob.es> > [Consulta:29 May 2019].

Morrison R.A., Koning R.E., Evans D.A. (1986) Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *J Plant Physiol* 126:1–9.

Murashige T. y Skoog F. (1962) A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Ochoa-Alejo N. e Ireta-Moreno L. (1990) Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, 42(1-2), pp.21-28.

Paran I., Aftergoot E., Shifriss, C. (1998) *Euphytica*, 99(3), pp.167-173.

Pardey C. y Garcia M.A. (2009) Herencia de la resistencia al virus del mosaico deformante del pimentón PepDMV en *Capsicum*. *Acta Agron.* [online]. 2009, vol.58, n.4, pp.316-323.

Sibi M., Dumas de Vaulx R., Chambonnet D. (1979) Obtention de plantes haploides par androgenese in vitro chez le piment (*Capsicum annuum* L.). *Ann Ameílior Plant* 29:583–606.

Supena E.D.J., Muswita W., Suharsono S., Custers J.B.M. (2006) Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Sci Hort* 107:226–232.

Skoog F. y Miller C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured. In vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* v. 11, pp. 118-131.

Venkataiah P., Christopher T., Subhash K. (2003) Thidiazuron Induced High Frequency Adventitious Shoot Formation and Plant Regeneration in *Capsicum annum* L. *Journal of Plant Biotechnology* 5, pp. 245-250.

Zhu Y., Ou-Yang W., Zhang Y., Chen Z. (1996) Transgenic sweet pepper plants from Agrobacterium mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 16(1-2), pp.71-75.