



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## Técnicas y Estrategias de Mejora para Facilitar la Hibridación Interespecífica y el Acortamiento del Ciclo Generacional en el Género *Capsicum*



Franz Eugen Köhler, 1897

Autor:  
Juan Pablo Manzur Poblete

Director:  
Dr. Adrián Rodríguez Burruezo

Valencia, Julio de 2013





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**Técnicas y Estrategias de Mejora para Facilitar la  
Hibridación Interespecífica y el Acortamiento del Ciclo  
Generacional en el Género *Capsicum***

Presentada por:

**JUAN PABLO MANZUR POBLETE**

**Para optar al título de Doctor Ingeniero Agrónomo  
por la Universidad Politécnica de Valencia**

Dirigida por:

**Dr. Adrián Rodríguez-Burruezo**

**Valencia, 2013**



## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer a toda la gente que durante estos cuatro años me ha apoyado y acompañado en esta aventura, la tesis doctoral. Primero agradecer a mi familia: a mi madre Rosita, a quien espero que este logro le anime ya que en gran parte se lo debo a ella; a mi padre Emilio, que con sus palabras siempre me transmite paz y tranquilidad; a Dianita y mis hermanas (Diani y Palo) que alegran muchos domingos con sus aventuras por Chile; a mi tío Julio, por las apasionadas pláticas culturales; a la Toñita, por haber compartido un poco de mi día a día en esta bella ciudad, Valencia; a Julito con quien tengo muy buenos recuerdos paseando por Madrid y, finalmente, a mi abuela Lucía, que a sus 90 años espero que siga gozando de buena salud.

Agradecer también a mis amigos en Valencia: a Maki, por los innumerables viajes compartidos; a Alvarito, por las partidas de pádel y compartir el día a día juntos en el piso; a Carlito, con quien muchas tardes por el COMAV compartimos innumerables historias; a Carles, por las risas en la cenas de los martes; a Verito, por la buena acogida que nos dio junto a su familia por el norte; a Nuri, por su cariño; a Olga y Caro, por los momentos de terraza; a Flor, por su paciencia en las clases de francés; al Venezuela team (Adriana, Vane, Ever); a mis amigos a la distancia Sandrita, Quique, Carmencilla, Andy y a toda esa gente con la que hemos pasado imborrables momentos juntos. Agradecer especialmente a todos los alumnos que han aportado su trabajo para que esta tesis salga adelante: Chelo, Ana, Nieves, Laura, Mariano, Pablo y Miquel, al igual que espero haber aportado también en su formación.

Finalmente, y no menos importante, agradecer a mi director Adrián, su apoyo y dedicación para sacar adelante esta tesis, al igual que a todos mis compañeros del COMAV, incluido el director, Jaume, que hacen del trabajo una grata experiencia: Estelita y Loles, por todo lo compartido juntos; Santi, Javi, Mariola, Pietro, Alicia, Isabel, Patri, Alba, Inma, Gorka y Raúl, por la alegría que transmiten; a Ana, por confiar en mí y darme la oportunidad de dar clases en el pregrado; al apoyo de la gente de los invernaderos, Carlos, Maikel, Ángel, Salva, Mariano y Paco; y a muchos otros que aunque en este momento no los nombre, han sido de gran apoyo para mí.

Gracias a España, este bellísimo país que me ha acogido como uno más y que espero ver muy pronto recuperada de la crisis económica que sufre.



## Resumen

En la actualidad, pimientos, chiles y ajíes (*Capsicum* spp.) están presentes en la práctica totalidad de las zonas templadas y cálidas del mundo. Este cultivo está entre las diez principales hortalizas del mundo y su popularidad se debe, en gran parte, a su utilización gastronómica tanto para consumo en fresco como especia. De las cinco especies cultivadas, la que llamamos comúnmente pimiento (*Capsicum annuum*), es la más popular y económicamente importante de todas, por lo que la mayoría de esfuerzos de investigadores y mejoradores se centran en esta especie. En este sentido, dos importantes herramientas para la mejora de los cultivos son: i) la hibridación interespecífica, para aprovechar la variabilidad genética de las especies relacionadas y, ii) el acortamiento del ciclo generacional, ya sea para realizar sucesivas autofecundaciones y generar líneas puras o para realizar retrocruces y transferir genes. En ambos casos el cultivo de embriones inmaduros podría ser de gran utilidad. En el primero, permitiría sortear la frecuente barrera postcigótica a la hibridación interespecífica del aborto embrionario, mediante el rescate de embrión. En el segundo, permitiría extraer el embrión procedente de un fruto inmaduro, evitando tener que esperar su maduración, acortando el ciclo generacional del cultivo.

De este modo, el primer objetivo de esta tesis fue aumentar la eficiencia de la germinación *in vitro* de embriones inmaduros del género *Capsicum* trabajando en los siguientes factores: i) una amplia diversidad de especies y genotipos, ii) los principales estadios inmaduros de desarrollo embrionario (globular, corazón, torpedo y cotiledonar temprano) y iii) diferentes combinaciones de medio de cultivo (sales MS, sacarosa, reguladores de crecimiento) y la incubación en oscuridad. Un segundo objetivo fue evaluar y clarificar las barreras interespecíficas que existen entre las especies *Capsicum* del complejo *annuum-chinense-frutescens* y de éstas con *C. baccatum*, valorando la utilidad de estrategias como el rescate *in vitro* de embriones y el cruzamiento con especies puente para la consecución de cruzamientos entre *C. annuum* y *C. baccatum*. Finalmente, el tercer objetivo consistió en valorar la utilidad del cultivo *in vitro* de embriones para acortar el ciclo generacional del pimiento común (*C. annuum*), permitiendo acelerar los programas de mejora de este cultivo.

En este estudio fue posible germinar *in vitro* y obtener plantas desarrolladas y viables de las cinco especies estudiadas a partir de todos los estadios embrionarios, con la única excepción de los embriones globulares de *C. chinense*. En relación al estadio embrionario se observó un aumento gradual de la eficiencia promedio a medida que avanzaba el desarrollo del embrión: globular (5%), corazón (21%), torpedo (37%) y cotiledonar (69%). Esto coincide con la literatura revisada en otras especies, y se explicaría por una mayor dependencia alimenticia de los embriones precoces (etapa heterótrofa) frente a los avanzados (etapa autótrofa).

Respecto a los medios de cultivo empleados, se observó que las dosis de sacarosa (4% y 8%) afectó notablemente a la eficiencia, mientras que el efecto de la dosis MS ( $\frac{1}{2}\times$ MS y  $1\times$ MS) tuvo un efecto menor. Así, al contrario de las dosis de sacarosa recomendadas por la literatura para la germinación *in vitro* de embriones precoces de diversas especies (8-12%), nosotros demostramos que niveles del 4% ofrecen la mejor respuesta a la germinación en todos los estadios evaluados, con una tasa media de germinación de 43%. En el caso de las sales minerales, la dosis  $\frac{1}{2}\times$ MS presentó la mayor tasa promedio de germinación (48 *v/s* 38%). En consecuencia se decidió utilizar la formulación de sacarosa al 4% y sales minerales a  $\frac{1}{2}\times$ MS para continuar la optimización de medios.

Fijados estos parámetros, se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento AIA y zeatina sobre la germinación de embriones inmaduros de cuatro accesiones de *C. annuum* en los cuatro estadios, encontrando que los reguladores a baja dosis (0,01 mg/L) permitieron las tasas medias más altas (33%), seguidos del medio en que estos reguladores estaban ausentes (24%), mientras que los reguladores a altas dosis (0,2 mg/L) afectaron negativamente a las tasas de germinación, especialmente en el caso de la zeatina, con tasas extremadamente bajas, comprendidas entre 0% y 6% en todos los genotipos y estadios de desarrollo.

Finalmente, trabajando sobre el medio con bajos niveles (0,01 mg/L) de AIA y zeatina, la incubación en oscuridad durante un período de cinco días mostró ser, en todos los estadios, un factor positivo en la eficiencia de la germinación *in vitro* de embriones de pimiento (*C. annuum*), destacando los estadios corazón, en el que la tasa de germinación aumentó de un 17% a un 27% y, especialmente el estadio globular, cuya tasa de germinación media aumentó de un 3% a un 22%. Si bien estas tasas de



germinación pueden parecer bajas, realmente debe ser considerada un éxito pues hasta ahora no se había descrito la germinación *in vitro* de los embriones más tempranos y delicados (globulares) de *Capsicum*. Asimismo, las tasas registradas para el siguiente estadio (corazón) son considerablemente más altas que las descritas hasta ahora por otros autores. Además, en ciertas hibridaciones interespecíficas, el aborto embrionario ocurre en un estadio temprano, por lo cual es necesario para los mejoradores disponer de protocolos que permitan rescatar el embrión en cualquier estadio, incluido los más precoces. Así, la mejor combinación de los factores estudiados para las máximas tasas de germinación sería: sacarosa 4%, ½×MS (alternativamente 1×MS para los embriones globulares de determinados genotipos), AIA a 0,01 mg/L, zeatina a 0,01 mg/L e incubación inicial de 5 días bajo oscuridad.

Respecto a la transferencia de material genético de interés desde *C. baccatum* a *C. annuum* hemos validado ambas estrategias estudiadas. Por un lado, en la estrategia del puente genético hemos definido a *C. chinense* como la especie puente ideal, mientras que hemos descartado a *C. frutescens* por las anomalías de los híbridos obtenidos y/o su baja cruzabilidad con *C. annuum* y/o *C. baccatum*. Así hemos establecido, por el número de combinaciones obtenidas y la viabilidad de polen del híbrido a tres vías, el siguiente modelo para la consecución del cruce puente híbrido (o híbrido a tres vías): [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)](♀) × *C. annuum* (♂). Por otro lado, en la estrategia del cruce directo y rescate de embriones, debido a: i) el endurecimiento prematuro del endospermo –el cual complica la extracción del embrión– ii) el bajo número de combinaciones híbridas y iii) la imposibilidad de conseguir BC1 (retrocruzamiento 1), nosotros sugerimos el siguiente modelo para la consecución de poblaciones BC1: [*C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂)](♀) × *C. annuum* (♂), aplicando la técnica del rescate al embrión F1.

Respecto al acortamiento de ciclo generacional, nuestro estudio demostró que en pimiento se puede realizar un máximo de dos generaciones al año, donde la suma de los ciclos convencionales Otoño-Invierno (OI) + Primavera-Verano (PV) ascendió a un rango de 264 y 321 días en tipos varietales como Guindilla y Bola, respectivamente. En contraste, el cultivo de embriones permitió acortar la suma de los ciclos OI + PV a un rango de 183 y 240 días para las mismas accesiones. Así, estos resultados posibilitan alcanzar al menos tres generaciones por año en *C. annuum* (hasta 4 en tipos Guindillas o

Cornicabra), permitiendo desarrollar programas de mejora que requieran F8-F10 en dos o tres años.

Mediante este estudio hemos logrado optimizar la técnica del cultivo de embriones inmaduros de pimiento, a la vez que hemos validado esta técnica en dos importantes aplicaciones directas de mejora vegetal, como son la hibridación interespecífica y el acortamiento de ciclo generacional, dejando disponible para los mejoradores de pimiento una información de gran utilidad para el desarrollo de sus programas de mejora.

## Summary

Nowadays, paprika and chile peppers (*Capsicum* spp.) are profusely cultivated throughout the world and they are amongst the most important vegetables for both fresh and spice consumption. From the five cultivated species of this genus, *C. annuum* L., is the most popular, genetically diverse, and economically important species and, therefore, continuous and huge breeding efforts are made every year to develop new improved materials. In this sense, two strategies are of paramount importance for breeding programs: i) interspecific hybridization, to harness genetic variability of related species and, ii) to shorten breeding cycles, which are necessary to produce inbred (selfed) lines or for successive backcrosses. In both case, embryo culture must be considered useful tool. Thus, this technique allows overcoming the postzygotic barrier of embryo abortion, quite usual in interspecific hybridization. In addition, it enables the excision of young embryos from immature fruits and their *in vitro* germination, instead of waiting for full ripening and recovery of mature seeds.

Thereby, the first objective of this PhD Thesis was to increase the efficiency of *in vitro* germination of immature embryos from *Capsicum* genus, dealing with the following factors: i) genetic diversity in terms of species and, even, genotypes within species, ii) the main embryo immature stages (globular, heart, torpedo and early cotyledonary) and iii) *in vitro* media formulation and culture conditions (MS salts, sucrose, growth regulators, initial dark incubation). The second objective was to evaluate and clarify the interspecific barriers which can be found within the *annuum* complex (*C. annuum*, *C. chinense* and *C. frutescens*) and between this complex with *C. baccatum*, evaluating strategies like embryo rescue and, alternatively, the genetic bridge cross to achieve *C. annuum* × *C. baccatum* hybrids. Finally, the third objective was to evaluate the usefulness of embryo culture to shorten pepper (*C. annuum*) cycles and, consequently, to accelerate breeding programs of this crop.

In our study, *in vitro* germination and adult plants were achieved for immature embryos of the five cultivated species and at all embryo stages, with the only exception of globular embryos from *C. chinense*. Regarding embryo stage, the mean efficiency of *in vitro* culture increased gradually with the stage of development: globular (5%), heart (21%), torpedo (37%) and early cotyledonary (69%). This is consistent with the reports from other species. Thus, embryos at the earliest phases of development, are highly

dependent in terms of nutrition and draw upon the endosperm, the suspensor and the surrounding maternal tissues (heterotrophic phase), while, later, they are metabolically capable of synthesizing substances required for its growth (autotrophic phase).

In terms of the composition of *in vitro* media we found that sucrose levels had the highest contribution to culture efficiency, while MS showed a lower effect. In contrast to the sucrose levels recommended in literature for early embryos (8-12%), we found that 4% levels offered the best response at any embryo stage, with an average germination rate of 43%. In the case of mineral salts,  $\frac{1}{2}\times$ MS levels provided average germination rates higher than  $1\times$ MS (48% *v/s* 38%). Therefore, sucrose at 4% and  $\frac{1}{2}\times$ MS were chosen to carry on with the optimization assay.

Once established 4% sucrose and  $\frac{1}{2}\times$ MS dose as the formulation of reference, the levels of effect of the growth regulators (indole-3-acetic acid, IAA and zeatin) were then studied for the four immature embryos stages in several *C. annuum* accessions. We found that growth regulators at a low dose (0.01 mg/L) showed on average the highest rates (33%), followed by the medium without growth regulators (24% efficiency), while high levels (0.2 mg/L) especially zeatin, had negative effects on *in vitro* germination rates, with extremely low rates, which were comprised between 0% and 6% for any genotype and embryo stage.

Finally, on the basis of the medium with 4% sucrose,  $\frac{1}{2}\times$ MS, and 0.01 mg/L of both IAA and zeatin, we found that five days of initial incubation in darkness had a favorable effect on the *in vitro* embryo germination at any embryo stage, highlighting heart stage, with a mean increase rate from 17% to 27% and, especially, in globular embryos, with an increase from 3% to 22%. Although these rates may appear relatively low, they must be considered very successful as this is the first report about the *in vitro* germination of these delicate and very early embryos in peppers. Moreover, the *in vitro* germination rates for the next stage (heart), was also considerably higher than those reported previously by other authors. This is of paramount importance for interspecific hybridizations as depending on parent genotypes, embryo abortion may occur in the earliest stages, and, therefore, breeders need protocols for embryo rescue suitable for any stage. As a whole, the best formulation for the factors under study was: sucrose 4%,  $\frac{1}{2}\times$ MS (alternatively  $1\times$ MS for globular embryos in some specific genotypes), IAA and zeatin at 0.01 mg/L, combined with five days of initial dark incubation.

Regarding the hybridization between *C. baccatum* and *C. annuum*, we have validated the two strategies under study. Within the genetic bridge strategy, we have established that *C. chinense* works very well as bridge species, while *C. frutescens* shows a lower efficiency as bridge, mainly due to abnormal hybrids or a lower crossability with both *C. baccatum* and *C. annuum*. Thus, the largest number of plants and with a high pollen fertility was achieved with this cross scheme: [*C. baccatum*<sub>(♀)</sub> × *C. chinense*<sub>(♂)</sub>]<sub>(♀)</sub> × *C. annuum*<sub>(♂)</sub>. Considering the strategy of *C. annuum* × *C. baccatum* direct cross combined with embryo rescue (based on the optimized media formulation), we observed an early hardening of the endosperm, that made very difficult embryo excision and low efficiency in terms of the number of hybrids achieved. Consequently, after hundreds of crosses and cultured embryos, we consider that the most efficient cross scheme to achieve BC1 (back cross 1) is: [*C. annuum*<sub>(♀)</sub> × *C. baccatum*<sub>(♂)</sub>]<sub>(♀)</sub> × *C. annuum*<sub>(♂)</sub>, based on *in vitro* rescue of *C. annuum*<sub>(♀)</sub> × *C. baccatum*<sub>(♂)</sub> embryos.

Finally, our study showed that no more than two generations per year are possible in peppers following conventional growing procedures. Thus, the total length of conventional breeding cycle under Autumn-Winter (AW) and Spring-Summer (SS) growing season ranged between in 264 days and 321 days in Guindilla (Cayenne) and Bola types, respectively. By contrast, the *in vitro* strategy shortened these AW + SS estimates to 183-240 days of the mentioned accessions. Such findings showed that this strategy will allow *Capsicum* breeders to achieve at least three generations per year, including California Wonder peppers, and up to four generations in the case of cayenne-type peppers. Consequently, breeding programs which require F8-F10 lines could be achieved in two or three years by means of the *in vitro* germination of immature (torpedo and early cotyledonary) embryos.

Through this study we have optimized the embryo culture technique in *Capsicum* peppers and validated this technique for two important applications in breeding: interspecific hybridization and shortening cycle, thus useful information is available to peppers breeders. In addition, the transfer of genetic material from *C. baccatum* to *C. annuum* has been achieved by means of both strategies: genetic bridge cross (using *C. chinense*) and *in vitro* rescue of *C. annuum* × *C. baccatum* embryos. Both strategies provided fertile materials and, therefore, the information reported in this

work will be very useful for *Capsicum* breeders. Moreover, it is possible to accelerate breeding programs in peppers using *in vitro* germination of immature embryos.

## Resum

En l'actualitat, pebrots, chiles i ajíes (*Capsicum* spp.) estan presents en la pràctica totalitat de les zones temperades i càlides del món. Aquest cultiu està entre les deu principals hortalisses del món i la seua popularitat es deu, en gran part, a la seua utilització gastronòmica tant per a consum en fresc com a espècia. De les cinc espècies conreades, la que cridem comunament pebrot (*Capsicum annuum*), és la més popular i econòmicament important de totes, per la qual cosa la majoria d'esforços d'investigadors i milloradors se centren en aquesta espècie. En aquest sentit, dues importants eines per a la millora dels cultius són: i) la hibridació interespecífica, per a aprofitar la variabilitat genètica de les espècies relacionades i, ii) l'escurçament del cicle generacional, ja siga per a realitzar successives autofecundacions i generar línies pures o per a realitzar retrocreuaments i transferir gens. En tots dos casos el cultiu d'embrions inmadurs podria ser de gran utilitat. En el primer, permetria sortejar la freqüent barrera postcigòtica a la hibridació interespecífica de l'avortament embrionari, mitjançant el rescat d'embrió. En el segon, permetria extraure l'embrió procedent d'un fruit inmadurs, evitant haver d'esperar la seua maduració, escurçant el cicle generacional del cultiu.

D'aquesta manera, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser augmentar l'eficiència de la germinació *in vitro* d'embrions inmadurs del gènere *Capsicum* treballant en els següents factors: i) una àmplia diversitat d'espècies i genotips, ii) els principals estadis inmadurs de desenvolupament embrionari (globular, cor, torpede i cotiledonar primerenc) i iii) diferents combinacions de mitjà de cultiu (sales MS, sacarosa, reguladors de creixement) i la incubació en foscor. Un segon objectiu va ser avaluar i aclarir les barreres interespecífiques que existeixen entre les espècies *Capsicum* del complex *annuum-chinense-frutescens* i d'aquestes amb *C. baccatum*, valorant la utilitat d'estratègies com el rescat *in vitro* d'embrions i el creuament amb espècies pont per a la consecució de creuaments entre *C. annuum* i *C. baccatum*. Finalment, el tercer objectiu va consistir a valorar la utilitat del cultiu *in vitro* d'embrions per a escurçar el cicle generacional del pebrot comú (*C. annuum*), permetent accelerar els programes de millora d'aquest cultiu.

En aquest estudi va ser possible germinar *in vitro* i obtenir plantes desenvolupades i viables de les cinc espècies estudiades a partir de tots els estadis embrionaris, amb l'única excepció dels embrions globulars de *C. chinense*. En relació al estadí embrionari es va observar un augment gradual de l'eficiència mitjana a mesura que avançava el desenvolupament de l'embrió: globular (5%), cor (21%), torpede (37%) i cotiledonar (69%). Açò coincideix amb la literatura revisada en altres espècies, i s'explicaria per una major dependència alimentosa dels embrions precoços (etapa heteròtrofa) enfront dels avançats (etapa autòtrofa).

Respecte als mitjans de cultiu emprats, es va observar que les dosis de sacarosa (4% i 8%) va afectar notablement a l'eficiència, mentre que l'efecte de la dosi MS (1/2×MS i 1×MS) va tenir un efecte menor. Així, al contrari de les dosis de sacarosa recomanades per la literatura per a la germinació *in vitro* d'embrions precoços de diverses espècies (8-12%), nosaltres vam demostrar que nivells del 4% ofereixen la millor resposta a la germinació en tots els estadis avaluats, amb una taxa mitjana de germinació de 43%. En el cas de les sals minerals, la dosi 1/2×MS va presentar la major taxa mitjana de germinació (48 v/s 38%). En conseqüència es va decidir utilitzar la formulació de sacarosa al 4% i sals minerals a 1/2×MS per a continuar l'optimització de mitjans.

Fixats aquests paràmetres, s'avalua l'efecte dels reguladors de creixement AIA i zeatina sobre la germinació d'embrions inmadurs de quatre accessions de *C. annuum* en els quatre estadis, trobant que els reguladors a baixa dosi (0,01 mg/L) van permetre les taxes mitjanes més altes (33%), seguits del mitjà en què aquests reguladors estaven absents (24%), mentre que els reguladors a altes dosis (0,2 mg/L) van afectar negativament a les taxes de germinació, especialment en el cas de la zeatina, amb taxes extremadament baixes, compreses entre 0% i 6% en tots els genotips i estadis de desenvolupament.

Finalment, treballant sobre el mitjà amb baixos nivells (0,01 mg/L) de AIA i zeatina, la incubació en fosc durant un període de cinc dies va mostrar ser, en tots els estadis, un factor positiu en l'eficiència de la germinació *in vitro* d'embrions de pebrot (*C. annuum*), destacant els estadis cor, en el qual la taxa de germinació va augmentar d'un 17% a un 27% i, especialment el estadí globular, la taxa del qual de germinació mitjana va augmentar d'un 3% a un 22%. Si bé aquestes taxes de germinació poden



semblar baixes, realment ha de ser considerada un èxit doncs fins ara no s'havia descrit la germinació *in vitro* dels embrions més primerencs i delicats (globulars) de *Capsicum*. Així mateix, les taxes registrades per al següent estadi (cor) són considerablement més altes que les descrites fins ara per altres autors. A més, en certes hibridacions interespecífiques, l'avortament embrionari ocorre en un estadi primerenc, per la qual cosa és necessari per als milloradores disposar de protocols que permeten rescatar l'embrió en qualsevol estadi, inclòs els més precoços. A manera de resum, la millor combinació dels factors estudiats per a les màximes taxes de germinació seria: sacarosa 4%,  $\frac{1}{2}$ ×MS (alternativament 1×MS per als embrions globulars de determinats genotips), AIA a 0,01 mg/L, zeatina a 0,01 mg/L i incubació inicial de 5 dies sota foscor.

Respecte a la transferència de material genètic d'interès des de *C. baccatum* a *C. annuum* hem validat ambdues estratègies estudiades. D'una banda, en l'estratègia del pont genètic hem definit a *C. chinense* com l'espècie pont ideal, mentre que hem descartat a *C. frutescens* per les anomalies dels híbrids obtinguts i/o la seua baixa creuabilitat amb *C. annuum* i/o *C. baccatum*. Així hem establert, pel nombre de combinacions obtingudes i la viabilitat de pol·len de l'híbrid a tres vies, el següent model per a la consecució del creue pont híbrid (o híbrid a tres vies): [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)](♀) × *C. annuum* (♂). D'altra banda, en l'estratègia de l'encreuament directe i rescat d'embrions, a causa de: i) l'enduriment prematur del endosperm –el qual complica l'extracció de l'embrió– ii) el baix nombre de combinacions híbrides i iii) la impossibilitat d'aconseguir BC1 (retrocreuament 1), nosaltres suggerim el següent model per a la consecució de poblacions BC1: [*C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂)](♀) × *C. annuum* (♂), aplicant la tècnica del rescat a l'embrió F1.

Respecte a l'escurçament de cicle generacional, el nostre estudi va demostrar que en pebrot es pot realitzar un màxim de dues generacions a l'any, on la suma dels cicles convencionals Tardor-Hivern (TH) + Primavera-Estiu (PE) va ascendir a un rang de 264 i 321 dies en tipus varietals com Guindilla i Bola, respectivament. En contrast, el cultiu d'embrions va permetre escurçar la suma dels cicles TH + PE a un rang de 183 i 240 dies per a les mateixes accessions. Així, aquests resultats possibiliten aconseguir almenys tres generacions per any en *C. annuum* (fins a 4 en tipus Guindillas o Cornicabra), permetent desenvolupar programes de millora que requerisquen F8-F10 en dos o tres anys.

Mitjançant aquest estudi hem aconseguit optimitzar la tècnica del cultiu d'embrions inmadurs de pebrot, alhora que hem validat aquesta tècnica en dues importants aplicacions directes de millora vegetal, com són la hibridació interespecífica i l'escurçament de cicle generacional, deixant disponible per als milloradores de pebrot una informació de gran utilitat per al desenvolupament dels seus programes de millora.

## ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCION</b>	1
1.1 Pimientos, chiles y ajíes: Importancia, taxonomía, origen y domesticación	3
1.1.1 Importancia económica	3
1.1.2 Encuadramiento taxonómico	4
1.1.3 Origen, domesticación y distribución poscolombina	7
1.2 Utilidad de la variación interespecífica	9
1.3 Hibridación interespecífica: barreras y métodos de superación	12
1.3.1 Barreras precigóticas	13
1.3.2 Barreras postcigóticas	15
1.3.3 Hibridación interespecífica entre las especies de <i>Capsicum</i>	17
1.4 Acortamiento del ciclo generacional	19
1.5 Cultivo de embriones: embriogénesis, historia y factores involucrados	20
1.5.1 La embriogénesis en las plantas superiores	20
1.5.2 Historia del cultivo de embriones	23
1.5.3 Factores determinantes en la respuesta del cultivo de embriones	24
<b>2. OBJETIVOS</b>	31
<b>3. TRABAJOS CIENTÍFICOS</b>	35
3.1 Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the <i>in vitro</i> culture efficiency of immature zygotic embryos from genus <i>Capsicum</i>	37
3.2 Effect of growth regulators and initial dark incubation on the <i>in vitro</i> culture efficiency of immature zygotic embryos from peppers ( <i>Capsicum annuum</i> )	63
3.3 <i>In vitro</i> germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers ( <i>Capsicum annuum</i> L.)	81

3.4 Comparison between genetic bridge (GB) and embryo rescue (ER) techniques to achieve gene transfer from <i>Capsicum baccatum</i> to common pepper ( <i>C. annuum</i> )	105
<b>4. DISCUSIÓN GENERAL</b>	131
4.1 Optimización del cultivo <i>in vitro</i> de embriones inmaduros	133
4.2 Consecución de la hibridación interespecífica <i>C. annuum</i> × <i>C. baccatum</i> mediante rescate de embriones y cruce puente genético con <i>C. chinense</i> y <i>C. frutescens</i>	138
4.2.1 Rescate de embriones interespecíficos <i>C. annuum</i> × <i>C. baccatum</i>	139
4.2.2 Cruce puente genético	140
4.2.2.1 Puente genético: <i>C. chinense</i>	140
4.2.2.2 Puente genético: <i>C. frutescens</i>	143
4.3 Evaluación del acortamiento de ciclo generacional, mediante el cultivo de embriones, en pimiento	144
4.3.1 Ciclo de Otoño-Invierno	145
4.3.2 Ciclo de Primavera-Verano	146
4.3.3 Implicaciones para la mejora	147
<b>5. CONCLUSIONES</b>	149
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	155

## **1. INTRODUCCIÓN**





## **1.1 Pimientos, chiles y ajíes: Importancia, taxonomía, origen y domesticación**

### **1.1.1 Importancia económica**

En la actualidad, pimientos, chiles y ajíes están presentes en la práctica totalidad de las zonas templadas y cálidas del mundo (Nuez et al., 2003). Este cultivo está entre las diez principales hortalizas del mundo y su popularidad se debe, en gran parte, a su utilización gastronómica tanto para consumo en fresco y sus distintas aplicaciones culinarias: asado, enlatado, encurtido (guindillas, jalapeños, pimiento morrón blanco), relleno (piquillo morrón), como especia: fruto entero (fresco o seco) en sopas y caldos, frutos troceados (fresco o seco y en escama), molienda más o menos fina (pimentón dulce o picante), secos y ahumados (pimentón de La Vera, jalapeño = chipotle), mezclado formando parte de innumerables salsas (szechuan china, berbere etíope, tabasco de Luisiana, mole poblano, mojo picón de Canarias), oleorresinas.

La producción mundial de este cultivo alcanza  $33 \times 10^6$  de toneladas –90% para consumo en fresco y 10% para seco– provenientes de casi  $4 \times 10^6$  hectáreas –repartidas la mitad para consumo en fresco y la mitad para seco– (FAOSTAT, 2011). En el caso del pimiento fresco, España produce más de  $900 \times 10^3$  toneladas al año, siendo el sexto productor mundial, superado sólo por China, México, Turquía, Indonesia y USA. La mitad de esta producción va destinada a la exportación –hacia países como Alemania, Francia y Reino Unido– convirtiéndose, junto a Holanda, en el principal país exportador de la Unión Europea. Por lo que respecta a los rendimientos, destacan Bélgica (278 t/ha), Holanda (269 t/ha), Reino Unido (265 t/ha) y Finlandia (120 t/ha). Estos altísimos rendimientos se deben, por una parte, a que un alto porcentaje del cultivo se realiza en invernaderos y, por otra, que estos invernaderos son de alta tecnología y consumo energético, por lo que la producción se extiende varios meses. En el caso de España el rendimiento alcanza 53 t/ha, ocupando el decimosegundo puesto en el mundo (FAOSTAT, 2011). A nivel nacional el 60% de la producción se concentra en Andalucía, especialmente en Almería, seguida de lejos por la región de Murcia y Galicia (Fig. 1) (MAGRAMA, 2012).

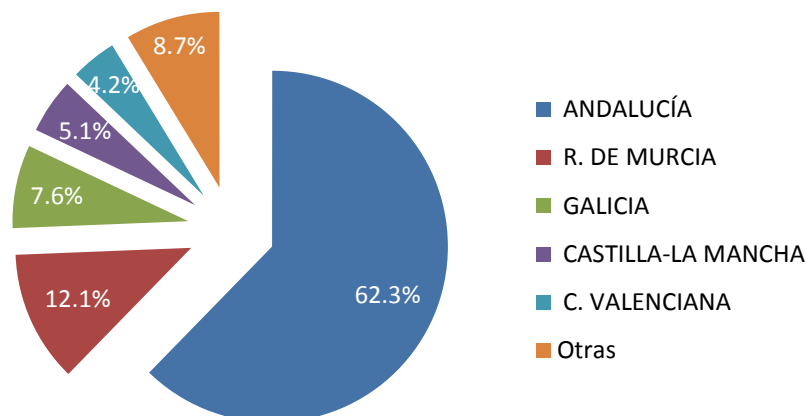


Figura 1. Distribución por comunidad de la producción de pimientos frescos en España.

### 1.1.2 Encuadramiento taxonómico

Pimientos, chiles y ajíes pertenecen a la familia de las Solanáceas, la cual está formada por unos 90 géneros, y engloba a otras especies cultivadas de gran importancia como el tomate, la patata y la berenjena. En concreto, este cultivo se adscribe al género *Capsicum*, cuya etimología deriva del griego, según unos autores de *kapsō* (picar) y según otros de *kapsakes* (cápsula) debido a la morfología del fruto (Nuez et al., 2003). Asimismo, las distintas terminologías que se emplean para denominar a los frutos de plantas de este género obedecen más a criterios culturales y geográficos que a una estricta denominación botánica. Así, el término “pimiento” deriva del primer viaje de Colón a América en el cual lo describió como un cultivo equivalente a la pimienta de Asia (*Piper nigrum* L.), “chiles” utilizado en México, EEUU y mundo anglosajón, deriva del nauhtl *chilli* y “ajíes” utilizado en Centroamérica y Sudamérica, proviene del taíno de Santo Domingo *axí*.

Dentro de este género se han descrito 27 especies, de las cuales cinco han sido domesticadas por los nativos americanos: *Capsicum annuum* L. var. *annuum*, *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. var. *pendulum* y *C. pubescens* R. & P, todas ellas con número cromosómico  $2n=24$ . Las tres primeras especies componen el complejo *annuum* caracterizado por poseer flores de corola blanca y una relativa cercanía filogenética, mientras que *C. baccatum* (flores de corola blanca con manchas amarillas verdosas) y *C. pubescens* (flores de corola púrpuras y semillas negras y

rugosas) pertenecen a complejos diferentes (Pickersgill, 1971). A pesar de las complejidades taxonómicas en la clasificación de especies dentro del género, se han desarrollado unas sencillas claves (Tabla 1), basadas en la morfología floral (color de la flor, número de flores por nudo, color de la corola, color de la antera), la presencia o ausencia de constricción anular, el color de la semilla o la forma del margen del cáliz de los frutos (Fig. 2), que permiten distinguirlas.

Tabla 1. Clave identificativa de las cinco especies cultivadas de *Capsicum* spp. (DeWitt y Bosland, 1996).

Descriptor	Especie o descriptor a seguir
1. Semillas negras, corola púrpura	<i>C. pubescens</i>
1. Semillas color paja	2
2. Corola con manchas	<i>C. baccatum</i>
2. Corola sin manchas	3
3. Corola blanca	4
3. Corola verduzca	5
4. Flores solitarias y filamento no púrpura	<i>C. annuum</i>
4. Dos flores o más por nudo y filamento púrpura	<i>C. chinense</i>
5. Flores solitarias pequeñas y pétalos revolutos	<i>C. frutescens</i>
5. Dos flores o más por nudo	<i>C. chinense</i>



Figura 2. Ilustración de caracteres morfológicos utilizados para la identificación de especies dentro del género *Capsicum*. En la parte superior, de izquierda a derecha, se observa flor de corola blanca, sin manchas y filamentos no púrpura (típica de *C. annuum*), flor con filamentos púrpura (típico de *C. frutescens* y *C. chinense*), corola con manchas (típica de *C. baccatum*) y corola púrpura (típica de *C. pubescens*). En la parte inferior, de izquierda a derecha, se observan flores características de *C. frutescens*, seguido de frutos con constricción anular, típica de *C. chinense*, y semillas color paja y negras, estas últimas propias de *C. pubescens*.

La especie más popular y económicamente importante de todas, es la que llamamos comúnmente pimiento (*C. annuum*) y abarca una extraordinaria diversidad varietal (Fig. 3). *C. chinense* está muy extendida en Latinoamérica, siendo muy popular en México y el Caribe. El Chile Habanero, Ají Panca, Ají Limo y Bhut Jolokia, son los tipos más conocido de esta especie. *C. frutescens* es especialmente popular en Asia, África, Latinoamérica y Sur de EEUU y su tipo más conocido es el “Chile Tabasco”. *C. baccatum* presenta actualmente una amplia distribución mundial, siendo las guindillas y ajíes su forma más popular. Finalmente, *C. pubescens* (también conocido como ají rocoto/locoto) es la menos conocida, aunque su cultivo está muy arraigado en la región andina (Nuez et al., 2003).



Figura 3. Ejemplo de diversidad varietal en frutos de *C. annuum*

En consonancia con el grado de importancia económica, debemos señalar que *C. annuum* ha monopolizado el esfuerzo de investigadores y mejoradores, aunque también existen algunos programas de mejora que incluyen a *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens*. La investigación en *C. pubescens* es prácticamente inexistente.

### 1.1.3 Origen, domesticación y distribución poscolombina

Respecto al origen y domesticación de pimientos, chiles y ajíes, diferentes hallazgos arqueológicos en cuevas de la región andina las han clasificado entre las primeras plantas domesticadas de la región, junto a otras especies pertenecientes a los géneros *Phaseolus* y *Cucurbita*, (Nuez et al., 2003). La teoría más aceptada fue propuesta por Mc. Leod et al. (1982), por la cual se establece que una porción importante del género *Capsicum* se originó en un área nuclear en Bolivia sud-central, desde donde se produjeron diversas migraciones a los Andes y tierras bajas de la Amazonía. Así, por las tierras altas de los Andes habría migrado el grupo de flores púrpura, originando como especie domesticada a *C. pubescens*. Mientras que al sur de Bolivia, en zonas relativamente secas, habría migrado el ancestro que originó *C. baccatum*, y esta misma forma silvestre, a través del río Mizque, habría migrado a las tierras bajas de Bolivia tropical y a la cuenca amazónica, dando origen al progenitor silvestre del complejo *annuum*, que posteriormente se propagaría desde la Amazonía a Centroamérica y el Caribe con la aparición de las especies domesticadas *C. frutescens* y *C. chinense*, extendiéndose finalmente hasta México donde se domesticaría *C. annuum* (Fig. 4). Esta teoría se condice también con el estudio del número de translocaciones cromosómicas en que difieren las distintas especies domesticadas del género *Capsicum* (Pickersgill, 1988).

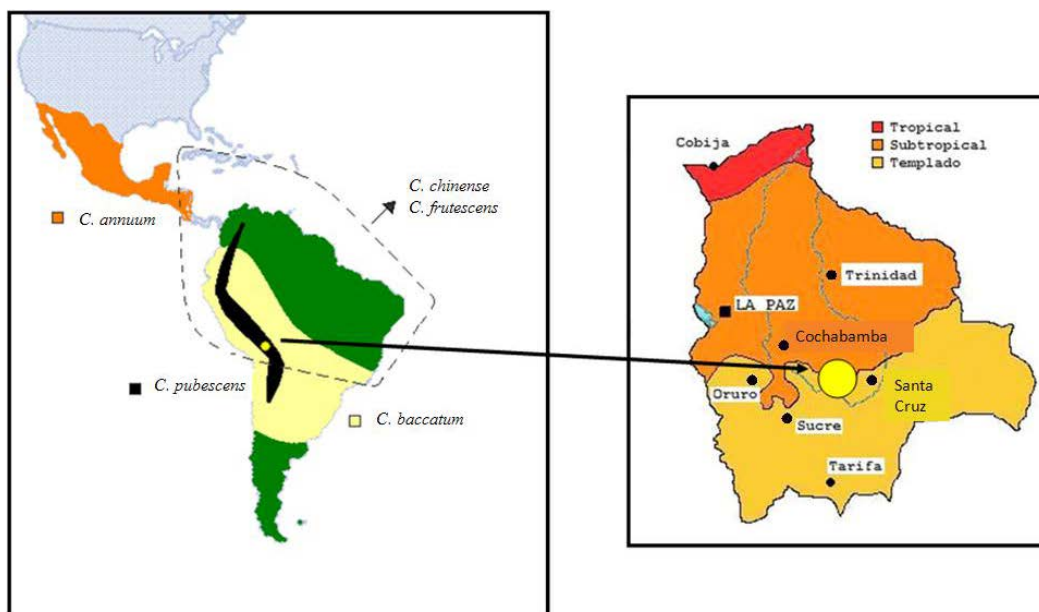


Figura 4. Mapa de localización del centro de origen y domesticación del género *Capsicum*.

De este modo, la domesticación condujo a modificar la planta y, especialmente, los frutos. El hombre seleccionó y conservó una amplia diversidad de tipos de color, tamaño, forma e intensidad del sabor picante. Los tipos dulces también fueron conocidos precozmente, aunque fueron escasamente apreciados.

En América la importancia de los frutos de *Capsicum* fue extraordinaria. En efecto, la dieta azteca estaba basada en el maíz, frijol, amaranto y chía, utilizando como especias básicas el tomate, chile, cacao y cilantro. Además, el chile era uno de los tributos debidos a la ciudad de Tenochtitlán. Del mismo modo, los alimentos mayas eran similares a los aztecas, destacando el maíz, carne de caza, miel, chile y cacao. Por otra parte, la comida incaica más frecuente era el *chuño* consistente en patata parcialmente deshidratada con agua, condimentada con ají y sal. Los pueblos amazónicos utilizaban la yuca para elaborar el pan de cazabe y el manico, los cuales se mojaban en una olla que contenía hervido de chile con trozos de caza (Nuez et al., 2003).

Por otro lado, en la Europa del siglo XV las especias provenientes de Asia tenían un gran valor económico y su control era un mecanismo de poder. Éstas eran utilizadas como saborizantes, como sustancias conservantes de los alimentos y también para evitar los parásitos intestinales, tan frecuentes entonces, dadas las diferentes condiciones de vida que impedían una higiene en la alimentación que hoy es habitual (Blanco y Morales, 1990). La expedición dirigida por Colón tuvo como objetivo buscar una ruta alternativa hacia Asia, evitando la ruta africana controlada por Portugal. Aunque Colón no encontró una nueva ruta hacia Oriente, sí encontró una nueva y gran variedad de plantas alimenticias, enviando a España todo aquello que presentara potencial económico. Obviamente, los pimientos se presentaban como una excelente alternativa a la pimienta de Asia (*Piper nigrum* L.), lo que explicaría su veloz difusión por el Viejo Mundo. Así, ya en el siglo XVI el pimiento aparece ampliamente difundido por Europa. Primero, desde España hacia el Mediterráneo, Inglaterra y Europa Central (Namesny, 2006) y, posteriormente, durante el siglo XVI de la mano de Portugal, se difundiría *C. frutescens* y *C. chinense*, desde sus colonias brasileñas hacia sus áreas de influencia en África, China (s. XVII-XVIII) e India (s. XIX), lo que explica el arraigo que los chiles tienen en la gastronomía de estas regiones (Greenleaf, 1986).

## 1.2 Utilidad de la variación interespecífica

El inicio de la domesticación, hace aproximadamente 12000 años, transformó una sociedad nómada, cuya principal actividad era la recolección de frutos silvestres y la caza de animales salvajes, en una sociedad agrícola-ganadera que adaptó, tanto plantas como animales, a necesidades humanas tales como la alimentación, vestimenta, transporte, animales de tiro o carga, medicamentos, material de construcción, combustibles, etc. Este proceso –ocurrido de modo independiente en el creciente fértil, la zona andina de Sudamérica, México y algunas partes de Asia, expandiéndose posteriormente por todo el mundo (Diamond, 1997)– arrastró consigo una importante reducción en la diversidad genética, debido principalmente a dos factores: i) dado que se generó a partir una pequeña porción de la población silvestre ancestral, arrastró un efecto de deriva genética (cuello de botella) y ii) la selección de caracteres deseables por el hombre (disminución de la ramificación, maduración rápida y uniforme, reducción de las espinas, amargor y toxinas dañinas, reducción de la dispersión de semillas, aumento de producción con mayores tamaños de semillas y frutos, reducción de la dormancia, enanismos, ausencia de semillas, etc.) (Olsen y Gross, 2008). Este último factor arrastró también un efecto sobre la pérdida de resistencia a plagas y enfermedades, debido a la disminución o desaparición de sustancias tóxicas o caracteres morfológicos que servían de defensa natural a la planta (Pérez de la Vega, 2010). Por otra parte, más recientemente, la revolución verde (1940-1970) fomentó una nueva forma de agricultura, basada en la uniformidad y el monocultivo, produciendo un segundo cuello de botella, el cual ha diezmando aún más la variabilidad de los cultivos, limitando el trabajo de los mejoradores.

Para conseguir aumentar la variabilidad disponible en los cultivos (variedades comerciales, tradicionales o bancos de germoplasma), los mejoradores intentan generar nueva variabilidad o utilizar la variabilidad existente en otras especies (interespecíficos). Para la generación de nueva variabilidad se utilizan estrategias tales como la radiación iónica, químicos mutagénicos o variación somaclonal. Todas estas mutaciones ocurren aleatoriamente en el genoma, por lo que la probabilidad de encontrar un carácter específico es muy baja, estando su aplicabilidad fundamentalmente orientada a mutantes de tipo ornamental. Alternativamente, para aprovechar la variabilidad interespecífica los mejoradores utilizan principalmente dos vías, hibridación interespecífica o transgénesis. La primera vía se ciñe a la variabilidad

existente en especies relacionadas, cuya hibridación requiere de técnicas específicas que permitan superar las posibles barreras a la hibridación existentes, mientras que la segunda vía amplía la potencial variabilidad a especies lejanas. Sin embargo, su rechazo social y complejidad (baja tasa de regeneración de las células transformadas) la convierten en una técnica limitada. En la práctica, hoy día, la primera vía es la más utilizada. De este modo, la mayoría de cultivares modernos contienen genes que proceden de alguna especie relacionada. A modo de ejemplo, en variedades comerciales de patata (*Solanum tuberosum*) encontramos hasta 12 caracteres incorporados desde especies relacionadas, mientras que en tomate (*Solanum lycopersicum*) encontramos más de 50 caracteres, la mayoría asociado a resistencia a plagas y enfermedades, aunque también a la calidad del producto, rendimiento, androesterilidad, resistencia a salinidad y sequía, entre otras (Hajjar y Hodgkin, 2007).

En el caso del pimiento, al igual que en la mayoría de especies hortícolas, la utilización de las especies relacionadas se ha dirigido principalmente a cribados para la búsqueda de fuentes de resistencia a diversas virosis, bacterias, hongos y nematodos (Tabla 2). Respecto a los factores de calidad, estos son dependientes de la forma de consumo. Así, para el consumo como hortaliza, son fundamentales la calidad organoléptica, el valor nutritivo y la calidad externa, mientras que para el uso como especia, los factores más importantes son la pungencia y la capacidad colorante (Rodríguez-Burruezo y Nuez, 2006). Salvo algunas excepciones, la mejora en estos parámetros se ha limitado a la utilización de la variabilidad intraespecífica. De igual modo, la búsqueda de resistencia a estreses abióticos se ha restringido sólo a hibridación intraespecífica para transferir tolerancias a salinidad y altas temperaturas (Yoon et al., 1989). En cualquier caso, el menor interés en la mejora para estreses abióticos se puede explicar por el uso de sistemas altamente controlados de producción como los invernaderos y sistemas sin suelo. En conclusión, el desarrollo y optimización de protocolos para la hibridación interespecífica permitirá a los mejoradores poder explotar recursos fitogenéticos de especies relacionadas no sólo para la resistencia a plagas y enfermedades, sino que también para caracteres relativos a la calidad y estreses abióticos.



Tabla 2. Resistencia a estreses bióticos halladas en especies domesticadas de *Capsicum* relacionadas con el pimiento común.

Fuente/resistencia	Agente	Organismo	Control genético	Cita
<i>C. chinense</i>				
Varias	Virus	Pepper Mild Mottle Virus (PMMV)	Monogénica dominante ( $L^3$ ). Alélico de $L^1$ y $L^2$	Boukema, 1980
Varias	Virus	Potato Virus Y (PVY)	No determinada	Nuez et al., 2003
PI152225	Virus	Tobacco Etch Virus (TEV)	Monogénica recesiva ( <i>etc</i> )	Greenleaf, 1956
PI152225	Virus	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	Monogénica dominante ( <i>Tsw</i> ). Raza específica	Black et al., 1991; Boiteux et al., 1993
Varias	Bacteria	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	No determinada	Kaan y Anais, 1977
Varias	Bacteria	<i>Xanthomonas campestris</i>	No determinada	Crosby, 2008
Varias	Hongo	<i>Leveillula taurica</i>	Multigénica recesiva, penetrancia incompleta	Crosby, 2008
Fidel	Hongo	<i>Phytophthora capsici</i>	Digénica recesiva	González, 2003
Varias	Hongo	<i>Verticillium</i> spp.	No determinada	Gil ortega y Barriuso, 1989
PBC932	Hongo	<i>Colletotrichum capsici</i>	Monogénica recesiva ( $co^1$ , $co^2$ , $co^3$ )	Pakdeevaporn et al., 2005
Varias	Nematodo	<i>Meloidogyne incognita</i>	Monogénico dominante. Alélico al gen <i>N</i>	Fery y Thies, 1998
<i>C. frutescens</i>				
BG2814-6	Virus	Cucumis Mosaic Virus (CMV)	Digénica recesiva. Penetrancia incompleta	Grube et al., 2000
Varias	Virus	Potato Virus Y (PVY)	No determinada	Nuez et al., 2003
Tabasco pepper	Virus	Tobacco Mosaic Virus (TMV)	Monogénica dominante ( $L^2$ ). Alélico $L^1$ . Termodependiente	Holmes, 1937
Tabasco pepper	Virus	Tomato Mosaic Virus (ToMV)	Monogénica dominante ( $L^2$ ). Alélico $L^1$ . Termodependiente	Nuez et al., 2003
Varias	Virus	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	No determinada	Nuez et al., 2003
Varias	Bacteria	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	No determinada	Kaan y Anais, 1977
African pepper	Hongo	<i>Leveillula taurica</i>	No determinada	Shifriss et al., 1992 ; Daubeze et al., 1995
Varias	Hongo	<i>Verticillium</i> spp.	No determinada	Gil ortega y Barriuso, 1989
<i>C. baccatum</i>				
Varias	Virus	Cucumis Mosaic Virus (CMV)	No determinada	Crosby, 2008
Varias	Virus	Pepper Mild Mottle Virus (PMMV)	No determinada	Greenleaf, 1986
Varias	Virus	Potato Virus Y (PVY)	No determinada	Nuez et al., 2003
Varias	Virus	Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)	No determinada	Nuez et al., 2003
Varias	Bacteria	<i>Xanthomonas campestris</i>	No determinada	Crosby, 2008
Varias	Hongo	<i>Leveillula taurica</i>	No determinada	Crosby, 2008
Varias	Hongo	<i>Verticillium</i> spp.	No determinada	Gil ortega y Barriuso, 1989
PBC80, PBC81	Hongo	<i>Colletotrichum</i> spp.	No determinada	Montri et al. 2009, Mongkolporn et al., 2010

### 1.3 Hibridación interespecífica: barreras y métodos de superación

El concepto especie es cambiante en el tiempo y espacio y hace referencia a un grupo de individuos pertenecientes a una población que poseen la capacidad de reproducirse y dejar indefinidamente descendencia fértil. Así, las especies difieren entre sí, no sólo por diferencias genómicas, sino también por mecanismos reproductivos que impiden que ocurra de modo natural la hibridación (Camadro et al., 2004). A estos mecanismos reproductivos se les conocen como barreras a la hibridación interespecífica y son los encargados de mantener la identidad de las especies. La hibridación interespecífica implica, por tanto, el cruce entre individuos de dos especies diferentes que previamente, han compartido un ancestro común del cual han divergido debido a la especiación, ya sea gradual (cladogénesis) o instantánea. Así, es común en muchas especies vegetales, en las cuales la especiación en sentido estricto aún está ocurriendo, que se presenten genotipos que muestran cierta compatibilidad con los de la otra especie, permitiendo de modo simple la hibridación. Por el contrario, en otros casos, la especiación ha ocurrido claramente y superar las barreras existentes es mucho más complejo. Conocer estas barreras a la hibridación y los niveles a las que actúan, permiten a los mejoradores planificar la estrategia a seguir para conseguir híbridos presumiblemente difíciles, disponiendo de un mayor acervo genético para la mejora. En este sentido, diversas especies de la familia *Solanaceae* han sido utilizadas tanto en estudios básicos como aplicados de hibridación interespecífica. Así, tomate, patata, tabaco, petunia y datura han sido comúnmente utilizados para analizar diferentes barreras a la hibridación interespecíficas tales como; interacción polen-pistilo, incompatibilidad unilateral, aborto de embrión/endospermo, híbridos anómalos/estériles, entre otras (Pickersgill, 1997).

El proceso de hibridación comienza con la polinización, la cual abarca desde la salida del grano de polen viable (microgametofito) desde la antera hacia el pistilo receptor, siendo esta transferencia mediada comúnmente por un vector (*e.g.* viento, agua, insectos, aves). Las barreras a la polinización son todas aquellas que impiden la transferencia del microgametofito al gineceo receptor. Estas barreras pueden ser de tipo físico, temporal y/o por la especificidad de los polinizadores. La física se debe a que los individuos a hibridar se encontrarían en hábitats diferentes (aislados), los cuales no pueden ser cubiertos por los vectores de polinización, la temporal se refiere a que no coincide el momento en que el microgametofito es viable y el pistilo está receptivo, mientras que la especificidad de polinizadores se refiere a dos especies que no

comparten el mismo vector de polinización. La superación de estas barreras es, dependiendo la especie, relativamente simple y se basa en el almacenamiento del microgametofito. Para ello existen diversas técnicas: congelación y secado, criopreservación, solventes orgánicos, etc., siendo la más común y simple para un corto plazo, el almacenamiento a baja temperatura (entre -20 y 4°C) y humedad (<10%) (Seguí, 2010).

Una vez que el polen llega al pistilo, es necesario que se produzca una secuencia de eventos fisiológicos –germinación del polen, desarrollo del tubo polínico, fecundación, desarrollo del embrión y el endospermo, germinación de la semilla, obtención de híbridos viables y fértiles– los que en una hibridación interespecífica pueden ser interrumpidos por barreras a la reproducción. Stebbins (1950) dividió estas barreras en dos grandes grupos dependiendo del momento de la reproducción en el que actúan. Así, si éstas tienen lugar antes de la fecundación y la formación del cigoto, les denominó barreras precigóticas y si se presentan tras la formación del cigoto, barreras postcigóticas.

### **1.3.1 Barreras precigóticas**

Cualquier situación que interrumpa procesos como la adhesión, rehidratación y germinación del polen en el estigma, el crecimiento del tubo polínico a través del estilo o la entrada del tubo polínico a los óvulos para que ocurra la doble fecundación – procesos propio de angiospermas en el que por una parte se fusionan el gameto femenino (oosfera) y masculino (célula espermática) formando el cigoto unicelular y por otra, se fusiona otra célula espermática con los dos núcleos polares, formando un núcleo de endospermo triploide, a partir del cual se desarrollará el endospermo (Taiz y Zeiger, 2006)– son considerados barreras de tipo precigóticas.

Los principales métodos utilizados para superar estas barreras son:

- Polinización del estilo incompleto o amputación de estilo  
Permite acortar la distancia de germinación requerida para la fecundación, sortear barreras de reconocimiento polen-estigma y sortear bloqueos que se producen en el estilo durante la germinación del tubo polínico (Blakeslee, 1945).

- Injerto estilar  
Aunque de mayor complejidad que el método anterior, permite que el grano de polen disponga de las sustancias específicas, emitidas por el estigma, para su germinación, contrario a lo que ocurre con la polinización del estilo incompleto (Van Tuyl et al., 1991).
- Polen mentor  
Mediante una mezcla de polen con el cual queremos hibridar y polen compatible inactivado –utilizando radiación, metanol, congelación, etc. impidiéndole que fecunde a la célula huevo– se logra la interacción entre polen compatible y estigma, liberando este último ciertas sustancias que permiten al polen incompatible germinar y penetrar a través del estilo (Brown y Adiwilaga, 1991).
- Aplicación de agentes químicos  
En cruces interespecíficos en que los tubos polínicos crecen demasiado lento, se produce la senescencia y abscisión de la flor, sin dar tiempo a la fecundación, por lo que mediante fitohormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas) u otros agentes (ácido salicílico, acriflavina) se ralentiza la abscisión, dando tiempo al desarrollo del tubo polínico (Emsweller y Stuart, 1948).
- Cruce puente  
Basado en utilizar una especie filogenéticamente intermedia a las dos que se quieren hibridar, presentando una mayor compatibilidad en las hibridaciones.

Cabe hacer notar que las dos últimas técnicas no sólo se restringen al sorteo de barreras precigóticas, sino también a las de tipo postcigótico. Así, en ocasiones es necesario utilizar agentes químicos que eviten la abscisión del fruto, permitiendo el crecimiento del embrión hasta una etapa que permita su rescate (Subrahmanyam, 1979), o la utilización del cruce puente para la hibridación entre especies con diferentes niveles de ploidía (por ejemplo, la introgresión de caracteres desde especies diploides a tetraploides), en los que aparecen problemas de apareamientos cromosómicos en la meiosis, provocando esterilidad en los híbridos (Hermsen, 1984).

Algo más complejas y menos utilizadas son las técnicas de:

- Polinización *in vitro*  
Basada en cultivar *in vitro* el pistilo, ovario, placenta o incluso los mismos óvulos para polinizarlos en el medio de cultivo, pudiendo controlar los nutrientes para el desarrollo de la flor, seguido de un rescate del embrión híbrido (Kameya y Hinata, 1970).
- Fecundación *in vitro*  
Extremadamente compleja, consiste en la aislación de los gametos (espermátidas y oosfera), mediante métodos físicos, osmóticos y enzimáticos, con una posterior fusión de gametos, mediante métodos químicos, de electrofusión o de microinyección. El método ha sido poco utilizado y a la fecha sólo Kranz y Lorz (1993) lo han conseguido en maíz.

Finalmente, otra técnica utilizada para conseguir híbridos interespecíficos es la fusión de protoplastos (células somáticas carentes de pared celular), que aunque no involucren a las células sexuales, permiten obtener los juegos cromosómicos de ambas especies en una célula común poliploide.

### **1.3.2 Barreras postcigóticas**

Por otra parte, cualquier situación que interrumpa procesos como el desarrollo del embrión o el endospermo, maduración y germinación de la semilla, y el desarrollo del híbrido interespecífico viable y fértil, son consideradas barreras de tipo postcigótico. Paradójicamente, a pesar de ser más frecuentes que las precigóticas y que, en muchos casos, suelen aparecer tras superar estas últimas, han recibido una menor atención, por lo que conocerlas y establecer técnicas que permitan superarlas es clave para la mejora vegetal (Seguí, 2010). En general, los principales métodos para la superación de barreras postcigóticas ponen énfasis en evitar el aborto del embrión y/o la inviabilidad en los híbridos, ya sea por un desarrollo anómalo o esterilidad que impida dejar descendencia. Así, el cultivo de embriones (Hannig, 1904), con su posterior aplicación/evolución técnica de rescate de embriones interespecíficos potencialmente abortivos (Laibach, 1925) es desde hace décadas, la estrategia más utilizada para

superar el aborto del embrión y/o endospermo y conseguir híbridos interespecíficos. Dada la importancia de esta técnica en nuestro estudio, se destinará un apartado exclusivo para su análisis (1.5).

Alternativas al rescate de embriones son el cultivo de óvulos (Rangan, 1984), láminas de ovario (Kano et al., 1988) u ovario (Inomata, 1979) ya fecundados. Los cuales permiten trabajar con especies de semillas muy pequeñas o embriones híbridos que abortan en estadios muy precoces, en los cuales la extracción temprana del embrión es muy compleja y/o infructuosa.

Respecto a la inviabilidad del híbrido, es la última barrera descrita antes de completar el ciclo generacional. Aunque ha sido poco estudiada, es conocido que los híbridos deformes y/o débiles debido a incompatibilidad entre genes nucleares de ambos parentales es una barrera extremadamente compleja de superar, restringiéndose tan solo al uso de distintos genotipos o de una especie intermedia (puente genético) que aplaque el efecto de estos genes. Por el contrario, si la incompatibilidad se debe a la interacción entre genes nucleares de una especie y los citoplasmáticos del parental femenino, bastaría tan solo utilizar el cruce recíproco, obteniendo así un híbrido viable y libre de los genes citoplasmáticos causantes de la incompatibilidad.

Finalmente, en el caso de los híbridos “estériles”, utilizando análisis de viabilidad de polen se ha observado que en muchas ocasiones, algunos granos de polen son capaces de germinar. En este sentido, diversos autores sugieren que utilizando al híbrido como parental femenino, al cabo de uno o dos retrocruces hacia una de las especies parentales, se recuperaría la viabilidad de los gametos (Pratt et al., 1985). Por último, en el caso de la esterilidad absoluta, dado que es producto de desarreglos cromosómicos durante la meiosis (Egawa y Tanaka, 1986), una alternativa para recuperar el equilibrio sería poliploidizar al híbrido (anfiploide), con agentes químicos como colchicina (Griesbach y Bhat, 1990), consiguiendo el apareamiento cromosómico normal y restaurando la fertilidad (Hermsen, 1984; Mizanur Rahim Khan et al., 2013).

### 1.3.3 Hibridación interespecífica entre las especies de *Capsicum*

Dentro del género *Capsicum* los estudios de cruzabilidad se han centrado fundamentalmente sobre las cinco especies cultivadas. Entre éstas se ha observado que para las cuatro especies del grupo de flores blancas las barreras de incompatibilidad son principalmente de tipo postcigótico (aborto embrionario, anormalidades y esterilidad del híbrido), mientras que en el cruce entre el grupo de flores blanca con el grupo de flores púrpura (complejo *pubescens*: *C. pubescens*, *C. eximium*, *C. cardenasii*) se describen dos barreras precigóticas: i) incompatibilidad unilateral, al utilizar el complejo de flores púrpuras como parental femenino (Onus y Pickersgill, 2004) y ii) durante la penetración a la célula huevo, en el cruce recíproco (Zijlstra et al., 1991). Ambas, seguidas muy probablemente de una serie de barreras postcigóticas. Así, dada la lejanía filogenética entre el grupo de flores blanca y púrpura, la hibridación entre estas especies es extremadamente compleja, habiéndose conseguido sólo alopoliploides producto de la fusión de protoplastos entre células somáticas de *C. annuum* y *C. pubescens* (Molhova, 1977). La extrema complejidad de este grupo de hibridaciones ha motivado su exclusión de la presente tesis doctoral, por lo que sólo se tratarán las hibridaciones entre especies domesticadas de flor blanca.

#### Cruzabilidad dentro del complejo *annuum*

Debido a que poseen una distribución geográfica común (Amazonía, Centroamérica y el Caribe), las especies *C. chinense* y *C. frutescens* son las que muestran mejor cruzabilidad dentro del complejo. Así, en diversos estudios se obtienen semillas de generaciones F1 y F2 con alta viabilidad de polen (Egawa y Tanaka, 1984; Pradeep-Kumar et al., 1993). Por otra parte, la especie que presenta la mejor cruzabilidad con el pimiento común (*C. annuum*) es *C. chinense* (Gopalakrishnan, 2007; DeWitt y Bosland, 2009), por lo que la mayoría de trabajos que involucran a ambas especies consiguen híbridos interespecíficos. No obstante, Lanteri y Pickersgill (1993) estudiando la meiosis del híbrido *C. annuum* (C70-7a) x *C. chinense* (C334), observaron diferencias estructurales en los cromosomas parentales y en la herencia de los mismos, lo cual se asoció a un menor tamaño del polen híbrido que motivaría una baja fertilidad (13-16%) en comparación con sus líneas parentales (85-100%). De igual modo, Cheng et al. (2007) encontraron en híbridos *C. annuum* x *C. chinense* una viabilidad de polen

muy por debajo de sus parentales. Respecto al cruce entre *C. annuum* y *C. frutescens*, se advierte una mayor complejidad que en el cruce con *C. chinense* (Heiser y Smith 1953; DeWitt y Bosland, 2009). Diversos estudios revelan incompatibilidades entre ambas especies (Falusi y Morakinyo, 1994; Gopalakrishnan, 2007). Así, Hossain et al. (2003) requirió utilizar el rescate de embriones para conseguir híbridos del cruce *C. annuum* x *C. frutescens*, lo que sugeriría la presencia de barreras postcigóticas en algunos casos. El mismo autor describe una baja fertilidad del polen de los híbridos comparados con sus líneas parentales.

#### Cruzabilidad entre el complejo *annuum* y *C. baccatum*

*C. baccatum*, al no pertenecer al complejo *annuum*, advierte barreras de cruzabilidad relativamente complejas. La principal barrera que se plantea en el cruce *C. annuum* x *C. baccatum* y su recíproco es el aborto embrionario, aunque también se dan casos en los que ni siquiera se alcanza el cuajado del fruto (Consoli *et al.*, 1992; Yang, 2001; Yoon, 2003). De igual modo, es esperable que los híbridos interespecíficos puedan mostrar una alta tasa de androesterilidad (Dumas de Vaulx y Pitrat, 1977; Egawa y Tanaka, 1986; Kumar et al., 1987; Yoon et al., 2006), por lo que sería necesario realizar sucesivos retrocruces para recuperar la fertilidad del mismo. Respecto al cruce de *C. baccatum* con *C. chinense* y *C. frutescens* se ha descrito un mayor grado de cruzabilidad entre estas especies, obteniendo híbridos interespecíficos sin la necesidad de utilizar el rescate de embriones. Esto último abre la posibilidad de utilizar estas especies como puente genético entre *C. baccatum* y *C. annuum*, requiriendo tan solo de hibridaciones y prescindiendo de la complejidad del rescate de embriones (laboratorios, cámaras de crecimiento, personal especializado). A pesar de la mayor facilidad a la hora de obtener los híbridos entre estas especies, estos híbridos suelen mostrar baja fertilidad en sus gametos (Casali y Couto, 1984; Egawa y Tanaka, 1986; Bapa Rao et al., 1992; Cheng et al., 2007), por lo que, al igual que el cruce directo entre *C. annuum* y *C. baccatum*, podría ser necesario aplicar sucesivos retrocruces para recuperar el fondo genético y la fertilidad de los gametos.



En cualquier caso, los trabajos relativos a las hibridaciones en el género *Capsicum* se muestran dispares entre los autores, probablemente debido al limitado número de genotipos evaluados, la utilización de un sólo sentido de cruce o la escasa evaluación del híbrido obtenido, por lo que es necesario realizar un estudio exhaustivo, basado en cruces recíprocos entre un amplio grado de genotipos de estas especies, definiendo así, de forma clara todas las posibles barreras existente entre estas especies.

#### **1.4 Acortamiento del ciclo generacional**

Otro desafío importante en la mejora vegetal es el acortar el período generacional de los cultivos, aumentando la eficiencia en los programas de mejora. En el caso de las hortalizas, la mayoría requiere que los frutos alcancen su estado de maduración completo con el fin de disponer de semillas viables. De lo contrario, la tasa de germinación suele ser baja o incluso nula, debido principalmente a la inmadurez de los embriones. En este sentido, diversos autores han logrado, mediante el cultivo de embriones, acortar ciclos de cultivos en meses o incluso años, esto último en el caso de semillas con largos períodos de latencia. Así, los primeros en utilizar esta técnica para la reducción del ciclo generacional fueron Randolph y Cox (1943), quienes redujeron el ciclo de *Iris* sp., cuya duración normal es de dos a tres años, a tan solo un año.

Estudios recientes demuestran el interés por esta técnica para la reducción del ciclo generacional. Así, Roumet y Morin (1997), desarrollaron un protocolo eficaz cultivando embriones inmaduros para desarrollar líneas recombinantes y acortar el ciclo reproductivo de la soja (*Glycine max*), reduciéndola de 130-140 días a tan sólo 65-70 días. Ochatt et al. (2002) lograron acortar el ciclo de cultivo del guisante (*Pisum sativum*) de 143 a tan sólo 67 días. Liu et al. (2004), mediante cultivo de embriones *in vitro*, sortearon la latencia de las semillas de la gramínea *Leymus chinensis*, permitiendo dos generaciones al año, en lugar de una con el sistema convencional. Cravero y Cointry (2007) redujeron el ciclo de la alcachofa (*Cynara cardunculus*), alcanzando dos ciclo por año. En tomate (*Solanum lycopersicum*) Bhattarai et al. (2009), con el cultivo de óvulos (cultivo *in vitro* de semilla inmadura) ampliaron de tres a cinco generaciones por año, mientras que Gebologlu et al. (2011), con el cultivo de embriones lograron acortar el ciclo de 86-98 a 53-64 días. Dagustu et al. (2010), usando embriones inmaduros de girasol (*Helianthus annuus*) cultivados en un medio *in vitro* previamente optimizado,

redujeron el ciclo de cultivo de 106-112 a 61-70 días dependiendo del genotipo. Wang et al. (2011), acortaron el ciclo de 130-140 a 89-117 días en algodón (*Gossypium hirsutum*). Tamaki et al. (2011), acortaron el ciclo generacional de papaya (*Carica papaya*) de 6-9 meses de forma convencional a tan solo tres meses.

Paradójicamente, a pesar del gran interés evidenciado por parte de los mejoradores y científicos sobre esta estrategia y experiencia, los estudios relativos al pimiento son nulos. Por ello, un estudio sobre las ventajas que aporta esta estrategia en este cultivo sería de gran interés para los investigadores y empresas dedicadas a la mejora genética de pimientos, chiles y ajíes.

## **1.5 Cultivo de embriones: embriogénesis, historia y factores involucrados**

### **1.5.1 La embriogénesis en las plantas superiores**

El proceso de desarrollo conocido como embriogénesis es el punto de partida del desarrollo de las plantas. Aunque la embriogénesis normalmente se inicia con la unión de una célula espermática con la ovocélula, formando una célula única llamada cigoto, las células somáticas también pueden sufrir embriogénesis en circunstancias especiales. No obstante, para el objetivo de este trabajo nos referiremos exclusivamente a la embriogénesis cigótica, ya que se trabajará sólo con embriones concebidos sexualmente.

La embriogénesis comienza con un cigoto unicelular, producto de la fecundación, y culmina con un embrión multicelular, el cual posee el cuerpo vegetal básico de una planta madura y muchos de los tejidos adultos, aunque de forma rudimentaria. El hecho de que los cigotos den lugar a un embrión organizado, con una estructura predecible y específica para cada especie, nos indica que el cigoto está genéticamente programado para desarrollarse de una forma determinada, y que la división, la expansión y la diferenciación celular están fuertemente controladas durante la embriogénesis. Si estos procesos se produjeran al azar en el embrión, el resultado sería un grupo de células desorganizadas sin forma ni función determinadas (Capron et al., 2009). Los pasos iniciales de la embriogénesis se caracterizan por la formación de los diferentes órganos y tejidos que constituirán el embrión (etapa morfogénica). En el

caso específico de la embriogénesis vegetal se establecen los dos patrones básicos del desarrollo: el eje apical-basal y el radial.

La embriogénesis también establece los meristemas primarios. La mayoría de las estructuras que forman la planta adulta se generan tras la embriogénesis por actividad de meristemas (Howel, 1998). La primera división del cigoto ya es asimétrica, dando lugar a dos células de diferente tamaño y densidad (Fig. 5A). La célula apical, más pequeña y densa, dará lugar a la mayor parte del embrión propiamente dicho, mientras que la basal, más grande y vacuolada, dará lugar al suspensor (órgano relacionado con la nutrición y sostén del embrión) y parte de la raíz (Fig. 5B-en adelante). La célula apical sufre diferentes divisiones hasta formar un embrión globular, de forma esférica (Fig. 5C-E). Aquí tiene lugar el primer signo del establecimiento del patrón radial del embrión. Las divisiones tangenciales que tienen lugar en el estadio de 8 células (octante) separan a las células externas (protoderma) de las internas. El protoderma dará lugar a la epidermis mediante divisiones posteriores de tipo anticlinal, mientras que las células interiores generarán los tejidos internos.

La diferenciación de los órganos y tipos de tejidos embrionarios comienza durante el período de transición de estadio globular a corazón (Fig. 5E-G). En este momento cambia la morfología del embrión, estableciéndose la polaridad apical-basal. La región apical da origen al meristemo apical y cotiledones, y la región central contribuye a la formación del hipocótilo, la radícula y el meristemo radical. Finalmente, a partir de la región basal se desarrolla el centro quiescente y el caliptrógeno, meristemo que da lugar a la cofia de la raíz o caliptra. El establecimiento del patrón apical-basal y del radial corresponde al aspecto organizativo de la embriogénesis. Es decir, los diferentes órganos, tejidos y tipos celulares deben formar un contexto coherente a nivel estructural y funcional. Una vez establecida la organización del cuerpo, mediante procesos de morfogénesis se adquiere la forma final del embrión en general y de los diferentes órganos en particular. El crecimiento y la diferenciación son mecanismos fundamentales en la orientación y número de las divisiones celulares y en la diferente expansión celular (Becerra, 2006).

El patrón de embriogénesis en plantas ha sido estudiado en profundidad empleando la planta modelo *Arabidopsis thaliana* L., y salvando las distancias, los patrones de desarrollo son muy similares a los embriones del resto de dicotiledóneas,

incluyendo a *Capsicum* spp. Así, de forma más detallada, los cuatro estadios principales de la embriogénesis en dicotiledóneas son: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. El proceso implica que después de la primera división del cigoto, la célula apical sufre una serie de divisiones, generando el embrión globular de ocho células (octante), al cabo de 30 horas tras la fecundación. Posteriormente se suceden unas rápidas divisiones celulares en dos regiones a cada uno de los lados del futuro brote apical caulinar, produciéndose asimismo protuberancias que posteriormente darán lugar a los cotiledones y a la simetría bilateral del embrión, dando lugar al embrión en fase corazón. A continuación, la elongación de las células a lo largo del eje embrionario y posterior desarrollo de los cotiledones produce el embrión en estadio torpedo (Fig. 5H). Finalmente, se llega al embrión cotiledonar, donde embrión y semilla concluyen su crecimiento, pierden agua, detienen su metabolismo y entran en latencia (Taiz y Zeiger, 2006) (Fig. 5I).

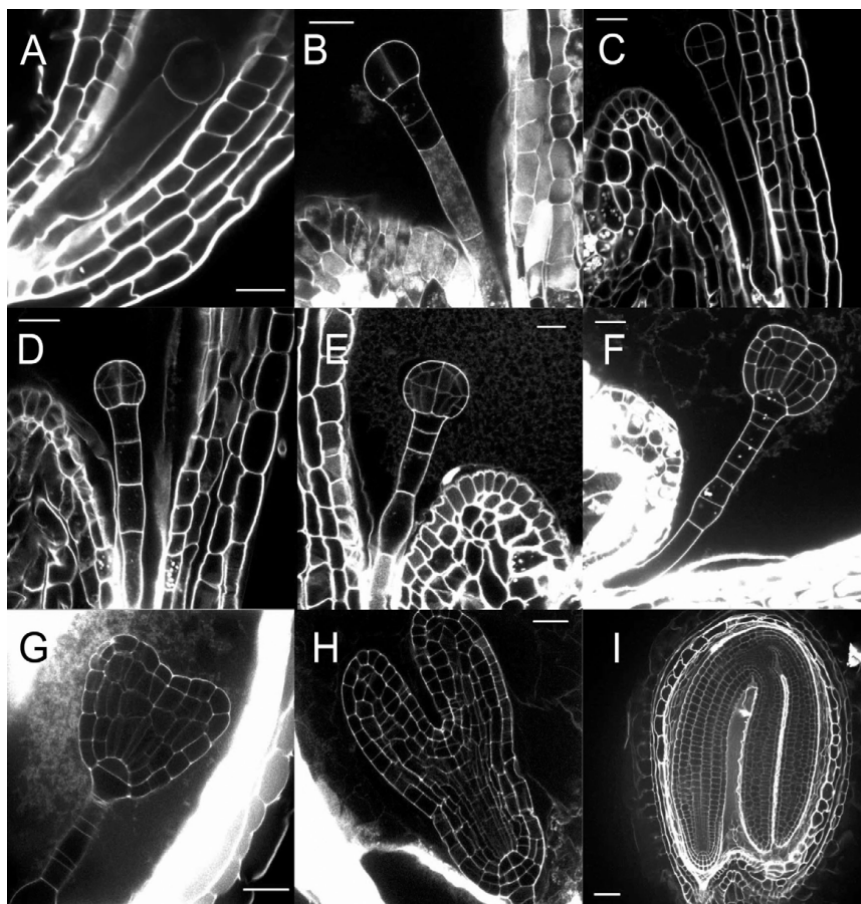


Figura 5. Estadios de la embriogénesis de *A. thaliana* al microscopio electrónico (Capron et al., 2009).  
A:cigoto, B-C-D-E: globular, F-G: corazón, H: torpedo, I: cotiledonar avanzado.

### 1.5.2 Historia del cultivo de embriones

El aislamiento de los embriones de sus respectivas semillas, y seguidamente, su desarrollo y crecimiento en un medio definido, fue iniciado por Hannig (1904), quien demostró que era posible cultivar embriones maduros de dos crucíferas (*Cochleira* y *Raphanus*) en un medio estéril con sales minerales y azúcar. Utilizando esta técnica, posteriores investigaciones se centraron en estudiar el efecto de diversos compuestos del medio tales como: sales minerales, hidratos de carbono, hormonas vegetales, compuestos nitrogenados, entre otros, con el objetivo de optimizar el cultivo.

Dietrich (1924) consiguió germinar embriones inmaduros de varias especies de vegetales. Sin embargo, las plántulas obtenidas presentaron anomalías en el crecimiento, siendo necesario optimizar el medio utilizado. La primera aplicación práctica de esta técnica fue descrita por Laibach (1925 y 1929), quien consiguió cultivar embriones maduros procedentes del cruzamiento entre *Linum perenne* x *L. austriacum*, obteniendo un híbrido interespecífico que sería imposible conseguir de modo natural. Este estudio, consistente en el rescate de embriones, fue el siguiente gran avance tras los trabajos de Hannig, y ha sido, desde entonces, una de las principales aplicaciones prácticas del cultivo de embriones.

Años después, surgió otra aplicación práctica de la mano de Tukey (1933), quien utilizó la técnica para rescatar embriones de variedades precoces de frutales, principalmente de hueso. El objetivo era asegurar la descendencia sexual de estas plantas para programas de mejora, ya que el ritmo de desarrollo del embrión era más lento que el del fruto, por lo que se producía un colapso de aquél. De esta forma se podía seguir seleccionando variedades (clones) con una mayor precocidad. Otro hito relevante fue aportado por Van Overbeek et al. (1942) donde, utilizando en el medio el líquido del endospermo del coco (agua de coco), se describe por primera vez la germinación de embriones precoces o proembriones en *Datura*. Así, la técnica podía ampliarse a sortear abortos ocurridos en estadio tempranos de desarrollo.

Finalmente, una tercera aplicación práctica fue la descrita por Randolph (1945), quien, mediante el cultivo de embriones, logró sortear latencias embrionarias en semillas de *Iris*, logrando disminuir la duración de los ciclos de mejora desde años a tan sólo algunos meses.

Desde estos inicios, el cultivo de embriones ha sido exitosamente utilizado en el campo de la mejora genética, ampliándose a otras técnicas como la microproagación, la obtención de haploides, la transformación genética o el análisis de viabilidad en semilla, entre otras (Sommer et al., 1975; Kott y Kasha, 1985; Topfer et al., 1989; Razdan, 2003).

### **1.5.3 Factores determinantes en la respuesta del cultivo de embriones**

Los principales factores que intervienen en el proceso de germinación *in vitro* y desarrollo de los embriones cigóticos son: el genotipo, el estadio del embrión (tipo de explante) y el medio y condiciones de cultivo empleados (Pierik, 1987).

El efecto del genotipo, al igual que en otras técnicas de cultivo *in vitro*, es de gran importancia, ocurriendo casos en que el medio de cultivo debe ser diseñado específicamente para un genotipo en particular. En este sentido, a modo de ejemplo, Souza et al. (2013) encontraron que para el cultivo de embriones de olivo (*Olea europea*) la dosis óptima de agua de coco varía desde 25 a 100 ml/l según el genotipo utilizado.

Respecto al tipo de explante, en nuestro caso el estadio embrionario, es lo que determinará los requerimientos de nutrientes necesarios para el desarrollo del embrión. Así, en la fase heterotrófica, el embrión inmaduro presenta una alta dependencia del endospermo y de los tejidos maternos que le rodean, requiriendo un medio más complejo y una mayor presión osmótica que los embriones maduros. Por el contrario, en la segunda fase del crecimiento del embrión, fase autotrófica, éste es metabólicamente capaz de sintetizar sustancias requeridas para el crecimiento a partir de las sales minerales y azúcar, siendo capaz de desarrollarse en un medio simple. A modo de ejemplo, en embriones de *Capsella* este evento ocurre una vez finalizado el estadio corazón. Sin embargo, el momento en que el embrión pasa de heterótrofo a autótrofo es variable dependiendo de la especie (Raghavan, 1976 y 1980).

Respecto a los componentes utilizados para el medio y las condiciones de incubación de los embriones se han encontrado efectos relevantes especialmente en: sales minerales, carbohidratos, reguladores de crecimiento, compuestos nitrogenados y aminoácidos, extractos vegetales, vitaminas, pH, luz y temperatura (Sharma, 2009).

Dado que uno de los objetivos de este trabajo consiste en la optimización del cultivo de embriones, y que el medio y condiciones de cultivo son claves para lograrlo, detallaremos a continuación el efecto de varios de estos factores.

### Sales minerales

Al igual que en otras variantes del cultivo *in vitro*, la sal más comúnmente utilizadas como base ha sido la descrita inicialmente por Murashige y Skoog (1962), comúnmente llamada MS. A este respecto, Monnier (1976), estudió la tasa de crecimiento y supervivencia de embriones inmaduros de *Capsella* en diferentes sales minerales (MS, Knop's, Nitsch, White's, Heller's). En estos experimentos observó que las soluciones minerales que promovían el crecimiento, tales como la solución MS, eran, al mismo tiempo, tóxicas, y por el contrario, soluciones no tóxicas, tales como la solución Knop, no eran capaces de inducir un desarrollo normal. Por ello modificó el medio MS y formuló una nueva solución mineral, con la que logró mantener altas tasas de crecimiento y reducir la mortalidad de los embriones de *Capsella* (Monnier, 1978). Sin embargo, la respuesta al medio en otras especies fue muy variable, siendo necesaria la optimización de las sales minerales para cada especie (Bhojwani y Razdan, 1996). En el caso del cultivo de embriones de pimiento, todos los trabajos realizados han utilizado la sal MS, con un éxito relativo. A lo sumo se han logrado buenas tasas de germinación en los estadios torpedo y cotiledonar, mientras que muy bajas tasas para el estadio corazón y nulas para el globular (Hossain et al., 2003; Yoon et al., 2006; Suprunova et al., 2010).

### Carbohidratos

Respecto a los carbohidratos, aunque en algunas especies vegetales –como maíz (*Zea mays*), *Carex* sp., diversas especies de Rosáceas e híbridos de *Lilium*– la glucosa, maltosa, lactosa, rafinosa o manitol han tenido un efecto favorable (Razdan, 2003), es la sacarosa la que, de modo general, proporciona una mejor respuesta al cultivo del embriones (Van Overbeek et al., 1942; Lofland, 1950; Rijven, 1952; Mauney, 1961; Matsubara y Nakahira, 1965; Burghardtova y Tupy, 1980). Este azúcar no sólo ha mostrado ser importante para la nutrición de los embriones, sino también para mantener un equilibrio osmótico entre el medio de cultivo y los embriones. En este sentido, Hannig (1904), enfatizó la importancia de una alta concentración de azúcar para lograr la germinación del embriones inmaduros de crucíferas, mientras que Liu et al. (1993)

demonstraron que embriones globulares de *Brassica juncea* requerían una solución del 9% de glucosa para reducir el shock osmótico. En general, la literatura sugiere que embriones maduros crecen sin problema en bajas concentraciones de sacarosa (2-3%), mientras que embriones inmaduros, en diversos taxones (*e.g. Datura, Hordeum, Capsella, Triticum*) requerirían una alta concentración de este azúcar (8-12%) para un adecuado equilibrio osmótico (Ziebur y Brink, 1951; Rijven, 1952; Rietsema et al., 1953; Norstog, 1961; Veen, 1963; Monnier, 1976, 1978; Fisher y Neuhaus, 1995). Este punto coincide con estudios realizados *in vivo* en los que se observa una alta osmolaridad en el fluido que sustenta al embrión inmaduro (Ryczkowski, 1960; Mauney, 1961; Smith, 1973). Por tanto, en principio, sería aconsejable cultivar embriones inmaduros en un medio con alto contenido en azúcar para, en la medida que crezca el embrión, ir disminuyendo su concentración (Bhojwani y Razdan, 1996).

### Reguladores de crecimiento

En cuanto al efecto de la aplicación de hormonas en el cultivo de embriones, no existe una respuesta generalizada para todos los estudios realizados. Tal como sugieren Davey y Anthony (2010), la respuesta a la aplicación de reguladores de crecimiento parece ser muy dependiente de la especie y del estadio de los embriones aislados. En este sentido, algunos autores sugieren no utilizar hormonas por la posibilidad de causar anomalías en el embrión (Monnier, 1978). Sin embargo, otros autores han demostrado que pueden ofrecer efectos positivos. Es el caso de la cebada, en la que la aplicación de una baja cantidad de giberelina favoreció a los proembriones (Umbeck y Norstog, 1979) o en *Capsella bursa-pastoris*, en la que se observó que el crecimiento *in vitro* de embriones en estadios tempranos estaba regulado por una mezcla equilibrada de ácido indol-acético (AIA) y citoquininas (Raghavan, 1964). Como regla general, se aconseja que el uso de hormonas se haga en bajas concentraciones (Monnier, 1995), siempre que haya sido descrita su presencia en el saco embrionario, ya que el cultivo *in vitro* de embriones debe tener como objetivo reproducir, en la medida de lo posible, las condiciones del endospermo.

Las auxinas utilizadas en cultivo *in vitro* pueden provenir de origen natural – ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB)– o sintético –AIB sintetizado y el ácido naftalenacético (ANA)–. Estas hormonas han mostrado una función regulatoria y son esenciales en el establecimiento de los patrones de crecimiento radial y apical-



basal de los embriones (Hamann, 2001). Raghavan (1964) demostró que la aplicación de bajas concentraciones de AIA ( $10^{-10}$  M y  $10^{-9}$  M) dio lugar al crecimiento en longitud del sistema radical primario, hipocotilos y cotiledones en embriones de *Capsella*. También aceleró la iniciación y crecimiento de las hojas embrionarias. Sin embargo, en esta misma especie, concentraciones mayores fueron menos efectivas y aquellas superiores a  $10^{-6}$  M indujeron la aparición de callo (Raghavan y Srivastava, 1982).

Las citoquininas son un grupo de hormonas que incluyen la zeatina, el ribósido de zeatina y la dihidrozeatina. En las primeras fases de desarrollo de los frutos, el endospermo, junto con las cubiertas de las semillas y el embrión, forman el reservorio principal de citoquininas. En fases más avanzadas de desarrollo, el embrión parece ser autónomo en citoquininas. En la semilla, durante el desarrollo del embrión, se produce un cambio en el contenido en distintos tipos de citoquinina, tal como demostraron Bennici y Cionini (1979) en *Phaseolus coccineus*. En los primeros estadios se encuentran tipos muy activos, como la zeatina, y en estadios medios y avanzados tipos con menor actividad, como el ribósido de zeatina. Así, la aplicación de zeatina en concentraciones de  $10^{-7}$  M a  $10^{-5}$  M, tuvo efectos favorables sólo en el desarrollo de embriones precoces. Sin embargo, al utilizarlas junto a una auxina, promovieron el crecimiento y desarrollo de los embriones en diferentes estadios (Veen, 1963).

Las giberelinas incluyen más de 100 tipos de hormonas. Sin embargo, su uso se limita frecuentemente al ácido giberélico ( $GA_3$ ). Cionini et al. (1976) estudiaron el efecto de las giberelinas en el desarrollo de embriones cigóticos de *P. coccineus*, en distintos estadios de desarrollo, concluyendo que el suspensor es el responsable de proveer al joven embrión de giberelinas. Así, la extirpación del suspensor en embriones de longitud superior a 5 mm no tuvo efecto en el desarrollo, en cambio en embriones más jóvenes supuso una reducción en el desarrollo. Por otra parte, los mismos autores encontraron que concentraciones de  $GA_3$  de  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M pueden reemplazar al suspensor en estadios tempranos (0,5-1,5 mm). Concentraciones superiores a estas ( $10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M), generalmente son inhibitorias y pueden estimular la formación de callo en algunos embriones o producir raíces cortas y ensanchadas. Así, el papel principal del ácido giberélico en el cultivo de embriones sería el de suplir de giberelinas a los embriones precoces cuando parte o la totalidad del suspensor haya sido dañado.

### Compuestos nitrogenados y aminoácidos

En términos de compuestos nitrogenados y aminoácidos, los embriones inmaduros carecen de la capacidad enzimática de reducir los nitratos a nitritos y, estos últimos, a amonio (Monnier, 1995). Diversos autores han observado que el amonio en el medio de cultivo es esencial para el crecimiento y diferenciación de embriones inmaduros (Paris et al., 1953; Matsubara, 1964; Umbeck y Norstog, 1979). Respecto a los aminoácidos, Hannig (1904) demostró que la asparagina potenciaba el crecimiento de los embriones. Sin embargo, otros autores encontraron que la glutamina sería la mejor fuente de nitrógeno para diversas especies (Brown, 1906; Paris et al., 1953; Monnier, 1978). En este sentido, Rijven (1955) encontró que la glutamina promovía, en mayor medida que la asparagina, el crecimiento embrionario en varias familias de plantas. Incluso en algunas de estas especies encontró que la asparagina fue inhibitoria en el desarrollo de embrión (*e.g. Capsella bursa-pastoris, Arabidopsis thaliana, Reseda odorata*). Mientras que Matsubara (1964), evaluando 18 aminoácidos y dos amidas, en embriones inmaduros de *Datura tatula*, encontró que, a excepción de la glutamina, todos fueron inhibitorios. Otro componente muy utilizado como fuente de nitrógeno para el cultivo de embriones es el complejo de aminoácidos presentes en la caseína hidrolizada (Monnier, 1976), la cual posee una dosis óptima de 500 mg/l en cebada (*Hordeum vulgare*) (Kent y Brink, 1947), mientras que en *Datura tatula* el óptimo es de 50 mg/l, mostrándose tóxica a niveles superiores. Ziebur et al. (1950) concluyó que las altas dosis de caseína hidrolizada favorecerían a embriones inmaduros de cebada debido al aumento del potencial osmótico, pudiendo lograr el mismo efecto que utilizando altas concentraciones de sacarosa. Sin embargo, Rangaswamy (1961), utilizando embriones inmaduros de *Citrus macrocarpa*, encontró que un 10% de sacarosa no permitía el desarrollo normal de los embriones, mientras que utilizar caseína hidrolizada (400 mg/l) favoreció su desarrollo.

### Extractos vegetales

Como se comentó en el apartado 1.5.2, el primer ensayo exitoso en la obtención de proembriones implicó el uso de extractos vegetales –concretamente endospermo del coco (agua de coco) esterilizado por filtración– con embriones de *Datura* (Van Overbeek, 1942). Desde entonces diversos autores han utilizado el agua de coco con éxito en numerosas especies (Warmke et al., 1946; Norstog, 1956 y 1961; Matsubara,

1962, Liu et al., 1993). Aunque en menor proporción, otros compuestos vegetales como, por ejemplo, extractos de caña de azúcar, cebada, tomate, zanahoria, dátiles, banana, etc. también han sido utilizados con resultados diversos (Kent y Brink, 1947; Matsubara, 1962; Nakajima, 1962).

### Vitaminas

Vitaminas como la biotina, tiamina, inositol o el ácido ascórbico, entre otras, han sido utilizadas en el cultivo de embriones. Sin embargo, rara vez han dado un efecto positivo, de hecho, algunos autores sugieren que inhibiría la morfogénesis del embrión (*e.g.* Raghavan, 1980).

### Otros factores del medio

El agente solidificante más comúnmente usado para el cultivo de embriones es el agar, a concentraciones comprendidas entre 0,5 y 1,5 %. Una alta concentración de agar puede dificultar o inhibir el crecimiento del embrión por osmosis, ya que no es capaz de extraer agua y nutrientes del medio. Respecto al pH, embriones de *Capsella* se desarrollaron sin problemas en un amplio rango de pH (5,4-7,5) el cual incluyó el pH 6,0 encontrado en el saco embrionario de esta especie (Rijven, 1952).

### Luz y oscuridad

La luz es uno de los factores ambientales más importantes, siendo ampliamente conocidos sus efectos en el crecimiento *in vivo* de las plantas. Sin embargo, en el caso del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos existen pocos estudios al respecto, salvo Razdan (2003), quien sugirió que embriones de cebada y lino requerirían una incubación inicial de cuatro días de oscuridad. Salvando las distancias, en embriogénesis somática de taxones como *Arabidopsis*, *H. annuus*, *Malus domestica*, *Camellia* sp. experimentos de un determinado fotoperíodo u oscuridad mostraron ser esenciales para el éxito de los protocolos (San-Jose y Vieitez, 1993; Paul et al., 1994; Fiore et al., 1997; Gaj, 2002). En el caso de la embriogénesis cigótica, parte del posible efecto de la oscuridad, residiría en el hecho de que hormonas, como auxinas y citoquininas son sensibles a la luz (George, 2008).

## Temperatura

La mayoría de los trabajos realizados en cultivo de embriones emplean temperaturas de 25°C. Temperatura que ha mostrado buenos resultados en la mayoría de casos. En paralelo, algunos autores sugieren temperaturas acordes con la región de donde es original la especie en cuestión. Así, para embriones provenientes de cultivos de zonas cálidas se sugiere un rango entre 27-30°C, mientras que para los de clima templado, el rango ideal estaría comprendido entre 17 y 22°C (Hu y Wang, 1986).

## **2. OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

Esta tesis doctoral tiene como principales objetivos:

- i) Aumentar la eficiencia de la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de *Capsicum*, en función del genotipo y el estadio de desarrollo embrionario, así como del medio y condiciones de cultivo, con especial énfasis en los niveles de sacarosa, sales minerales, reguladores del crecimiento y condiciones de luz y oscuridad.
- ii) Evaluar de forma sistemática las barreras interespecíficas que existen entre las especies *Capsicum* del complejo *annuum-chinense-frutescens* y de éstas con *C. baccatum*. Este estudio sistemático permitirá establecer definitivamente los distintos niveles de incompatibilidad presentes en cada combinación interespecífica.
- iii) Valorar la utilidad de estrategias como el rescate *in vitro* de embriones y el cruzamiento con especies puente para la consecución de cruzamientos entre *C. annuum* y *C. baccatum*.
- iv) Valorar la utilidad del cultivo *in vitro* de embriones para acortar el ciclo generacional del pimiento, permitiendo acelerar los programas de mejora de este cultivo.

La consecución de estos objetivos aportará información útil para aquellos mejoradores de pimiento, chiles y ajíes que planifiquen cruzamientos interespecíficos que permita aprovechar la variabilidad genética de las especies relacionadas y reducir el ciclo generacional en sus programas de mejora genética.





### **3. TRABAJOS CIENTÍFICOS**



**Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum***  
Scientia Horticulturae. Aceptado.



**Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum***

J.P. Manzur, C. Penella, A. Rodríguez-Burruezo\*

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV),  
Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

\*Corresponding author

e-mail: adrodbur@upvnet.upv.es

Phone# +34 963879383

Fax# +34 963879422

Complete postal address:

Dr. Adrián Rodríguez-Burruezo

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Edificio 8E,  
acceso J. Ciudad Politécnica de la Innovación, Universitat Politècnica de València.

Camino de Vera s/n

46022, Valencia, Spain.

**Abstract**

A new reliable *in vitro* technique for immature embryos of *Capsicum* spp. was developed. A collection of 10 accessions, encompassing the five cultivated species of *Capsicum*, and four media formulations, combining different levels of sucrose (40 g/L vs. 80 g/L) and MS salts ( $1/2\times$ MS vs.  $1\times$ MS), were evaluated. In addition, the four main embryo stages (i.e. globular, heart, torpedo, early cotyledonary) were also considered. Thus, almost 2000 embryos were excised, cultured, and evaluated for germination in the present experiment. Genotype (G), media composition (M), and developmental stage (S) contributed significantly to culture efficiency. G $\times$ S and S $\times$ M interactions were also significant, although their contribution was lower than individual main factors. *C. annuum* accession Piquillo, *C. frutescens* B-144 and, particularly, *C. pubescens* B-61 showed the highest *in vitro* germination rates, while *C. chinense* and *C. baccatum* accessions showed, in general, the lowest responses. In most cases, the more advanced the embryo stage the higher the culture efficiency. However, for the first time in *Capsicum*, globular embryos from most genotypes were germinated *in vitro* and also relatively high rates were achieved for heart embryos. Finally, the medium with the lowest levels of both sucrose (40 g/L) and  $1/2\times$ MS enabled, in most genotypes and stages of development, the highest *in vitro* germination rates. In fact, this medium allowed rates of up to 25% in globular embryos. These results provide useful information to those breeders interested on the applications of embryo culture in *Capsicum* peppers (e.g. shortening breeding cycles, perhaps rescue of interspecific embryos).

**Keywords:** *Capsicum* peppers, *in vitro* culture, embryo stage, genotypic diversity, sucrose, mineral salts.

## 1. Introduction

*Capsicum* peppers are one of the most diverse vegetables in the world. Names like chili pepper, paprika, pimiento, ají, cayenne, among other terms, encompass a complex of five cultivated species which originated in America (Esbaugh et al., 1983; DeWitt and Bosland, 1996). From all of them, *C. annuum* L., which is grown worldwide, is the most popular, genetically diverse, and economically important species. *C. chinense* Jacq. (e.g. Habanero or Scotch Bonnet types) and *C. frutescens* L. (e.g. Tabasco type) are also important in America, Africa, and Asia and are phylogenetically close to *C. annuum*. Thus, the three species can be intercrossed and make up the *annuum-chinense-frutescens* complex (or *annuum* complex), characterized by white flowers and yellow seeds (DeWitt and Bosland, 1996). Finally, *C. baccatum* L. var. *pendulum* (white flowers in yellow/green spots) and *C. pubescens* R. & P. (purple flowers and black rough seeds) which represent separate taxons, have been profusely grown and utilized for millennia in the Andean region (APEGA, 2009; DeWitt and Bosland, 2009; Rodríguez-Burruezo et al., 2009).

Such diversity has enabled the identification of many traits of interest among the *Capsicum* species (e.g. resistances to pest and diseases). However, the use of interspecific crosses for transferring these traits between species for breeding purposes is usually hampered by incompatibility problems such as embryo abortion. Moreover, another challenge for *Capsicum* breeders is the long breeding cycle of these materials (i.e. from sowing seeds to harvesting fully ripe fruits containing the seeds of the next generation), which can be considerably longer than other common fruit vegetables (e.g. tomato, eggplant, cucumber, melon). Thus, isolation and *in vitro* culture of zygotic embryos may be very helpful in both situations.

This technique was first reported in two *Cruciferae*: *Cochleira* and *Raphanus* (Hannig, 1904) and since then it has been found very useful not only for shortening breeding cycles or enabling interspecific/intergeneric hybridizations, but also for overcoming seed dormancy or sterility, obtaining valuable haploid materials, or micropropagation, among other strategies (e.g. Tukey, 1933; Randolph, 1945; Kott and Kasha, 1985; Chen and Adachi, 1996; Acebedo et al., 1997; Lotfi et al., 2003; Leng and Yamamura, 2006; Tamaki et al., 2011; Tang et al., 2011).

As a whole, the knowledge of the response of *Capsicum* zygotic embryos to *in vitro* culture is still relatively scarce, with the exception of very few reports. Thus, it has been applied to overcome post-fertilization genetic barriers in a few unique *C. annuum*×*C. frutescens* and *C. annuum*×*C. baccatum* crosses (Hossain et al., 2003; Yoon et al., 2006). Despite the interest of these pioneer studies, the use of a higher genotypic diversity is missed and, also, only embryos beyond torpedo stage were reported to provide satisfactory results since it was extremely difficult or even not possible to obtain plantlets from heart or globular embryos (Yoon et al., 2006). Such findings confirmed that, besides of genotype, the developmental stage of embryos is considered another key factor for their response to *in vitro* culture (Kapila and Sethi, 1993; Monnier, 1995). In this sense, the stage at which embryo abortion may occur in interspecific hybridizations is highly dependent on the genotypes involved in the crossing and, in contrast to the results from Yoon et al. (2006), there are also many examples in which embryos had to be rescued at the earliest stages (e.g. Barbano and Topoleski, 1984; Chen and Adachi, 1996). Therefore, further studies are required to improve the response to *in vitro* culture in globular and heart embryos.

Moreover, it is commonly accepted that the composition of the medium also has a dramatic effect on the regeneration of plant tissues (Bhojwani and Razdan, 1996; Haslam and Yeung, 2011). Providing immature embryos with the appropriate level of carbohydrates, usually sucrose, and minerals, like MS mineral solution to promote growth is considered another key factor (Murashige and Skoog, 1962; Monnier, 1995; Sharma, 1996). By contrast, exogenously supplied hormones may modify the ontogenic pattern of embryos or, even, provoke *callus* formation, while, in some cases, low concentrations have facilitated embryo culture (Monnier, 1995). In addition, *Capsicum* peppers are considered highly recalcitrant for *in vitro* culture (Kothari et al., 2010). Therefore, although two media were reported from the experiments of Hossain et al. (2003) and Yoon et al. (2006), there is a lack of detailed studies about the response of immature *Capsicum* embryos to different media and their interaction with different genotypes and developmental stages.

In the present work we have systematically evaluated the effect of: i) genotype, ii) *in vitro* media composition, iii) developmental stage, and iv) interaction between these factors in the response to *in vitro* culture of immature embryos from the five cultivated species of *Capsicum*. To our knowledge, this is the first comprehensive study about



these subjects in *Capsicum* peppers and the derived results will provide new advances and helpful information to those *Capsicum* breeders interested on shortening seed-to-seed cycle or, perhaps, embryo rescue of interspecific hybrids, among other breeding strategies.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material

A total of 10 accessions from the five cultivated species of *Capsicum* were utilized in the present study: *C. annuum* (4), *C. chinense* (2), *C. frutescens* (1), *C. baccatum* (2), and *C. pubescens* (1). This collection, from the germplasm bank of the COMAV-UPV, encompasses a range of geographical origins and fruit morphological traits (Table 1). Plants were transplanted at the four-leaf stage to a glasshouse of the Universitat Politècnica de València (UPV) in February 2010 and grown under the spring-summer season. Natural illumination was used for this experiment and temperature range was 18°C (night) to 25°C (day). Plants were pruned to four stems and trained with vertical strings. They were drip irrigated every 8 h for 3 min (4 L/h). Fertilizer was applied with the irrigation water at a rate of 1 g/L of a commercial 15N-2.2P-24.9K water soluble fertilizer (BASF, Barcelona, Spain). To monitor the development of fruits, flowers of each accession were selfpollinated twice a week and labeled with the corresponding date. To achieve the required number of immature seeds for the experiment, plants were selfed repeatedly to obtain 5 to 20 fruits per plant, depending on the accession (the smaller the fruit the higher the number of fruits required).

Table 1. Origin and fruit traits of the accessions utilized in the present experiment.

Accession (abbreviation)	Origin	Color	Weight (g)	Length (cm)	Width (cm)
<i>C. annuum</i>					
Pimiento de Bola (Bola)	PDO Pimentón Murcia. Murcia, Spain	Red	10-14	3-5	4-6
Pimiento del Piquillo (Piquillo)	PDO Piquillo de Lodosa. Navarra, Spain	Red	20-33	7-9	4-6
California Wonder 14-6 (CW14-6)	Breeding line, UPV-COMAV genebank	Pale red	90-150	8-11	6-10
Guindilla de Ibarra (Guindilla)	NEIKER. Basque Country, Spain	Deep red	7-12	7-12	1-2
<i>C. chinense</i>					
Ají Panca	Ecuador	Brown	10-14	7-10	2-3
PI-152225	USDA	Deep red	4-6	4-5	1-2
<i>C. frutescens</i>					
Bol 144 (B-144)	Bolivia	Pale red	>1	1-2	>0.5
<i>C. baccatum</i>					
Ají Rojo	Bolivia	Red	5-8	5-8	2-3
Ají Amarillo	Bolivia	Yellow	3-4	4-6	1-2
<i>C. pubescens</i>					
Rocoto Bol-61 (B-61)	Bolivia	Red	15-23	4-6	3-5

## 2.2. Evaluated media

In a preliminary study, we compared the efficiency of the media reported by Hossain et al. (2003) and Yoon et al. (2006). The latter, with a less complex composition, gave better results (data not shown) and, therefore, it was selected as control for our study. This medium (M1 from now on) included agar at 7 g/L, indole-3-acetic acid (AIA, 0.01 mg/L), gibberellic acid (GA<sub>3</sub>, 0.01 mg/L), sucrose (80 g/L), and 1×MS including vitamins (1×MS = 4.4 g/L of commercial formulation), at pH 5.7. For the present experiment, we studied the effect of sucrose and MS levels on the culture efficiency of *Capsicum* embryos decreasing by half the levels of sucrose (40 g/L) and/or <sup>1</sup>/<sub>2</sub>×MS of the original M1 formulation. Thus, the three additional combinations were: M2 (sucrose: 40 g/L; 1×MS), M3 (sucrose: 80 g/L; <sup>1</sup>/<sub>2</sub>×MS), and M4 (sucrose: 40 g/L; <sup>1</sup>/<sub>2</sub>×MS). All components were purchased from commercial sources: agar from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), sucrose from Panreac (Castellar del Vallès, Spain), and hormones and MS from Duchefa Chemie (Harlem, The Netherlands). The media were sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. To avoid denaturation, hormones were sterilized separately by microfiltration through 0.20 µm Minisart® syringe filters (Sartorius AG, Goettingen, Germany) and, then, added to the warm (35-40 °C) autoclaved media before solidifying.

## 2.3. Isolation and in vitro culture of embryos

In order to ensure the availability of embryos at the four immature stages (globular, heart, torpedo, and early cotyledonary) (Fig. 1), developing fruits from each accession were harvested daily, covering a 25-day period (from 10 to 35 days after pollination, DAP). The surface of the fruit was washed with liquid detergent (liquinox® at 5%) and rinsed with tap water. Once in the lab and under laminar flow cabinet conditions (model AH-100, Telstar, Terrassa, Spain), the whole fruit was surface-sterilized with ethanol (96%). Then, immature seeds were removed and sterilized using a 1% dilution of commercial bleach (4% sodium hypochlorite) during 10 min and rinsed three times with

sterile deionized water. After that, seeds were dissected under stereomicroscope ( $\times 24$ ) using hypodermic sterilized needles. Embryos were excised carefully, avoiding any damage, and immediately cultured in  $90 \times 15$  mm Petri dishes containing the corresponding medium. Petri dishes were sealed with parafilm® and incubated in a growth chamber under constant temperature and humidity ( $25 \pm 1$  °C; 70% HR) and a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark) as reported by Yoon et al. (2006). To assess the correspondence between embryo development and DAP with the highest degree of accuracy, the stage of each excised embryo was recorded.

The efficiency of *in vitro* culture was evaluated on the basis of the *in vitro* germination rate: i) after 30-40 days of *in vitro* culture for the most advanced stages (i.e. torpedo and cotyledonary) or ii) after 40-50 days for the earliest stages (i.e. globular and heart). Only embryos which showed an early development of root and shoot were considered fully germinated (Fig. 1). At this stage, a sample of seedlings were removed from *in vitro* culture, transferred to pots containing cultivation substrate, and covered with perforated plastic glasses. When possible, four seedlings per genotype  $\times$  medium  $\times$  stage combination were sampled. After one week, plastic glasses were removed and plants were allowed to grow to maturity (anthesis of the first flowers). In this way, we followed the life cycle of these materials in order to check whether *in vitro* germination could provoke abnormal development due to precocious germination (e.g. weak seedlings and plantlets) (Bhojwani and Razdan, 1996). As controls, mature seeds from each evaluated genotype were sown conventionally and their subsequent development was also monitored.

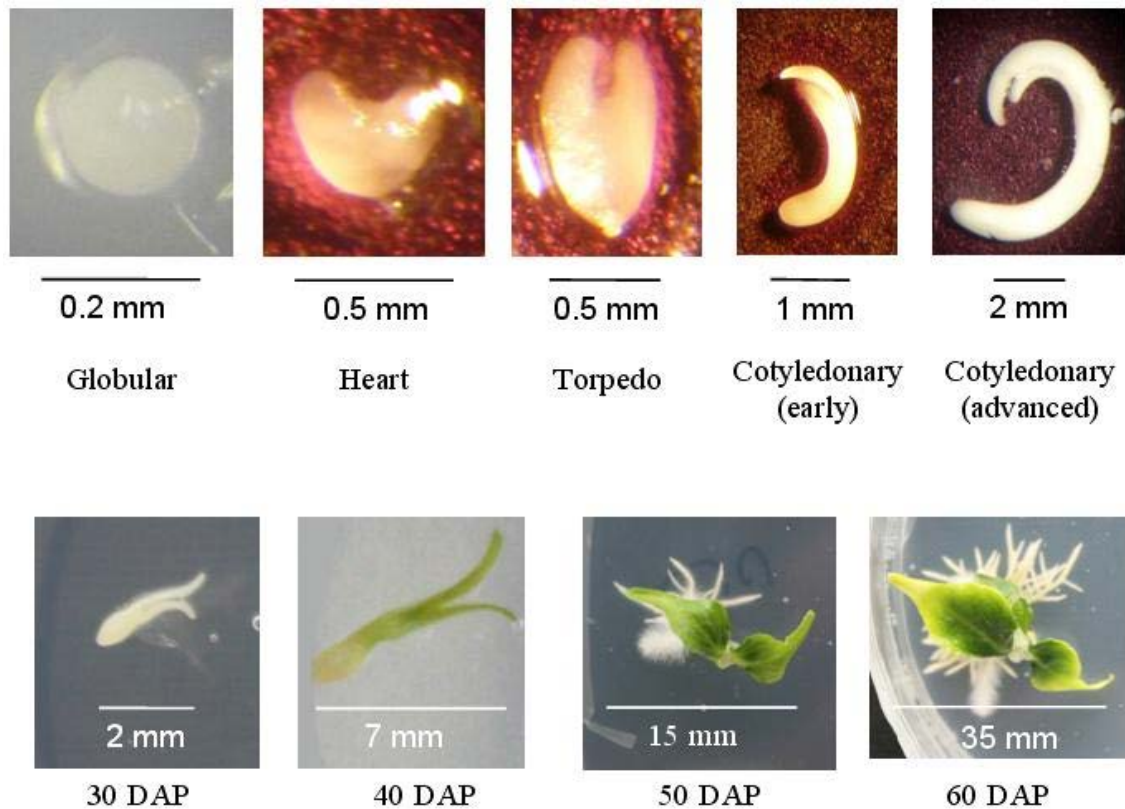


Fig. 1. Upper (left to right): example of *in situ* development of *Capsicum* embryos (*C. annuum* cv. California Wonder 14-6). Only the four first stages (from globular to early cotyledonary) were utilized in the present experiment. Lower (left to right): example of *in vitro* germination and subsequent development (DAP: days after pollination) of a cotyledonary embryo (*C. annuum* cv. California Wonder 14-6).

#### 2.4. Experimental design and statistical analysis

The experimental design was set up as a complete factorial design ( $10 \times 4 \times 4$ ) with four replicates, including 10 genotypes, four embryo developmental stages, and four *in vitro* media. Each replicate consisted of one petri dish with three embryos of the same genotype and at the same stage. Therefore, 12 embryos were cultured for each genotype  $\times$  stage  $\times$  media combination and the present experiment required the excision, *in vitro* culture, and evaluation of germination of a total of 1920 embryos and the dissection of more than 3000 immature seeds.

Data corresponding to the rates (percentage) of *in vitro* culture efficiency were subjected to a fixed effects model analysis of variance (ANOVA) in order to estimate the contribution of the genotype, embryo stage, media composition, and their interactions to the observed variation. Means were separated by Fisher's Least

Significant Differences Test (LSD) at  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 5.1 software (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA). Since original data were recorded as a percentage, they were transformed by arcsine square root. Transformed data were then tested, but differences between the results obtained with transformed and nontransformed data were negligible. Therefore, the ANOVA presented in this work was performed on the original nontransformed data.

### 3. Results and discussion

During embryo excision it was possible to find embryos at two, rarely three, subsequent developmental stages within the same fruit (i.e. globular/heart, heart/torpedo, or torpedo/cotyledonary) as can be observed on Table 2. In this respect, the most advanced embryos were found in those immature seeds attached to the distal region of the placenta, while the earliest stage corresponded to seeds in the proximal region. Such intrafruit developmental gradient, also reported in other solanaceous crops like tomato (Berry and Bewley, 1992), might be due to a higher seed density observed in the proximal region, resulting on a higher competition for nutrients (and lower availability) per seed (Lee, 1988; Gómez and Zamora, 2003) or, alternatively, to an earlier fecundation of those ovules attached to the distal region. These results, although based on selfings, suggest that breeders should focus their efforts on the proximal region of the placenta to rescue potentially abortive interspecific embryos, as abortion is expected to take place later in these tissues.

Furthermore, genotypes differed in the temporary pattern of embryo development. We found differences of up to 10 days among accessions to reach the same embryo stage (e.g. torpedo embryos at 16 DAP in *C. frutescens* B-144 against 27 DAP in *C. annuum* accessions Bola and California Wonder) (Table 2). In this sense, DAP have been used by other authors as an estimate of the embryo development instead of recording the developmental stages (e.g. Hossain et al., 2003). However, our results suggest that this is not an accurate predictor of the real embryo developmental pattern in *Capsicum* as, depending on the genotype, different stages might be included under similar DAP, which might bias the results of such studies. Therefore, in our opinion, the

effect of development on the response to *in vitro* culture of immature embryos should be based on their stage rather than DAP.

The efficiency of *in vitro* culture increased gradually with the stage of development. Thus, mean germination rates ranged from 5% in globular embryos to 70% in cotyledonary (Fig. 2). In this sense, at the early phases of development, embryos are highly dependent in terms of nutrition and draw upon the endosperm, the suspensor and the surrounding maternal tissues (heterotrophic phase), while, later, they are metabolically capable of synthesizing substances required for its growth (autotrophic phase) (Raghavan, 1966; Ramming, 1990; Bhojwani and Razdan, 1996).

Finally, we found that all plants derived from *in vitro* germination, independently of their embryo stage or the genotype, did not retain embryonic characteristics and were fertile and identical to control plants from conventional sowing. These findings indicate that precocious germination has no deleterious effects on the subsequent development of plants in *Capsicum* genus, even in the case of the earliest embryos, and, therefore, these materials can be integrated safely in breeding programs. Nevertheless, further studies are required to confirm this response in interspecific embryos.

Table 2. Relationship between days after pollination (DAP) and embryo stage based on the records (number of embryos) of four sampled fruits from accessions Bola, Piquillo, CW14-6, Guindilla, Ají Panca, B-144, and Ají Amarillo. These fruits cover the DAP interval necessary on each genotype to achieve all embryo stages.

Accession	DAP	Embryo developmental stage			
		Globular	Heart	Torpedo	Cotyledonary
<i>C. annuum</i>					
Bola	18	20	-	-	-
	22	-	20	-	-
	27	-	-	12	8
	30	-	-	-	20
Piquillo	15	9	11	-	-
	18	-	6	14	-
	21	-	-	8	12
	25	-	-	4	16
CW14-6	18	20	-	-	-
	21	12	8	-	-
	27	-	-	13	7
	33	-	-	-	20
Guindilla	20	4	16	-	-
	22	-	6	14	-
	25	-	-	4	16
	26	-	-	3	17
<i>C. chinense</i>					
Ají Panca	16	20	-	-	-
	20	9	11	-	-
	24	-	3	17	-
	26	-	-	-	20
<i>C. frutescens</i>					
B-144	11	10	-	-	-
	13	6	4	-	-
	16	-	2	8	-
	19	-	-	-	10
<i>C. baccatum</i>					
Ají amarillo	18	12	8	-	-
	20	5	15	-	-
	23	-	8	12	-
	26	-	-	-	20



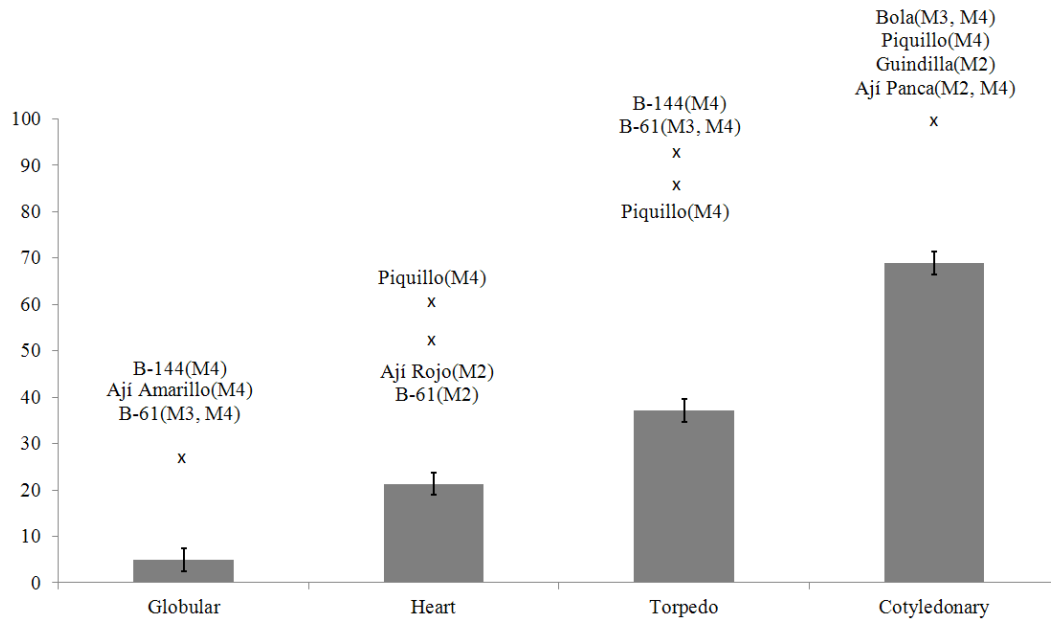


Fig. 2. *In vitro* culture efficiency (% mean germination rates of the four *in vitro* media and the 10 genotypes) for each developmental stage of immature *Capsicum* embryos. Lines on bars indicate the Fisher's least significant difference (LSD) at  $P < 0.05$ . x= indicates the genotypes and media with the highest *in vitro* germination rates.

### 3.1. ANOVA analysis

The analysis of variance revealed that all the main factors (genotype, *in vitro* medium, developmental stage) contributed significantly ( $P > 0.001$ ) to the differences observed in the germination rates of immature *Capsicum* embryos (Table 3). Nevertheless, on the basis of the corresponding mean squares, the highest contribution to the detected variation corresponded to the stage of development (S), followed by the composition of the medium (M) and, to a lesser extent, the genotype (G). Therefore, although genotype is considered one of the most important factors for *in vitro* regeneration of plant tissues, especially in *Capsicum* (Kothari et al., 2010), our findings suggest that this factor could be less important than others in the particular response of *Capsicum* zygotic embryos.

Regarding the effect of interactions between the above mentioned factors, only G×S and S×M contributed significantly to the efficiency of *in vitro* culture, although their magnitude was lower than those of the main factors (Table 3). These results indicate that embryos at the same stage may show significant differences on germination rates depending on the genotype and/or the medium. Consequently, descriptive results have been displayed next considering these significant interactions.

Table 3. ANOVA table with mean squares for the effects of genotype (G), developmental stage (S), *in vitro* medium (M), their interactions, and error on the *in vitro* germination efficiency of immature *Capsicum* embryos.

Effects	df <sup>a</sup>	Mean squares <sup>b</sup>
Genotype (G)	9	4686 ***
Dev. Stage (S)	3	121265 ***
Medium (M)	3	20831 ***
Interactions		
G×S	27	1188 *
G×M	27	664 ns
S×M	9	2986 ***
G×S×M	81	910 ns
Error	480	723

<sup>a</sup> Degrees of freedom for the corresponding effect.

<sup>b</sup> ns, \*, \*\* and \*\*\* indicate nonsignificant or significant at  $P < 0.05$ , 0.01 and 0.001.

### 3.2. Effect of the genotype and the stage of development (G, S and G×S)

From the 10 assayed genotypes, *C. annuum* accessions CW14-6 and Guindilla, and all the accessions from *C. chinense* and *C. baccatum* showed the lowest *in vitro* germination mean rates (comprising all developmental stages and media formulations), ranging from 25% to 30%, while *C. pubescens* B-61 and *C. annuum* Piquillo showed the best response, with rates  $\geq 45\%$  (Table 4). In addition, this genus is known by their recalcitrant nature to *in vitro* culture compared to other *Solanaceae* like potato, tobacco, or tomato (Ochoa-Alejo and Ramirez-Malagón, 2001; Kothari et al., 2010). However, in

this work we could obtain plantlets from immature embryos at any developmental stage and from most accessions of the cultivated *Capsicum* species. This is of special interest because, to our knowledge, globular embryos have not been *in vitro* germinated previously in this genus.

Although, as mentioned previously, culture efficiency increased gradually with the stage of development, such increases differed among genotypes, showing the G×S interaction detected in the ANOVA. In this regard, the *in vitro* germination rates of *C. annuum* Piquillo and *C. pubescens* B-61 showed dramatic increases in the transition from globular to heart stages (reaching 40%), while other genotypes like CW14-6, Guindilla and the two *C. chinense* accessions only reached similar germination rates (30-40%) at the torpedo stage (Table 4). Moreover, the two *C. baccatum* accessions still showed low rates ( $\leq 20\%$ ) at this relatively advanced stage and considerable increases were only found in these accessions in the transition from torpedo to cotyledonary (Table 4). These findings also suggest that *Capsicum* genotypes might differ in the stage at which their embryos reach the autotrophic phase since some of them can survive and develop very early and at high rates when they are grown under relatively simple (*in vitro*) conditions, while others would require the special conditions and nutrients provided by the developing seed and the endosperm until more advanced stages (Bhojwani and Razdan, 1996).

In addition, *C. annuum* Piquillo, *C. frutescens* B-144 and, particularly, *C. pubescens* B-61 showed not only a good average response, but also the highest *in vitro* germination rates in most stages (Table 4). On the contrary, the response of embryos from *C. chinense* and *C. baccatum*, were among the lowest in most stages and, in fact, the former was the only species in which we were unable to germinate globular embryos. Finally, the remarkable response found in *C. pubescens* is also interesting. In this regard, Christopher and Rajam (1996) reported a regeneration ability in somatic tissues from the wild species *C. praetermissum* higher than cultivated species of *Capsicum* and, also, similar results have been reported in wild relatives of the tomato (e.g. *S. peruvianum*, *S. chilense*) (Koornneef et al., 1993; Satoh et al., 2000). Thus, it seems that domestication may have decreased the *in vitro* culture ability of cultivated species and, therefore, this might explain the performance of *C. pubescens*, which has

been submitted to the least intense domestication process and breeding efforts among the cultivated Capsicums (DeWitt and Bosland, 1996; Rodríguez-Burruezo et al., 2009).

Table 4. *In vitro* culture efficiency (% mean germination rates of the four studied media) of immature *Capsicum* embryos for the genotypes and developmental stages studied in this experiment.

Accession	Embryo developmental stage				Genotype
	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledonary	Mean
<i>C. annuum</i>					
Bola	4.2 a <sup>a</sup>	27.1 bc	31.2 ab	77.1 bc	34.9 ab
Piquillo	4.2 a	39.6 c	52.1 bc	87.5 c	45.9 bc
CW14-6	4.2 a	16.7 ab	41.7 abc	52.1 a	28.7 a
Guindilla	2.1 a	12.5 ab	33.3 ab	75.0 abc	30.7 a
<i>C. chinense</i>					
Ají Panca	0 a	4.1 a	35.4 ab	77.1 bc	29.2 a
PI-152225	0 a	14.6 ab	33.3 ab	54.1 ab	25.5 a
<i>C. frutescens</i>					
B-144	6.2 a	20.8 abc	52.1 bc	70.8 abc	37.5 abc
<i>C. baccatum</i>					
Ají Rojo	2.1 a	22.9 abc	18.7 a	56.2 ab	25.0 a
Ají Amarillo	8.3 a	20.8 abc	20.8 a	68.7 abc	29.7 a
<i>C. pubescens</i>					
B-61	18.7 b	39.5 c	66.6 c	77.1 bc	50.5 c

<sup>a</sup> Different letters within the same column indicates significant differences between genotypes at  $P < 0.05$  (Fisher's least significant difference, LSD).

### 3.3. Effect of the *in vitro* medium composition and the stage of development (M, S and S×M)

As detected in the ANOVA, the composition of the medium was a key factor for germination of immature embryos. From all the studied media formulations, M2 and, particularly, M4 gave the highest mean rates (38% and 48%, respectively), while embryos grown under M1 and M3 showed the lowest means (Fig. 3). This trend was also found within each developmental stage. However, as a consequence of the S×M interaction (Table 3), the magnitude of these favourable responses to M2 and M4, in comparison to M1 and M3, differed among stages. Thus, for example, differences were significant and very high at the torpedo stage, particularly comparing M2 (43%) and M4 (64%) to M1 (12%). By contrast, these differences were considerably lower at the heart stage (Fig. 3), although the rates recorded for these embryos in the present experiment, 26% in M2 and 32% in M4, can be considered very successful compared to previous reports (Yoon et al., 2006). Moreover, M2 and M4 also gave the highest germination rates in globular embryos in comparison to M1 and M3, although the observed differences were lower than those found in more advanced stages (Fig. 3).

All these results, together with the lack of significant G×M interaction (Table 3), suggest that sucrose at moderate levels (40 g/L, M2 and M4) increases the germination of immature *Capsicum* embryos at any stage in comparison to higher levels (80 g/L, M1 and M3). In this sense, many authors have reported in a range of species that both mature and immature advanced embryos grow fairly well with low sugar contents (20-30 g/L), while, on the contrary, younger embryos usually require high sucrose levels (80-120 g/L) as a source of energy, because of their heterotrophic condition, and/or to maintain a suitable osmotic balance and decrease precocious germination (Fischer and Neuhaus, 1995; Monnier, 1995; Bhojwani and Razdan, 1996). This is in agreement with the behavior of our torpedo and cotyledonary *Capsicum* embryos. However, the response observed in globular and heart embryos suggests that requirements in sucrose of the earliest immature *Capsicum* embryos are considerably lower than other species and, even, that levels  $\geq 80$  g/L might have negative effects.

In addition, the comparison between media with the same sucrose level revealed that  $\frac{1}{2}\times\text{MS}$  might also increase embryo culture efficiency in *Capsicum*, although its effect was lower than sucrose (Fig. 3). This fact was more noticeable comparing M2 and M4 since the latter offered higher mean germination rates at any embryo stage, although differences were only significant on average and at the torpedo stage (Fig. 3). M3 also enabled a response slightly higher than M1 on average and at globular and torpedo stages, although differences were only significant at the torpedo stage (Fig. 3). In this regard, Monnier (1976 and 1995) reported that the mineral solutions which promote growth in embryos may be also toxic and, consequently, decrease their survival rate. In fact, this author improved the survival frequency of *Capsella bursa-pastoris* embryos by decreasing some components of the original MS formulation, reporting a remarkable effect of iron (added as Fe-EDTA) and nitrate (Monnier, 1976). Therefore, it seems that the levels at which Fe-EDTA and/or other mineral salts are included in the MS formulation could be slightly toxic to immature *Capsicum* embryos, decreasing their efficiency rates.

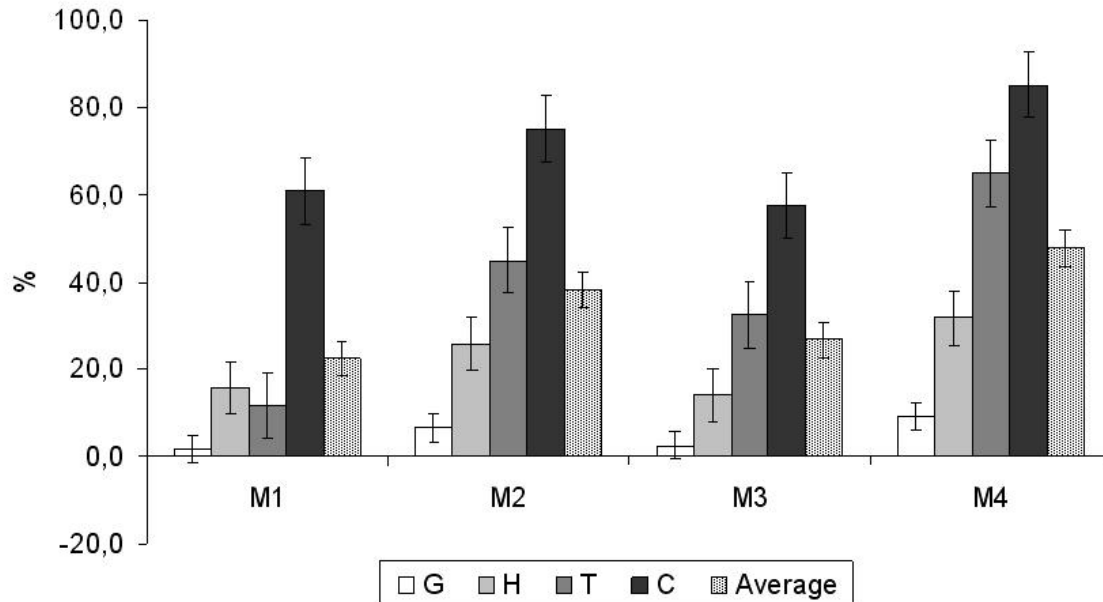


Fig. 3. *In vitro* culture efficiency (% mean germination rates of the 10 genotypes) of immature *Capsicum* embryos for each media formulation and developmental stage (G: globular; H: heart; T: torpedo; C: cotyledonary). Lines on bars indicate the Fisher's least significant difference (LSD) at  $P < 0.05$ .

### 3.4. Embryo culture efficiency under M4 medium

As a whole, the above reported results indicate that the combination of 40 g/L sucrose and  $\frac{1}{2}\times$ MS provides the best response for the *in vitro* germination of immature *Capsicum* embryos. To reinforce this fact, further details of the specific response of heart, torpedo, and cotyledonary embryos of each genotype under M4 culture are given in table 5. Thus, considering these embryo stages, all the studied genotypes showed considerably higher or, less frequently, similar *in vitro* germination rates under M4 formulation than the average of the four studied media (showed on table 3) (Table 5). In fact, this medium enabled in most genotypes very successful rates in heart embryos ( $\geq 25\%$ ), as well as rates  $\geq 50\%$  and  $\geq 75\%$  in torpedo and cotyledonary embryos, respectively, which confirms the good performance provided by this formulation. Moreover, M4 cultivation improved considerably the rates of many genotypes in comparison to the average of the four media, although the highest improvement was found in torpedo embryos (e.g. increases of 20% in heart embryos from Piquillo, Guindilla and PI-152225 or 40% in torpedo embryos from Ají Panca and B-144) (Tables 4 and 5).

In the case of globular embryos, M4 also offered remarkable results, allowing a mean germination rate (9.2%) higher than the other media (Fig. 3) and, also, relatively high *in vitro* germination rates in several accessions (15-25%) (Fig. 4). Nevertheless, there were still several accessions whose globular embryos did not germinate under M4. In this respect, globular embryos from *C. annuum* accessions Bola, Piquillo, Guindilla and *C. baccatum* Ají Rojo could be *in vitro* germinated only under M2 at 8-17% rates (Fig. 4), which suggest that higher MS levels (1xMS) might be necessary in the case of globular embryos of these accessions. In comparison, M1 and M3 only enabled the *in vitro* germination of globular embryos in *C. pubescens* B-61, although it could be mainly attributed to the remarkable *in vitro* culture aptitude of this species.

All these findings revealed that we found a new and highly efficient medium for the *in vitro* culture of *Capsicum* embryos, suitable for a range of species and genotypes. Consequently, M4 will be particularly useful for those breeders interested in shortening breeding cycles. In addition, the remarkable germination rates found for this medium in

most immature stages provides a useful starting point for the *in vitro* rescue of interspecific embryos, although further studies based on real interspecific embryos are necessary to optimize M4 or, alternatively, M2 for the rescue of globular embryos since the stage at which abortion occurs may depend on the specific parent combination.

Table 5. Detailed results for *in vitro* culture efficiency (% germination rates) of immature *Capsicum* embryos at heart, torpedo and cotyledonary stages under the most efficient medium (M4).

Accession	Embryo developmental stage		
	Heart	Torpedo	Cotyledonary
<i>C. annuum</i>			
Bola	25.0 ab	50.0 ab	100.0 b
Piquillo	58.3 b	83.3 bc	100.0 b
CW14-6	16.7 ab	58.3 ab	50.0 a
Guindilla	33.3 ab	58.3 ab	91.7 b
<i>C. chinense</i>			
Ají Panca	8.3 a	75.0 bc	100.0 b
PI-152225	33.3 ab	58.3 ab	75.0 ab
<i>C. frutescens</i>			
B-144	33.3 ab	91.7 c	83.3 ab
<i>C. baccatum</i>			
Ají Rojo	33.3 ab	33.3 a	91.7 b
Ají Amarillo	33.3 ab	50.0 ab	66.7 ab
<i>C. pubescens</i>			
B-61	41.6 ab	91.7 c	91.7 b

<sup>a</sup> Different letters within the same column indicates significant differences between genotypes at  $P < 0.05$  (Fisher's least significant difference, LSD).



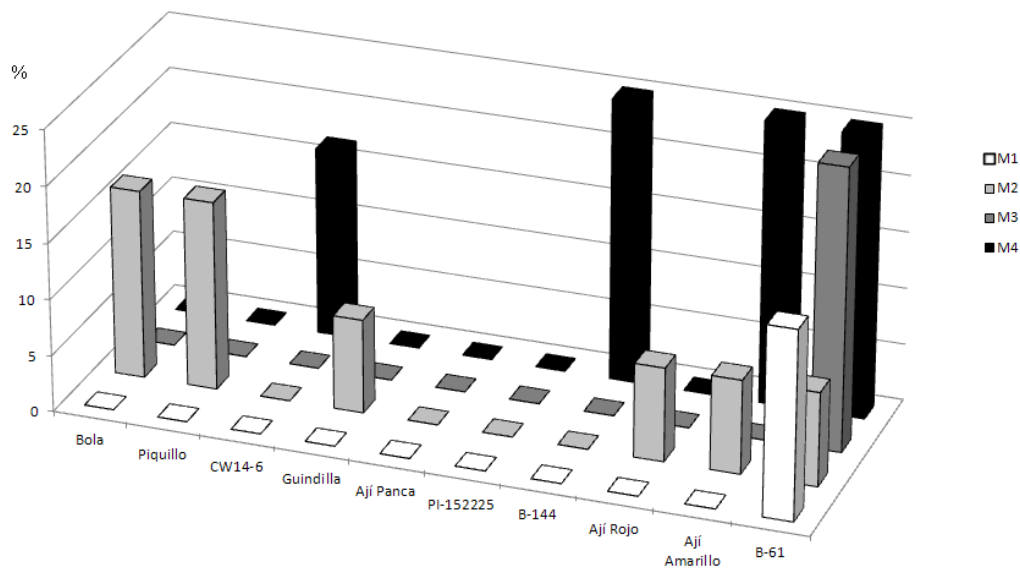


Fig. 4. *In vitro* culture efficiency of globular *Capsicum* embryos under each media formulation in the accessions evaluated in this experiment.

#### 4. Conclusions

Our study revealed that the embryo stage, followed by the media formulation and the genotype are key factors in the efficiency of *in vitro* culture of immature embryos in genus *Capsicum*. Thus, in most genotype×*in vitro* media combinations, torpedo and cotyledonary embryos showed the highest germination rates, while the lowest rates corresponded to globular and heart embryos. Furthermore, different responses, even within the same species (*C. annuum*), were found among the evaluated materials, with *C. pubescens* and *C. chinense* offering the highest and the lowest rates, respectively. Genotype×embryo stage and embryo stage×*in vitro* media interactions also contributed to the observed variation but at a lesser extent. Finally, apart from very few exceptions, a relatively simple formulation containing moderate levels of MS salts ( $\frac{1}{2}\times\text{MS}$ ) and, particularly, sucrose (40 g/L) allows the germination of immature embryos at any stage in a wide range of *Capsicum* genotypes. Moreover, by means of this latter medium or, alternatively, increasing to  $1\times\text{MS}$ , we could *in vitro* germinate the earliest (globular) embryos for the first time in genus *Capsicum*. Therefore, the findings reported in the present experiment will be useful for those breeders and geneticists interested on the applications of *in vitro* culture of immature embryos in *Capsicum*.

## Acknowledgements

Authors are grateful to Francisco Javier Herraiz for his useful advice on *in vitro* culture techniques and to Assoc. Prof. Ana M. Fita for reviewing the manuscript. Juan P. Manzur also thanks Universitat Politècnica de València for a research grant (2011-S2-4264, programa para la formación de personal investigador, FPI).

## References

- Acebedo, M.M., Lavee, S., Liñán, J., Troncoso, A., 1997. *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Sci. Hortic.* 69, 207-215.
- APEGA, 2009. Ajíes peruanos. Sazón para el mundo. Sociedad Peruana de Gastronomía, Lima, Perú.
- Barbano, P., Topoleski, L.D., 1984. Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum*×*Lycopersicon peruvianum* ovules. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109, 95-100.
- Berry, T., Bewley, J.D., 1992. A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiol.* 100, 951-957.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier, Amsterdam.
- Chen, L. Z., Adachi, T., 1996. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo rescue and *in vitro* propagation. *Plant Breed.* 115, 251-256.
- Christopher, T., Rajam, M.V., 1996. Effect of genotype, explants and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46, 245-250.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 1996. *Peppers of the World: An identification Guide*, Ten Speed Press, Berkeley.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 2009. *The complete chile pepper book*. Timber Press, Portland.
- Esbaugh, W.H., Guttman, S.I., McLeod, M., 1983. The origin and evolution of domesticated *Capsicum* species. *J. Ethnobiol.* 3, 49-54.

- Fischer, C., Neuhaus, G., 1995. *In vitro* development of globular zygotic wheat embryos. *Plant Cell Rep.* 15, 186-191.
- Gómez, J.M., Zamora, R., 2003. Factors affecting intrafruit pattern of ovule abortion and seed production in *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *Plant Syst. Evol.* 239, 215-229.
- Hannig, E., 1904. Zur Physiologie pflanzlicher embryonen. I. Über die kultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. *Bot. Ztg.* 62, 45-80.
- Haslam, T.M., Yeung, E.C., 2011. Zygotic embryo culture: an overview, in: Thorpe, T.A., Yeung, E.C. (Eds.), *Plant embryo culture: methods and protocols*. Humana Press, New York, pp. 3-15.
- Hossain, M.A., Minami, M., Nemoto, K., 2003. Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. *Jpn. J. Trop. Agr.* 47, 9-16.
- Kapila, R.K., Sethi, G.S., 1993. Genotype and age effect on in vitro embryo rescue of bread wheat x hexaploid triticale hybrids. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 35, 287-291.
- Koornneef, M., Bade, J., Hanhart, C., Horsman, K., Schel, J., Soppe, W., Verkerk, R., Zabel, P., 1993. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. *Plant J.* 3, 131-141.
- 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.
- Kott, L.S., Kasha, K.J., 1985. Embryo culture and haploid plant production, in: Bright, S.W.J., Jones, M.G.K. (Eds.), *Cereal tissue and cell culture*. Springer, Dordrecht, pp. 45-78.
- Lee, T.D., 1988. Patterns of fruit and seed production, in: Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L. (Eds.), *Plant reproductive ecology, patterns and strategies*. Oxford University Press, New York, pp. 179-202.
- Leng, P., Yamamura, H., 2006. Fruit set and embryo rescue in crosses using parthenocarpic ‘Mopanshi’ persimmon. *Sci. Hortic.* 107, 332-336.
- Lotfi, M., Alan, A.R., Henning, M.J., Jahn, M.M., Earle, E.D., 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rep.* 21, 1121-1128.

- Monnier, M., 1976. Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench. Rev. Cyto. Biol. Vég. 39, 1-120.
- Monnier, M., 1995. Culture of zygotic embryos, in: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-153.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 473-497.
- Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagón, R., 2001. *In vitro* chili pepper biotechnology. In vitro Cell Dev. Biol.-Plant 37, 701-729.
- Raghavan, V., 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev. 41, 1-58.
- Ramming, D.W., 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25, 339-342.
- Randolph, L.F., 1945. Embryo culture of *Iris* seed. Bull. Am. Iris Soc. 97, 33-45.
- Rodríguez-Burruezo, A., Prohens, J., Raigón, M.D., Nuez, F. 2009. Variation for bioactive compounds in ají (*C. baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R.&P.) and implications for breeding. Euphytica 170, 169-181.
- Satoh, H., Takashina, T., Escalante, A., Egashira, H., Imanishi, S., 2000. Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene Rg-2 in *Lycopersicon chilense*. Breed. Sci. 50, 251-256.
- Sharma, D.R., Kaur, R., Kumar, K., 1996. Embryo rescue in plants-a review. Euphytica 89, 325-337.
- Tamaki, M., Urasaki, N., Nakamura, I., Motomura, K., Adaniya, S., 2011. Shortening the breeding cycle of papaya (*Carica papaya* L.) by culturing embryos treated with ethrel. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 106, 225-233.
- Tang, F., Wang, H., Chen, S., Chen, F., Liu, Z., Fang, W., 2011. Intergeneric hybridization between *Dendranthema nankingense* and *Tanacetum vulgare*. Sci. Hortic. 132, 1-6.
- Tukey, H. B., 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos. J. Hered. 24, 7-12.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G., 2006. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. Breed. Sci. 56, 31-38.

**Effect of growth regulators and initial dark incubation on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from peppers (*Capsicum annuum*).**

Scientia Agricola. Enviado.



**Effect of growth regulators and initial dark incubation on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from peppers (*Capsicum annuum*).**

J.P. Manzur, M.N. Calvache-Asensio, A. Rodríguez-Burruezo\*

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, Spain.

\*Corresponding author

e-mail: [adrodbur@upvnet.upv.es](mailto:adrodbur@upvnet.upv.es)

Phone# +34 963879383

Fax# +34 963879422

Complete postal address:

Dr. Adrián Rodríguez-Burruezo

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Edificio 8E, acceso J. Ciudad Politécnica de la Innovación, Universitat Politècnica de València.

Camino de Vera s/n

46022, Valencia, Spain.

**Abstract**

Common pepper (*Capsicum annuum* L.) is among the most important vegetables in the world and huge breeding efforts are made every year to develop new improved materials of this species. In this regard, *in vitro* culture of immature embryos may help breeders to accelerate breeding cycles, to overcome interspecific barriers, among other applications. In this work, we have optimized a protocol for *in vitro* culture of immature embryos of *C. annuum*. Different levels (0.01 and 0.2 mg L<sup>-1</sup>) of indole-3-acetic acid (IAA) and zeatin have been tested to improve the efficiency (germination rates) of this technique in *C. annuum* embryos at the four main immature stages (i.e. globular, heart, torpedo, and early cotyledonary) from four different varietal types of this species (California Wonder, Piquillo, Guindilla, and Bola). The effect of 5-days initial incubation in dark was also tested on the most efficient hormone formulation. On average, relatively low levels of both IAA and zeatin (0.01 mg L<sup>-1</sup> each) (M<sub>1</sub>) provided the highest germination rates (33%), particularly in the advanced stages (torpedo and cotyledonary). To a lower extent, the lack of these growth regulators or high IAA (0.2 mg L<sup>-1</sup>)/low zeatin (0.01 mg L<sup>-1</sup>) combination also showed a positive response of embryos (24%). On the contrary, high zeatin levels (0.2 mg L<sup>-1</sup>) provoked very low germination rates or callus development (efficiency 0-7% at any stage and genotype). Finally, M<sub>1</sub> plus 5-days of initial dark incubation (M<sub>1</sub>-D) improved the efficiency rates at any embryo stage, particularly in the earliest (globular) embryos which increased from 3% to >20%.

**Keywords:** *Capsicum* peppers, embryo stage, genotypic diversity, indole-3-acetic acid, zeatin, darkness.



## Introduction

Peppers (*Capsicum annuum* L.) are profusely cultivated throughout the world and they are amongst the most important vegetables, with a production of approximately 30 million tons (FAOSTAT, 2011). Because of that, this crop is subjected to huge efforts of breeding for many traits of interest in order to ensure yield stability and fruit quality (de Sousa and Maluf, 2003; Blat et al., 2005; Crosby, 2008). In this regard, *in vitro* culture of immature embryos can be a useful tool to shorten generation cycles, to produce haploid and double haploid plants, or to rescue potentially abortive interspecific embryos, enabling the introgression of traits of interest between related species, among other applications (Hossain et al., 2003; Lotfi et al., 2003; Guzzo et al., 2004; Yoon et al., 2006; Bhattarai et al., 2009).

It is commonly accepted that the efficiency of embryo culture depends mostly on: i) genotype: as other *in vitro* techniques, different accessions may show different responses to *in vitro* culture (Kothari et al., 2010), ii) embryo stage (Raghavan, 2003; Manzur et al., 2013), iii) media formulation: components such as mineral salts, carbohydrates, growth regulators, nitrogen compounds, vitamin, plant extract, etc., also have dramatic effects on the response of embryos (Monnier, 1995), and iv) conditions of incubation, particularly temperature and dark/light conditions (Razdan, 2003).

However, the knowledge of the response of *Capsicum* zygotic embryos to *in vitro* culture is still scarce, apart from a few reports. Thus, Hossain et al. (2003) found a positive effect of casein and coconut water and also that sucrose provides better results than fructose or glucose. Additionally, Yoon et al. (2006) could rescue interspecific *C. annuum* × *C. baccatum* embryos, but at low rates and at the most advanced immature stages. More recently, we have found that relatively low levels of sucrose and Murashige-Skoog salts (MS) increases considerably the efficiency of embryo germination in most *Capsicum* genotypes and embryo stages, including globular embryos (Manzur et al., 2013). Nevertheless, the role of others factors like growth regulators or initial dark incubation still has not been studied.

In this sense, low levels of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) promote in several species embryo growth (Moshkov et al., 2008) and replace the role of the suspensor, which is lost during excision (Cionini et al., 1976). Additionally, auxins (usually indole-3-acetic acid,

IAA) may promote the growth of primary roots, hypocotyls and cotyledons at low dose (Raghavan and Torrey, 1963; Machakova et al., 2008), while cytokinins usually show favorable effects on early stages at relatively high levels (Bennici and Cionini, 1979). Furthermore, the combinations of auxins and cytokinins have showed favorable effects on early *Capsella* embryos (Raghavan, 1964). Moreover, initial dark incubation has been found to improve germination rates and embryo growth in several species like barley, flex or *allium*, among others (Norstog and Klein, 1972; Razdan, 2003). Nevertheless, the response to these factors is highly dependent on the species (Monnier, 1995) and, therefore the main objective of the present experiment is to assess the effect of IAA, zeatin and dark incubation in *C. annuum* immature embryos. This work will provide useful information to complement previous studies and to optimize *in vitro* culture protocols for immature embryos of peppers.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Plant material and growing conditions

A total of four accessions from *C. annuum* were utilized in the present study (Table 1). Plants were transplanted to a glasshouse of the Universitat Politècnica de València (UPV) in Feb. 2011 and grown under the Spring-Summer season. Natural illumination and a temperature range of 18°/25°C were used for this experiment. Plants were drip irrigated every 8 h for 3 min. (4 L h<sup>-1</sup>) and fertilizer was applied with irrigation water at a rate of 1 g L<sup>-1</sup> of a commercial fertilizer 15N-2.2P-24.9K (BASF, Barcelona, Spain).

Table 1. Origin and fruit traits of the accessions utilized in the present experiment.

Accession	Abbreviation	Origin	Color	Weight (g)	Length (cm)	Width (cm)
California Wonder	California	Breeding line. UPV-COMAV germplasm bank	Pale red	90-150	8-11	6-10
Pimiento del Piquillo	Piquillo	Cons. Reg. IGP Piquillo Lodosa. Navarra. Spain	Red	20-33	7-9	4-6
Guindilla de Ibarra	Guindilla	Neiker. Ibarra. Spain	Deep red	7-12	7-12	1-2
Pimiento de Bola	Bola	Cons. Reg. DOP Pimentón Murcia. Murcia. Spain	Red	10-14	3-5	4-6

## 2.2 Evaluated media and conditions

To study the role of auxins and cytokinins a formulation previously optimized by us (Manzur et al., 2013), which included:  $\frac{1}{2}$ MS dose ( $2.2 \text{ g L}^{-1}$  of commercial formulation), sucrose at  $40 \text{ g L}^{-1}$ , gibberellic acid ( $\text{GA}_3$ ) at  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ , agar at  $7 \text{ g L}^{-1}$ , and pH 5.7 was utilized as control ( $\text{M}_0$ ). Then, on the basis of  $\text{M}_0$ , relatively low ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) and/or high ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ) levels of IAA and zeatin were combined to assess the effect of these growth regulators, while  $\text{GA}_3$  at  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  was kept in all formulations as we consider it essential for replacing the suspensor (Cionini et al., 1976). As a result, the studied formulations were:  $\text{M}_0$  or control, which lacked both IAA and zeatin,  $\text{M}_1$  ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  IAA and  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  zeatin),  $\text{M}_2$  ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  IAA and  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  zeatin),  $\text{M}_3$  ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  IAA and  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  zeatin) and  $\text{M}_4$  ( $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  IAA and  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  zeatin). Finally, once established the best IAA/zeatin combination, the effect of darkness was tested on embryos cultures under that formulation plus 5-days initial darkness incubation. The medium without hormones was sterilized by autoclave ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$  for 20 min), while hormones were sterilized separately by microfiltration ( $0.20 \text{ }\mu\text{m}$  Minisart® filters) to avoid denaturation and, then, added to the warm ( $35\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) autoclaved media before solidifying.

### 2.3 Isolation and *in vitro* culture of embryos

To achieve the required number of immature seeds for the experiment, plants were selfed repeatedly since Apr. 2011 (Fig. 1A), and then, fruits were harvested 15-30 days after pollination (DAP) (Fig. 1B). Once in the lab, the whole fruit was surface-sterilized with ethanol (96%) under laminar flow cabinet conditions. Then, immature seeds were removed (Fig. 1C) and dissected under stereomicroscope ( $\times 24$ ), using hypodermic sterilized needles (Fig. 1D). Embryos were excised carefully, recording the embryo stage, and immediately cultured in 90 $\times$ 15 mm Petri dishes containing the corresponding medium (Fig. 1E). Petri dishes were then sealed with parafilm® and incubated in a growth chamber (25 $\pm$ 1 °C; 70% HR; 16 h/8 h; light/dark). The only exception corresponding to the dark-incubated embryos, on which petri dishes were wrapped with aluminium foil for five days.

The efficiency of *in vitro* culture was evaluated as the percentage of embryos which evolved to plantlets by showing an early development of root and shoot (Fig. 1F-G) and, subsequently, a satisfactory response to acclimation (Fig. 1H-I). Embryos or plantlets with abnormalities or callus development were considered not germinated and/or not viable.

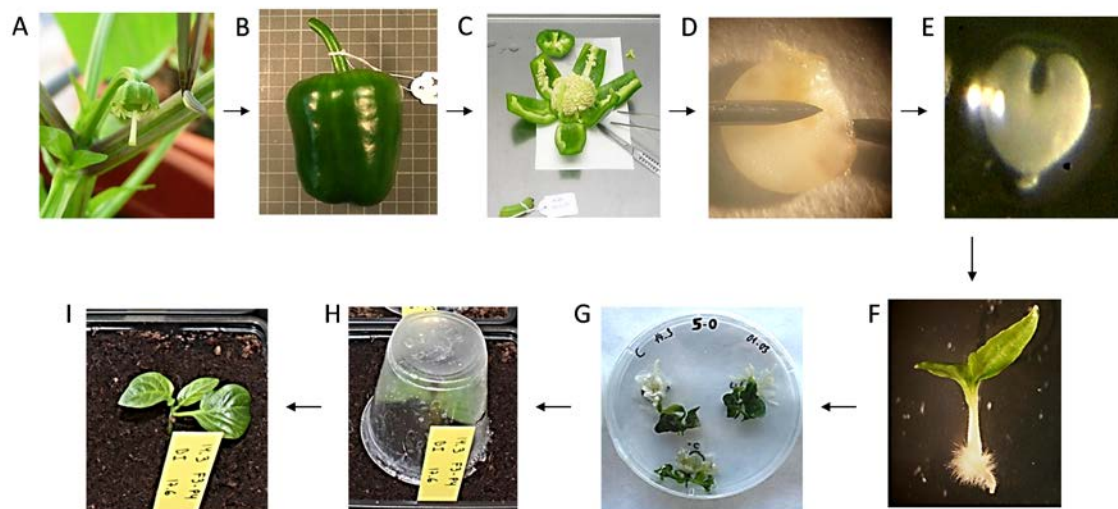


Fig. 1. Diagram of the *in vitro* culture technique in California Wonder embryos: A) self-pollination, B) immature fruit just harvested opening, C) fruit and seed sterilization, D-E) embryo excision, stage identification and *in vitro* sowing, F) embryo development and germination, G) plantlet evaluation and H-I) acclimation.

## 2.4 Experimental design and statistical analysis

The experimental design was set up as a complete factorial design (4×4×6) with five replicates, including four accessions, four embryo developmental stages (globular, heart, torpedo and cotyledonary), and six *in vitro* media/conditions (M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, and M<sub>1</sub> plus 5-days of initial dark incubation = M<sub>1</sub>-D). Each replicate consisted of one petri dish with three embryos each. Thus, 15 embryos were cultured for each accession×stage×media/condition combination and, therefore, the present experiment required the excision, *in vitro* culture, and evaluation of a total of 1440 embryos. Data of *in vitro* culture efficiency (percentage) were subjected to analysis of variance (ANOVA) to assess differences between means. All statistical analyses were performed with Statgraphics Plus 5.1 software (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, USA). Since original data were recorded as a percentage, they were transformed by arcsine square root. Transformed data were then tested, but differences between the results obtained with transformed and nontransformed data were negligible. Therefore, the ANOVA presented in this work was performed on the original nontransformed data

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Effect of growth regulators

On average, the more advanced the embryo the higher the germination rate. Thus, mean germination rates ranged from 2% in globular embryos to 28% in cotyledonary (Table 2). In this regard, embryos are highly dependent in terms of nutrition and draw upon the endosperm, the suspensor and the surrounding maternal tissues at the early phases of development (heterotrophic phase), while, later, they are metabolically capable of synthesizing substances required for their growth (autotrophic phase) from mineral salts and carbohydrates (Raghavan, 1966; Ramming, 1990; Bhojwani and Razdan, 1996), which explains the higher response observed in the advanced stages.

Furthermore, considering the interaction between *in vitro* media composition and embryo stage, we found that low levels ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) of both IAA and zeatin, provided in the  $M_1$  formulation, improved considerably the results observed in our previously optimized medium ( $M_0$ ). Thus,  $M_1$  enabled the highest germination rates on average and in most stages with the exception of the earliest embryos (Table 2).

In comparison, the lack of these growth regulators in  $M_0$  or the combination of high IAA levels and low zeatin in  $M_2$  provoked different responses. Thus,  $M_0$  allowed the highest rates in heart embryos, although no significant differences were found in comparison to  $M_1$  and  $M_2$ . However,  $M_0$  efficiency barely increased in torpedo and cotyledonary embryos, being much lower than that of  $M_1$  (Table 2). In the case of  $M_2$ , germination rates of the earliest embryos were similar to those observed in  $M_1$ , although rates in the advanced stages were lower. These findings suggest that the lack of hormones may improve embryo germination at the earliest stages, while low levels of both IAA and zeatin provides better results in immature advanced embryos.

By contrast,  $M_3$  and  $M_4$  showed the lowest germination rates, which was mainly due to abnormal plantlets or callus development. Thus, independently of the embryo stage, the efficiency of these culture media was lower than 5% (Table 2). These findings and those observed in  $M_2$  indicate that high levels of zeatin decrease dramatically the survival rates of *Capsicum* embryos at any stage, while the detrimental effect of similar levels of IAA ( $M_2$ ) is relatively low in comparison to  $M_1$  and only significant in cotyledonary embryos (Table 2).

Table 2. Culture efficiency (% germination) of immature *C. annuum* embryos depending on the *in vitro* medium and developmental stage. Each value represents the mean of the four accessions for each medium  $\times$  stage combination.

	Globular	Heart	Torpedo	Cotyledonary	Mean
M <sub>0</sub>	3.3 a <sup>a</sup>	26.7 b	28.3 b	36.6 b	23.7 b
M <sub>1</sub>	3.3 a	16.7 b	51.7 c	60.0 c	32.9 c
M <sub>2</sub>	1.7 a	15.0 ab	40.0 bc	40.0 b	24.2 b
M <sub>3</sub>	0.0 a	1.7 a	3.3 a	3.3 a	2.1 a
M <sub>4</sub>	1.7 a	1.7 a	1.7 a	1.7 a	1.7 a
Mean	2.0 A <sup>b</sup>	12.3 B	25.0 C	28.3 C	

<sup>a</sup> Different lowercase letters within the same column indicates significant differences between *in vitro* media at  $P < 0.05$  (Fisher's least significant difference, LSD).

<sup>b</sup> Different capital letters within the row indicates significant differences between developmental stages at  $P < 0.05$  (Fisher's least significant difference, LSD).

The effect of the media composition on the response of the different genotypes was quite similar to the findings for embryo stages. Thus, all the genotypes germinated at very low rates when cultured under M<sub>3</sub> or M<sub>4</sub> and, in fact, only California Wonder embryos cultured in M<sub>3</sub> showed efficiency rates slightly higher than 5%. Therefore, although other authors have reported that levels of zeatin up to 0.2 mg L<sup>-1</sup> may favor embryo growth (Bennici and Cionini, 1979), our results indicate that zeatin at relatively high levels should be not used to germinate any kind of embryos in peppers. On the contrary, the rates observed in the media with low or nil levels of zeatin (M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>) were considerably higher (Table 3).

Moreover, as observed for embryo stage, M<sub>1</sub> also provided the highest germination rates in most genotypes (Table 3), although some examples of genotype  $\times$  medium composition interaction were also found. Thus, Guindilla embryos were the only exception on which M<sub>0</sub> gave higher efficiency rates than M<sub>1</sub>, suggesting that some genotypes might prefer the lack of IAA and zeatin rather than low/minimum levels of these regulators. Another example of this interaction can be found comparing M<sub>0</sub> and M<sub>2</sub>, as their rates were quite similar in California and Piquillo embryos, while M<sub>0</sub> provided higher rates than M<sub>2</sub> in Guindilla and the contrary was true in Bola (Table 3).

Table 3. Culture efficiency (% germination) of immature *C. annuum* embryos depending on the *in vitro* medium and accession utilized. Each value represents the mean of the four embryo stages for each medium  $\times$  accession combination.

	California	Piquillo	Guindilla	Bola
M <sub>0</sub>	20.0 b <sup>a</sup>	15.0 b	28.3 d	31.7 b
M <sub>1</sub>	38.3 c	28.3 c	16.7 cd	48.3 c
M <sub>2</sub>	18.3 b	20.0 bc	13.3 bc	45.0 bc
M <sub>3</sub>	6.7 ab	0.0 a	0.0 a	1.7 a
M <sub>4</sub>	0.0 a	1.7 a	1.7 ab	3.3 a

<sup>a</sup> Different lowercase letters within the same column indicates significant differences between medium at  $P < 0.05$  (Fisher's least significant difference, LSD).

As a whole, despite the effect of growth regulators in embryo culture is quite variable depending on the species/genotype and embryo stage (Sharma et al., 1996; Davey and Anthony, 2010), we can conclude that, in the case of *C. annuum* immature embryos, a minimum content (0.01 mg L<sup>-1</sup>) of IAA and zeatin provides the best results. These findings are in agreement with the reports of other authors in barley, *Phaseolus coccineus* or *Capsella bursa-pastoris* (Veen, 1963; Raghavan, 1964; Cionini et al., 1976; Umbeck and Norstog, 1979) and, therefore, medium M<sub>1</sub> was chosen to assess the effect of initial dark incubation on *in vitro* embryo germination.

### 3.2. Effect of initial dark incubation

The combination of M<sub>1</sub> and darkness (M<sub>1</sub>-D) in the first five days of embryo culture increased considerably embryo germination in comparison to the mere use of M<sub>1</sub>, suggesting a positive effect of this factor, although the most significant differences were mainly found in the earliest stages (Fig. 2). Thus, globular embryos showed a mean germination rate >20% under M<sub>1</sub>-D combination, which was considerably higher than the mean rate of M<sub>1</sub> for these embryos, and even higher than the mean values reported by Manzur et al. (2013) in a wide collection of *Capsicum* spp. M<sub>1</sub>-D also provided higher germination rates in heart and torpedo stages than M<sub>1</sub>, although differences were lower than those observed in globular embryos, particularly at the cotyledonary stage (Fig. 2), which may be due to the strong autotrophic nature of these embryos, being less dependent



on culture conditions. According to George et al. (2008) and Neumann et al. (2009), the action of cytokinins and auxins is light-dependent and they show remarkable degradation due to light exposure, particularly auxins. Probably, this fact explains the higher response to dark incubation observed in globular embryos, which are more dependent of media components, including growth regulators and, consequently, their degradation.

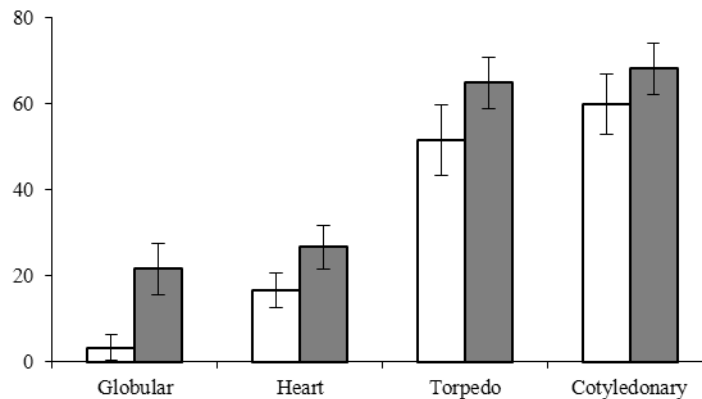


Fig 2. Culture efficiency (% germination) of immature *C. annuum* embryos, under  $M_1$  medium with (grey) or without (white) 5-days of initial dark incubation. Lines on bars represent the mean  $\pm$  SE.

Considering the different genotypes evaluated, a positive effect was also found for  $M_1$ -D, which provided germination rates similar or higher than those of  $M_1$ . Thus,  $M_1$  plus initial cultivation under darkness improved significantly the average efficiency in Guindilla, from <20% to >50%, and to a lesser extent in Piquillo, while this strategy did not improve significantly mean rates in California and Bola embryos (Fig. 3). In this regard, the first studies on this subject suggested that light was not critical for *in vitro* growth of immature embryos (Narayanaswamy and Norstog, 1964; Matsubara and Nakahira, 1965). However, more recent studies have revealed that a few days of incubation in darkness may favor the subsequent chlorophyll formation in immature embryos of, among others, barley, flax, and *Aegilops*×*Hordeum* and interspecific *Allium* hybrids (Razdan, 2003).

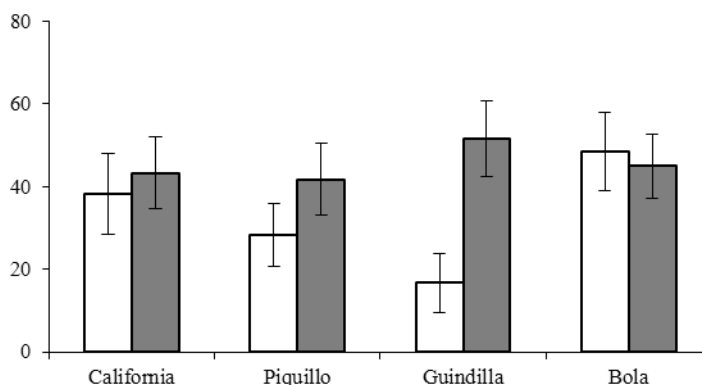


Fig 3. Culture efficiency (% germination) of immature *C. annuum* embryos, under  $M_1$  medium with (grey) or without (white) 5-days of initial dark incubation. Lines on bars represent the mean  $\pm$  SE.

Finally, comparing  $M_1$ -D rates to the values recorded for  $M_0$ - $M_4$  (Tables 2 and 3) we can conclude that, in general, the former provides higher responses at any embryo stage and genotype, suggesting that low levels of IAA and zeatin ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) and relatively low levels of sucrose ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ) and MS salts ( $2.2 \text{ g L}^{-1}$ ), combined with darkness during the first five days of embryo culture, is the best alternative for *C. annuum* embryos.

### Acknowledgements

Juan P. Manzur thanks Universitat Politècnica de València for a research grant (2011-S2-4264, programa para la formación de personal investigador, FPI). Authors thank NEIKER and the Consejos Reguladores of D.O.P. Pimentón de Murcia and D.O.P. Pimiento del Piquillo de Lodosa for providing us with sedes of Guindilla de Ibarra, Bola and Piquillo.

## REFERENCES

- Bennici, A., Cionini, P.G., 1979. Cytokinins and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* 147, 27-29.
- Bhattacharai, S.P., De La Pena, R.C., Midmore, D.J., Palchamy, K., 2009. *In vitro* culture of immature seed for rapid generation advancement in tomato. *Euphytica*, 167, 23-30.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Blat, S.F., da Costa, C.P., Vencovsky, R., Sala, F.C., 2005. Inheritance of reaction to *Leveillula taurica* (Lev.) Arn. in *Capsicum annum* L. *Scientia Agricola* 62, 40-44.
- Cionini, P.G., Bennici, A., Alpi, A., D'Amato, F., 1976. Suspensor, gibberellins and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* 131, 115-117.
- Crosby, K.M., 2008. Pepper, in: Prohens, J., Nuez, F. (Eds.), *Vegetables II*. Springer, New York, NY, USA, pp. 221-248.
- Davey, M., Anthony, P., 2010. *Plant cell culture: essential methods*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.
- FAOSTAT. 2011. FAOSTAT Agriculture Data. FAO, Rome, Italy. Available at <http://faostat.fao.org> (accessed 1 February 2013).
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Guzzo F., Ceoldo S., Andreetta F., Levi M., 2004. *In vitro* culture from mature seeds of *Passiflora* species. *Scientia Agricola* 61, 108-113.
- Hossain, M.A., Minami, M., Nemoto, K., 2003. Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. *Jpn. J. Trop. Agr.* 47, 9-16.
- Kothari, S.L., Joshi, A., Kachhwaha, S., Ochoa-Alejo, N., 2010. Chili peppers – A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances* 28, 35-48.
- Lotfi, M., Alan, A.R., Henning, M.J., Jahn, M.M., Earle, E.D., 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Rept.* 21, 1121-1128.
- Machakova, I., Zazimalova, E., George, E.F., 2008. *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors*, in: George, E.F., Hall, M.A.,

- De Klerk, G.J. (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 175-204.
- Manzur, J.P., Penella, C., Rodríguez-Burruezo A., 2013. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. Scientia Horticulturae (accepted paper).
- Matsubara, S., Nakahira, R., 1965. Some factors affecting the growth of young embryo *in vitro*. Sci. Rep. Kyoto. Pref. Univ. (Nat. Sci., Liv. Sci. & Welf. Sci.) Ser. A 16, 1.
- Monnier, M., 1995. Culture of zygotic embryos, in: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 117-153.
- Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., George, E.F., 2008. Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds, in: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (Eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 227-282.
- Narayanaswamy, S., Norstog K., 1964. Plant embryo culture. Bot. Rev. 30, 587-628.
- Neumann, K., Kumar, A., Imani, J., 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology Basics and Application. Springer, Berlin, Germany.
- Norstog, K., Klein, R.M., 1972. Development of cultured barley embryos. Precocious germination and dormancy. Canadian Journal of Botany 50, 1887-1894.
- Raghavan, V., 1964. Interaction of Growth Substances in Growth and Organ Initiation in the Embryos of *Capsella*. Plant Physiology 39, 816-821.
- Raghavan, V., 1966. Nutrition, growth and morphogenesis of plant embryos. Biol. Rev. 41, 1-58.
- Raghavan, V., 2003. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. In Vitro Cell Dev. Biol Plant 39, 437-442.
- Raghavan, V., Torrey, J.G., 1963. Growth and morphogenesis of globular and older embryos of *Capsella* in culture. Am. J. Bot. 50, 540-551.
- Ramming, D.W., 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. HortScience 25, 339-342.

- Razdan, M.K. 2003. Plant tissue culture. Second edition. Science Publishers, Inc. Enfield (NH), USA.
- Sharma, D.R., Kaur, R., Kumar, K., 1996. Embryo rescue in plants-a review. *Euphytica* 89, 325-337.
- de Sousa, J.A., Maluf, W.R., 2003. Diallel analyses and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Scientia Agricola* 60, 105-113.
- Umbeck, P.F., Norstog, K., 1979. Effects of abscisic acid and ammonium ion on morphogenesis of cultured barley embryos. *Bull. Torrey. Bot. Club* 106, 110-116.
- Veen, H., 1963. The effect of various growth-regulators on embryos of *Capsella bursa-pastoris* growing *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.* 12, 129-171.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G., 2006. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Sci.* 56, 31-38.



***In vitro* germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.)**

Scientia Horticulturae. Enviado





***In vitro* germination of immature embryos for accelerating generation advancement in peppers (*Capsicum annuum* L.)**

J.P. Manzur, M. Oliva-Alarcón, A. Rodríguez-Burruezo\*

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia. Spain.

\*Corresponding author

e-mail: [adrodbur@upvnet.upv.es](mailto:adrodbur@upvnet.upv.es)

Phone# +34 963879383

Fax# +34 963879422

Complete postal address:

Dr. Adrián Rodríguez-Burruezo

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Edificio 8E, acceso J. Ciudad Politécnica de la Innovación, Universitat Politècnica de València.

Camino de Vera s/n

46022, Valencia, Spain.

**Abstract**

*Capsicum* peppers are one of the most important vegetables in the world and, consequently, continuous breeding efforts are required to develop new materials with high yields and/or improved for resistances or fruit traits. In this sense, breeding programs usually last many years because many generations are needed and, also, each generation requires several months. As an alternative, the isolation and *in vitro* germination of immature embryos might be helpful to shorten breeding cycles and accelerate breeding programs. Here, we have evaluated the efficiency of this technique to shorten breeding cycles in *C. annuum* under both Autumn-Winter and Spring-Summer growing conditions. Five accessions, representing different varietal types, were included: California Wonder (red and yellow), Bola, Guindilla, and Piquillo. Because of their *in vitro* germination aptitude, immature advanced embryos (torpedo-early cotyledonary) were used. The length of conventional breeding cycles (controls) was comprised between 148 and 184 days in AW and between 117 and 154 days in SS, showing that no more than two generations per year are possible in peppers. By contrast, the *in vitro* strategy enabled 33 to 70 days less in the AW season and 13 to 56 days less in SS, with California accessions showing the highest shortenings. These findings show that this strategy will allow *Capsicum* breeders to achieve three generations per year, including California peppers, and up to four generations in the case of cayenne-type peppers. Furthermore, compared to controls, *in vitro*-germinated plantlets showed high pollen fertility and no deleterious effects were observed in their subsequent development (plant height and biomass), which dismisses the effect of precocious germination, and, therefore, these plants can be integrated safely in breeding programs.

**Keywords:** *Capsicum* peppers, breeding cycles, embryo culture, cycle shortening, seedling growth.

## Introduction

Paprika and chile peppers (*Capsicum* spp.) are one of the most important vegetables in the world for both fresh and spice consumption, encompassing a worldwide production of 30 million t and an acreage of 4 million ha (FAOSTAT, 2011). Furthermore, among the cultivated taxons of genus *Capsicum*, *C. annuum* L. is the most diverse and economically important species (DeWitt and Bosland, 2009; Rodríguez-Burruezo et al., 2010). In this regard, Spain is the largest producer and exporter of *C. annuum* in Europe, and the Mediterranean coast of the country is the major producing region (FAOSTAT, 2011; MAGRAMA, 2012).

As other species, peppers require continuous breeding to improve different traits like stable production against pests, diseases, and/or abiotic stress (e.g. water stress, salt stress), as well as fruit quality (e.g. content in antioxidants, coloring power, pungency and aroma components) (Moury et al., 2000; Gnayfeed et al., 2001; Lee et al., 2005; Topuz and Ozdemir, 2007; Monroy-Barbosa and Bosland, 2008; Rodriguez-Burruezo et al., 2009 and 2010). In this respect, the most usual breeding methods in peppers are: i) pedigree –selection of individual plants combined with controlled self-pollination– ii) backcross –particularly for traits controlled by one or few genes, which involves selection of individual plants and successive crosses to a recurrent parent– and iii) recurrent selection –which involves selecting individuals from a population followed by intercrossing to form a new population– (Bosland and Votava, 2000). Additionally, the single seed descent method, which does not need selection during the breeding process, is also utilized in the development of recombinant inbred lines (RILs) (e.g. Sy et al., 2008).

All these methods require a considerable number of successive generations. Moreover, the minimum time to complete each generation is also an important factor in the total length of a breeding program. In the case of *C. annuum*, there are no detailed data about the length of breeding generations, although it is known that the development of peppers is slower than other related crops like tomato, which is due to their higher temperature requirements (Bosland and Votava, 2000). In addition, differences among genotypes could be expected for this trait and also climate conditions may have a dramatic effect on the growth of these plants.

As observed in other vegetables, the lapse of time between seed sowing and germination in *C. annuum* is very short considering the whole cycle (Bosland and Votava, 2000; Nuez et al., 2003). By contrast, the longest phases of the breeding cycle in peppers are plant growth and fruit development. Furthermore, *Capsicum* pods must reach the fully ripe stage to ensure the viability of seeds, which technically increases the length of the breeding cycle. Otherwise, seeds from unripe fruits show very low or nil germination rates (Sanchez et al. 1993; Nuez et al., 2003). As a result, the completion of a breeding program using this conventional methodology may take several years.

In this regard, shortening the breeding cycle in *C. annuum* would be very helpful for two reasons: i) to accelerate breeding programs and, indirectly, ii) to decrease the costs of growing plant materials (i.e. less time using greenhouses, heating and cooling systems, workers, etc.). To achieve this objective, the excision and *in vitro* cultivation of zygotic embryos from developing fruits can be considered a valid alternative to the conventional development and ripening of fruits. Furthermore, this breeding procedure could include marker assisted selection for specific traits of interest, which might allow breeders avoiding time-consuming evaluations and use the first fruits set in each generation (Bhattarai et al., 2009).

This *in vitro* technique consists of germinating and obtaining plantlets from immature embryos, grown in a defined nutrient medium under aseptic conditions (Cravero and Cointry, 2007). Since the first studies performed in *Iris* sp. (Randolph, 1945), it has been applied mainly to overcome postzygotic barriers in interespecific crosses in different species, including peppers (Ochatt et al. 2002; Hossain et al. 2003; Liu et al. 2004; Yoon et al. 2006; Cravero and Cointry, 2007; Bhattarai et al. 2009; Dagustu et al., 2010; Gebologlu et al., 2011; Wang et al., 2011). However, reports dealing with the shortening of breeding cycles are very scarce in vegetables, apart from very few studies in artichoke or tomato (Cravero and Cointry, 2007; Bhattarai et al., 2009; Gebologlu et al., 2011).

In the present experiment, we have evaluated the efficiency of the *in vitro* culture of immature embryos to shorten the length of breeding generations in *C. annuum*. Moreover, our study encompassed the response of a range of *C. annuum* varietal types and the two most usual growing seasons in the Mediterranean coast of Spain. Also, the subsequent development of plants was monitored to check potential deleterious effects of precocious germination. To our knowledge, this is the first report

about this subject in peppers and the derived results will provide useful information to optimize the efforts of *Capsicum* breeders.

## **Material and methods**

### *Plant material and growing conditions*

Five accessions, representing different varietal types of *C. annuum*, were utilized in the present study. This collection, from the germplasm bank of the COMAV, encompassed a range of geographical origins, and fruit morphological traits (Table 1).

To study the effect of environmental conditions on the breeding cycle of peppers, two separate experiments were performed considering the most common and opposite growing seasons for peppers in the Mediterranean coast of Spain: i) Autumn-Winter (AW) and ii) Spring-Summer (SS) (Nuez et al., 2003). Both experiments were carried out under greenhouse and the usual conditions of the commercial production of peppers in Spain. Thus, light conditions were limited to natural illumination, while temperatures were controlled to ensure a minimum of 15°C and a maximum of 35°C. Plants were drip irrigated (4 L/h) every 12 h for 2 min in AW and every 8 h for 2 min in SS. Fertilizer was applied with the irrigation water, at a rate of 1 g/L of a commercial 15N-2.2P-24.9K water soluble fertilizer (BASF, Barcelona, Spain).

A total of ten plants per accession and growing season were transplanted at the 4-leaf stage to the glasshouses of the Universitat Politècnica de València (Valencia, Spain) in September 2011 and March 2012 to start the AW and SS experiments, respectively.

Table 1: Origin and fruit traits of the accessions utilized in the present experiment.

Accession (abbreviation)	Origin	Color	Weight (g)	Length (mm)	Width (mm)
California Wonder_red (CWr)	Breeding line. UPV-COMAV germplasm bank	Red	90-150	82-110	59-98
California Wonder_yellow (CWy)	Breeding line. UPV-COMAV germplasm bank	Yellow	108-176	78-105	75-110
Pimiento de Bola (Bola)	Cons. Reg. DOP Pimentón de Murcia. Murcia, Spain	Red	12-18	35-48	41-62
Guindilla de Ibarra (Guindilla)	Landrace. NEIKER, Euskadi, Spain	Deep red	8-14	76-132	11-23
Piquillo de Lodosa (Piquillo)	Cons. Reg. DOP Piquillo de Lodosa. Navarra, Spain	Red	22-35	95-135	44-56

*Studied traits*

The main topic of the present work was to estimate the efficiency provided by the *in vitro* culture of immature embryos to shorten the breeding cycle in *C. annuum* peppers. To that end, the breeding cycle of peppers was monitored considering the completion of an entire generation, according to an embryo-to-embryo model, from pollination to flowering (e.g. Gebologlu et al. 2011). Thus, the cycle was divided into the following phases: i) phase 1, from pollination (controlled selfings) to seed sowing or, alternatively, to embryo isolation and culture, ii) phase 2, from sowing/embryo culture to the 4-leaf stage, when plantlets are usually transplanted, and finally iii) phase 3, from the 4-leaf stage to the initiation of the anthesis (recorded at the anthesis of the first three flowers), which was considered the stage at which breeders could perform selfings for a new generation and, therefore, the completion of the cycle.

Cycle monitoring started once flowers were selfed and labeled with the corresponding date, throughout November 2011 and April 2012 for the AW and the SS experiments, respectively. Selfings were repeated twice a week until obtaining a minimum of 20 fruits per accession and growing season. Half of the fruits were then utilized to provide immature embryos for the *in vitro* technique, while the other half remained in the plants as controls of the conventional methodology, being harvested at the fully ripe stage. The length of the breeding cycles of both strategies was then compared on the basis of the number of days after pollination (DAP), according to the established phases.

Finally, the efficiency of the *in vitro* technique was also evaluated by comparing the germination rates (%) of both *in vitro* cultured embryos and control mature seeds. In addition, to check potential deleterious effects of precocious germination (Bhojwani and Razdan, 1996) we studied other traits related to plant development and fertility at the end of the experiments: plant height (cm), plant biomass (g), and pollen viability (%), which was tested using a 1% (w/v) thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) dye (M-2128, Sigma-Aldrich) (Rodriguez-Riaño and Dafni, 2000).

*Procedure for embryo isolation and culture and subsequent development*

Only immature advanced embryos, at torpedo or early cotyledonary stages, were excised and cultured for the *in vitro* strategy because of their higher response to *in vitro* germination and development (Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2013). To achieve that, immature developing fruits were harvested at the most suitable phenological stage of each genotype, according to our expertise (Manzur et al., 2010 and 2013). Thus, depending on the growing season and the genotype, immature fruits were harvested between 20 and 40 DAP.

After been harvested, the surface of the fruit was washed with liquid detergent (liquinox® at 5%) and rinsed with tap water. Once in the lab, the whole fruit was surface-sterilized with ethanol (96%) under laminar flow cabinet conditions (model AH-100, Telstar, Terrassa, Spain). Then, immature seeds were removed and sterilized using a 1% dilution of commercial bleach (4% sodium hypochlorite) during 10 min and rinsed three times with sterile deionized water. After that, seeds were aseptically dissected under stereomicroscope ( $\times 24$ ) using hypodermic sterilized needles. Embryos were excised carefully, avoiding any damage, and immediately cultured in 90 $\times$ 15 mm Petri dishes containing the medium. Petri dishes were sealed with parafilm® and incubated in a growth chamber during 30 days, under constant temperature and humidity (25 $\pm$ 1 °C; 70% HR) and a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark).

The medium utilized in this work was previously optimized by us for *Capsicum* embryos (Manzur et al. 2013). This formulation included: agar (7 g/L), indole-3-acetic acid (IAA) (0.01 mg/L), gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.01 mg/L), sucrose (40 g/L), and Murashige-Skoog salts (<sup>1</sup>/<sub>2</sub>MS = 2.2 g/L commercial formulation) at pH 5.7. All components were purchased from commercial sources: agar from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), sucrose from Panreac (Castellar del Vallès, Spain), and hormones and MS from Duchefa Chemie (Harlem, The Netherlands). The medium was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. To avoid denaturation, hormones were sterilized separately by microfiltration through 0.20  $\mu$ m Minisart® syringe filters (Sartorius AG. Goettingen, Germany) and, then, added to the warm (35-40 °C) autoclaved media before solidifying.



Once seedlings showed a clear development of root and shoot under *in vitro* conditions, they were considered fully germinated. At this stage, they were removed from *in vitro* culture, transferred to 1 L pots containing cultivation substrate (Humin-substrat N3, Klasmann-Deilmann, Germany) and covered with perforated plastic glasses to prevent dehydration. After one week, plastic glasses were removed and pots were transferred to a nursery within the greenhouses. Once plantlets reached the 4-leaf stage, they were definitively transferred to the greenhouse until the end of the cycle.

#### *Procedure for the conventional methodology*

In the case of controls, mature seeds were removed from fruits harvested at the fully ripe stage and they were given a 4-days period of desiccation. After that, they were sown in seedling trays (12×7 cells, 480×300×55 mm in size), containing the above mentioned substrate, and transferred to the nursery. At the 4-leaf stage, plantlets were transplanted to 1 L pots containing the cultivation substrate, transferred to the greenhouses, and grown until the end of the cycle.

#### *Experimental design*

Fifty immature embryos were cultured for each accession×growing season combination, which were cultured into 10 petri dishes (five embryos each and, therefore, each petri dish was considered a replicate). Thus, the present experiment required the excision, *in vitro* culture, and evaluation of a total of 500 embryos and the previous dissection of more than 700 immature seeds. Similarly, as controls of the conventional method, 50 mature seeds from fully ripe fruits were sown for each accession×growing season combination. These mature seeds were sown separately in 10 groups (replicates) for statistical in comparison with the *in vitro* strategy. Mean germination rates and the length of phase 1 were estimated on the basis of this experimental design. To monitor the rest of the cycle and to evaluate growth and reproductive-related traits, 20 seedlings (replicates) per accession, growing season and strategy were selected randomly for being transplanted to the 1 L pots, and transferred to greenhouses.

## Results and discussion

### *AW Breeding cycle*

The conventional breeding cycle of peppers under AW conditions was comprised between 148 and 184 DAP, depending on the genotype (Figure 1). In this sense, red-fruited California Wonder, followed by yellow-fruited California Wonder and Bola, showed the longest cycles, while the shortest cycles were found in Piquillo and, particularly, Guindilla. Furthermore, differences among genotypes were also found in most phases.

Thus, as can be observed on Figure 1, phase 1 contributed the most to the whole cycle, ranging from 66 to 108 DAP, with the highest values corresponding to the California Wonder accessions. In fact, these genotypes spent more than half of the breeding cycles in the development and ripening of fruits, while the rest of accessions needed less time. These results were probably due to the higher biomass (size and pericarp thickness) of California Wonder fruits, which might involve lower growth rates than medium/small-sized fruits (Owen and Aung, 1990; Wubs et al., 2012).

By contrast, the lapse of time comprised between seed sowing and the 4-leaf stage of plantlets was quite similar among the studied genotypes (33-40 days), with the exception of Guindilla, for which this phase required more than 50 days (Figure 1). Finally, higher differences were found in phase 3, from the 4-leaf stage to the beginning of the anthesis. Thus, Guindilla and yellow California Wonder plants required, approximately, 30 days for completing this phase, while Piquillo and particularly, Bola needed more than 50 days (Figure 1). Such genotypic differences for the date of anthesis have been also recorded in crops like cotton or tomato (Gebologlu et al., 2011; Wang et al. 2011) and might be due to specific climatic requirements. In fact, other *Capsicum* species like *C. chinense* or, especially, the rare *C. pubescens* are very strict in temperature, sunlight intensity and, even, photoperiod conditions for flowering initiation and fruit set (DeWitt and Bosland, 1996; Pérez-Grajales et al., 2004; Rodríguez-Burruezo et al., 2009).

Comparatively, the strategy of isolation and *in vitro* culture of immature embryos enabled us to shorten remarkably the AW cycle in all the studied genotypes. Thus, the duration of the cycle using this technique ranged from 96 to 133 DAP of Guindilla and

Bola, respectively (Figure 1). The highest efficiency was recorded in the California Wonder accessions, on which this technique provided shortenings of 60-70 days (35-40% reduction) compared to the conventional strategy. As a result, breeders could complete the entire cycle of these genotypes merely in the period needed for conventional fruit development and ripening (Figure 1). This is of particular interest for paprika breeders in Spain and Europe because California Wonder and other bell peppers are the most economically important varietal types and the ones on which seed companies and research institutions concentrate most of their efforts (Marín, 2012). In comparison, the rest of accessions also showed significant shortenings, but lower than California peppers: 33 days in Bola and 45-50 days in Guindilla and Piquillo (Figure 1).

All these estimates were slightly lower than the results reported by Bhattarai et al. (2009) and Gebologlu et al. (2011) in tomato, although this is mainly due to the higher growth rates typical of these species. In this regard, the use of globular or heart embryos in peppers could improve these shortenings in 10 days approximately. Moreover, those stages show low germination rates (Yoon et al., 2006; Manzur et al., 2013) and, therefore, their use might be not worthy for common breeding programs in terms of efficiency.

In addition, within the *in vitro* technique, differences observed among genotypes for phase 1, from pollination to the isolation of embryos, were very low or nil, ranging from 30 to 40 DAP, and the same was true for phase 2, from 40 to 50 days (Figure 1). Therefore, the total number of days comprised from pollination to the 4-leaf stage was very similar in most genotypes. These findings indicate that there are no differences among genotypes in the number of DAP to have suitable embryos for this technique and they also reveal a lack of differential responses in their subsequent juvenile vegetative development. By contrast, and similarly to the conventional strategy, genotypes differed considerably in the length of phase 3, within the *in vitro* strategy, from 20 days in Guindilla to 47 days in Bola (Figure 1). Consequently, differences among genotypes in the length of the AW cycle are mainly due to the time elapsed between the 4-leaf stage and the beginning of the anthesis.

Finally, in all the genotypes differences between both strategies for the length of phase 1 were similar to the final shortening provided by the *in vitro* strategy. This shows that the success of this technique lies mostly in advancing the isolation and germination of immature embryos instead of completing the ripening process of seeds, which also

explains the higher shortening estimated in those peppers with the longest phase 1 (i.e. California). In addition, both strategies showed a similar length for the rest of the cycle, suggesting that the *in vitro* germination of immature embryos does not affect the subsequent development of seedlings and plantlets.

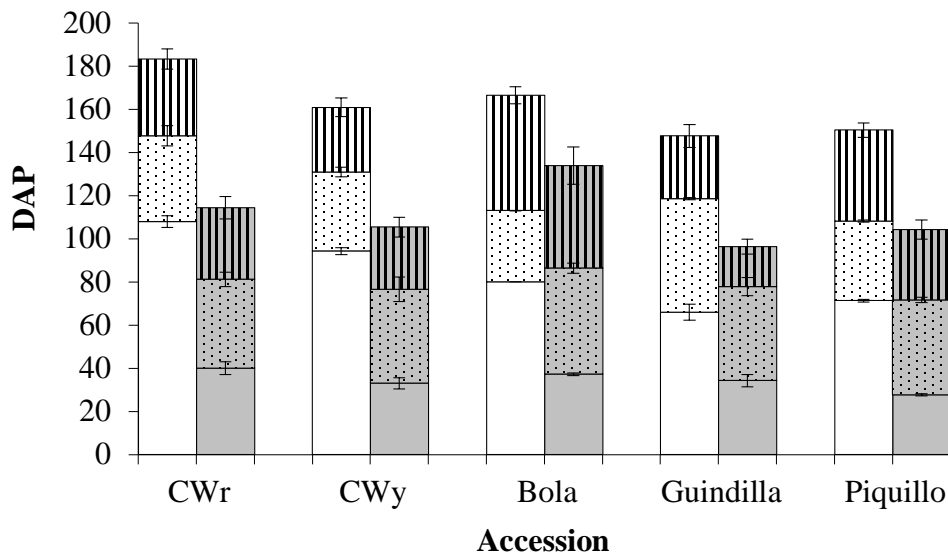


Fig. 1: Generation length in days after pollination (DAP) under the AW growing season with the conventional method (controls, white background columns) and the *in vitro* culture of immature embryos (grey background columns), divided into phase 1 (from pollination to seed sowing/embryo culture, blank), phase 2 (from seed sowing/embryo culture to 4-leaf stage, dotted) and phase 3 (from the 4-leaf stage to the beginning of anthesis, stripped). Vertical bars represent phase mean  $\pm$  standard error.

### SS Breeding cycle

As in the AW experiment, genotypes also differed for the total length of the conventional breeding cycle under SS conditions, ranging from roughly 115 days in Guindilla and Piquillo to 154 days in Bola, while California Wonder accessions showed intermediate values (Figure 2). However, these values were considerably lower than those observed in AW. This is probably due to differences in temperature and light conditions between both growing seasons, being SS conditions more favourable for the growth of *C. annuum* (Nuez et al., 2003; Wubs et al., 2012). Nevertheless, this trend depended on the accession, suggesting that genotypes differ in their adaptation to different growing cycles or

conditions. Thus, comparing Figures 1 and 2, the conventional SS breeding cycle of red-fruited California Wonder was 56 days shorter than the AW cycle, while these differences were only 13 days in Bola and, approximately, 30 days in the rest of accessions, which are ecotypes usually grown in SS in the open field.

In addition, significant differences were also found in the length of the phases of the conventional SS cycle, especially in phase 1, which contributed the most to the cycle. Thus, in the same way as the AW experiment, fruits from Bola and California Wonder accessions showed the highest values for this phase (>60 DAP), while Guindilla and Piquillo fruits showed the shortest development and ripening (Figure 2). Significant differences were also found among genotypes for phase 2, from 30 days in red California Wonder to 43 days in Piquillo, and phase 3, from 26 days in Guindilla to 46 days in Bola. In most cases, all the phases were faster under SS growing season, in particular phase 1 (e.g. 45 days less in red-fruited California Wonder) (Figures 1 and 2), in agreement with the results of Bhattarai et al. (2009) in tomato.

The fast development recorded under SS conditions, limited the shortenings provided by the *in vitro* strategy in comparison to AW. Thus, although this technique was also useful for shortening the breeding cycle in SS, both the observed genotypic variation and shortenings were considerably lower than those recorded in the AW experiment. In this regard, the total length of *in vitro*-based SS cycles ranged between 87 and 107 DAP of Guindilla and Bola, respectively and shortenings were comprised between 18 and 47 days in Piquillo and Bola, respectively (Figure 2). The main cause for this lower efficiency was a fruit development and ripening much shorter in this growing season than in AW. Finally, as it was observed under AW conditions, there were no significant differences between both strategies for the length of the rest of the cycle, suggesting a normal development of plantlets from embryo culture also for SS.

Our estimates for the total length of both AW and SS growing conditions confirm that, in practice, it is not possible to cover than 2 generation per year in peppers, specially in bell types. Thus, even under Mediterranean conditions and greenhouse cultivation, the combination of AW+SS breeding cycles should be comprised between 264 and 321 days in Guindilla and Bola (Figures 1 and 2), which is very similar to the tomato but comparatively lower than the three to four generations per year reported in cotton or

protein legumes (Ochatt et al., 2002; Bhattarai et al., 2009; Wang et al., 2011). In this regard, the *in vitro* culture of immature embryos offers the opportunity to increase considerably the number of generations per year. Thus, according to our findings, this technique could provide a combined length AW+SS cycles comprised between 183 and 240 days of the above mentioned accessions, with intermediate values (approximately 200 days) for the other genotypes. This means that breeders could complete, at least, three breeding generations per year in any *C. annuum* genotype, including the California types, and, as reported in tomato (Bhattarai et al., 2009), even four generations in cayenne types like Guindilla. Consequently, the use of this tool may provide breeders with F8-F10 inbred lines in two or three years.

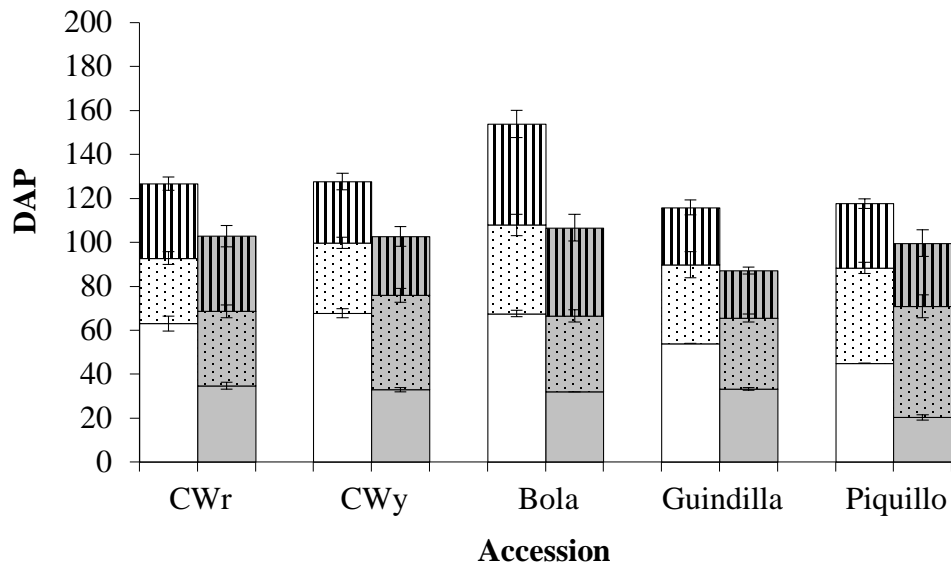


Fig. 2: Generation length in days after pollination (DAP) under the SS growing season with the conventional method (controls, white background columns) and the *in vitro* culture of immature embryos (grey background columns), divided into phase 1 (from pollination to seed sowing/embryo culture, blank), phase 2 (from seed sowing/embryo culture to 4-leaf stage, dotted) and phase 3 (from the 4-leaf stage to the beginning of anthesis, stripped). Vertical bars represent phase mean  $\pm$  standard error.

*Plant development and reproductive traits*

In most cases, the germination rates of *in vitro* cultured embryos were similar or higher than those of the corresponding control seeds. In fact, only control seeds of Bola, in the AW experiment, had significantly higher rates than the *in vitro* cultured embryos, while the contrary was true for red-fruited California Wonder and Guindilla in the AW experiment and yellow-fruited California Wonder, Bola and Guindilla in the SS experiment (Table 2). All these results suggest that *in vitro* conditions do not affect the germination efficiency of immature embryos and also confirm the suitability of using advanced immature embryos, instead of earlier stages, in order to obtain a large population required in breeding programs.

Similarly, there were no significant differences in terms of plant height and biomass between control and *in vitro* germinated plants in the SS experiment, with the only exception of Bola (Table 2), indicating that the application of this technique in this growing season does not affect the size and weight of plants. By contrast, plants from *in vitro* germination showed lower values of these traits in the AW experiment, with the only exception of the biomass estimates of Piquillo (Table 2). Probably, this trend was due to the conditions under which plantlets from each strategy completed the AW cycles once germinated, rather than deleterious effects. Thus, immature embryos were isolated and germinated *in vitro* between the end of December and January and, depending on the genotype, plantlets completed phases 2 and 3 from January to March and April. By contrast, control seeds were obtained and sown from February to the end of March and, therefore, the development of these plantlets took place much later, under light and temperature conditions more favorable for the growth of *Capsicum* plants. In comparison, the lower length of the SS cycle limited climatic differences between both strategies, explaining the lack of differences in plant size at the end of this breeding cycle. Nevertheless, independently on their size, the appearance of *in vitro* germinated plants was normal.

As observed for size-related traits, there were no significant differences between strategies for pollen viability in the SS experiment, while plants from embryo culture showed higher estimates than controls in the AW experiment, with the only exception of

Bola (Table 2). In our opinion, the temperatures which enabled a higher size in control plants in AW could have a detrimental effect on pollen viability. Thus, it is commonly accepted that a prolonged exposure to daily temperatures higher than 30°C before anthesis may decrease dramatically pollen fertility in *Capsicum* peppers (Quagliotti, 1979; Bosland and Votava, 2000). These findings indicate that pollen viability of *in vitro* derived plants is similar or, even, higher than conventionally germinated plants in all genotypes and, therefore, no problems of sterility should be expected.

Table 2: Germination rates, growth characteristics and fertility of peppers derived from conventional and embryo culture strategies at the end of the Autumn-Winter (AW) and Spring-Summer (SS) experiments.

Accession	Strategy	Germination (%) <sup>1</sup>	Height (cm) <sup>2</sup>	Biomass (g) <sup>2</sup>	Pollen viability (%) <sup>2</sup>
AW					
CW <sub>r</sub>	conventional	31.0 a <sup>3</sup>	39.3 b	39.6 b	51.6 a
	embryo culture	71.6 b	28.6 a	29.0 a	88.1 b
CW <sub>y</sub>	conventional	90.5 a	35.1 b	58.2 b	57.5 a
	embryo culture	86.6 a	26.7 a	32.0 a	91.8 b
Bola	conventional	100.0 b	53.4 b	34.0 b	81.3 a
	embryo culture	73.3 a	35.6 a	17.1 a	81.1 a
Guindilla	conventional	50.0 a	26.7 b	18.3 b	63.7 a
	embryo culture	69.7 b	17.8 a	12.9 a	94.0 b
Piquillo	conventional	59.7 a	43.0 b	27.7 a	55.5 a
	embryo culture	51.1 a	30.0 a	24.5 a	92.8 b
SS					
CW <sub>r</sub>	conventional	50.0 a	37.4 a	24.6 a	49.5 a
	embryo culture	47.2 a	34.1 a	26.8 a	51.3 a
CW <sub>y</sub>	conventional	54.7 a	28.2 a	21.1 a	50.2 a
	embryo culture	75.0 b	27.5 a	25.6 a	54.1 a
Bola	conventional	35.7 a	49.0 b	27.2 b	53.9 a
	embryo culture	80.6 b	40.1 a	25.9 a	53.0 a
Guindilla	conventional	47.6 a	29.9 a	21.4 a	54.3 a
	embryo culture	77.8 b	30.2 a	20.9 a	50.3 a
Piquillo	conventional	66.6 a	34.5 a	19.6 a	54.5 a
	embryo culture	63.9 a	30.0 a	19.3 a	54.0 a

<sup>1</sup> Mean values based on n=10 replicates (5 seeds/embryos each).

<sup>2</sup> Mean values based on n=20 replicates (1 plant each).

<sup>3</sup> Means on each genotype followed by different letters are significantly different at P<0.05 (Fisher's least significant different), indicating significant differences between strategies for that genotype.



As a whole, all these findings indicate that *in vitro* culture of immature embryos in peppers does not involve deleterious effects in the subsequent development and fertility of the individuals. Probably, this positive response is due to the use of advanced immature embryos, instead of earlier stages, which usually show lower germination rates and higher seedling mortality and abnormalities in many species (Monnier, 1995 Yoon et al., 2006; Bhattarai et al., 2009).

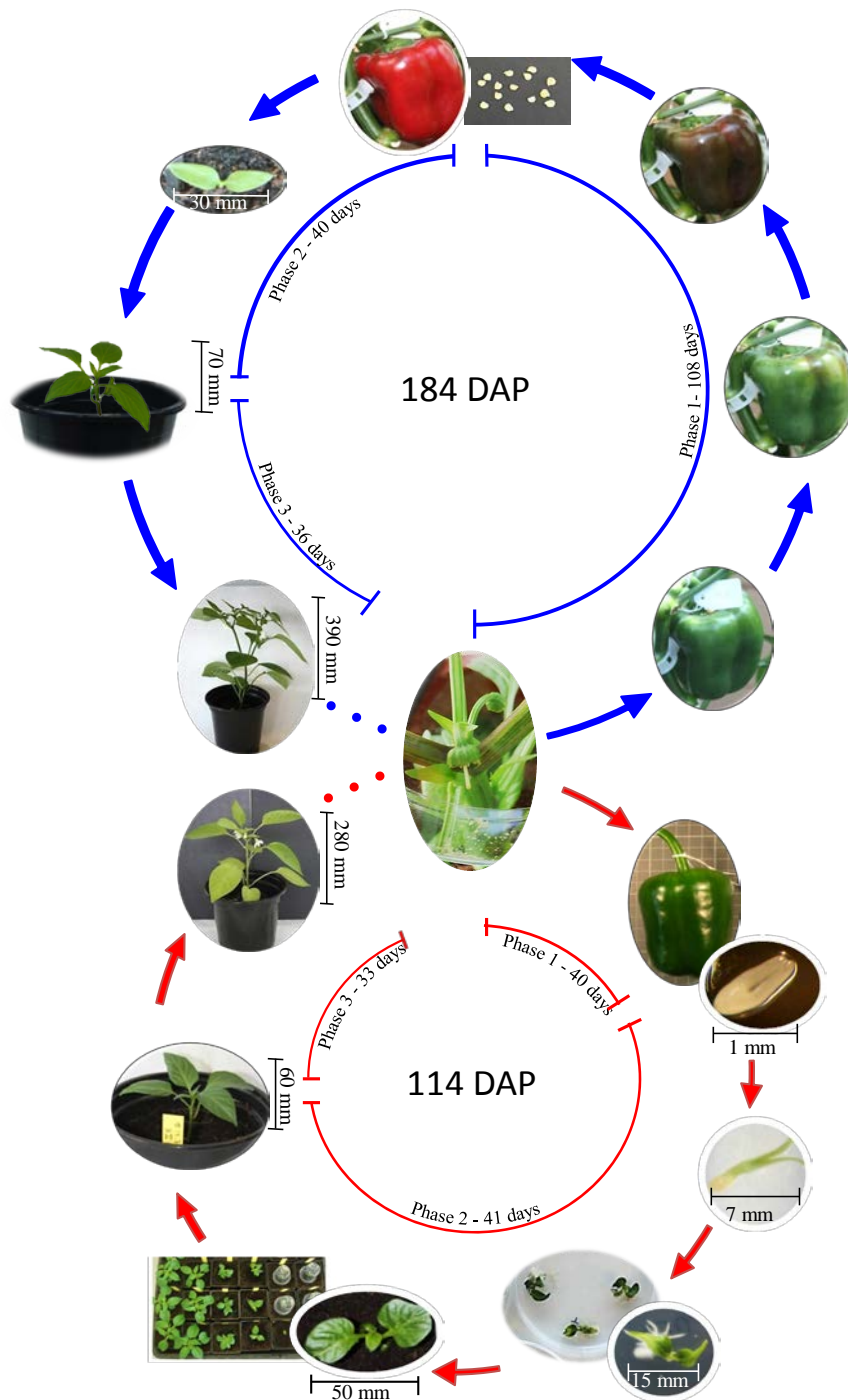


Fig. 3: Illustration of breeding cycles corresponding to the conventional (blue arrows) and embryo culture (red arrows) strategies in the red-fruited California Wonder accession under Autumn-Winter season.

## Acknowledgements

Juan P. Manzur thanks Universitat Politècnica de València for a research grant (2011-S2-4264, programa para la formación de personal investigador, FPI). Authors thank NEIKER and the Consejos Reguladores of D.O.P. Pimentón de Murcia and D.O.P. Pimiento del Piquillo de Lodosa for providing us with seeds of Guindilla de Ibarra, Bola and Piquillo.

## Literature cited

- Bhattacharai, S.P., de la Pena, R.C., Midmore, D.J., Palchamy, K., 2009. *In vitro* culture of immature seed for rapid generation advancement in tomato. *Euphytica* 167, 23-30.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier, Amsterdam.
- Bosland, P.W., Votava, E.J., 2000. *Peppers: Vegetable and spice Capsicums*. CABI Publishing, New York.
- Cravero, V., Cointy, E., 2007. Shortening the seed-to-seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. *Plant Breeding* 126, 222-224.
- Dagustu, N., Sincik, M., Bayram, G., Bayraktaroglu, M., 2010. Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) – immature embryo. *Helia* 33, 95-102.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 1996. *Peppers of the World: An identification Guide*, Ten Speed Press, Berkeley.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 2009. *The complete chile pepper book*. Timber Press, Portland.
- FAOSTAT. 2011. *FAOSTAT Agriculture Data*. FAO, Rome, Italy. Available at <http://faostat.fao.org> (accessed 1 February 2013).
- Gebologlu, N., Bozmaz, S., Aydin, M., Çakmak, P., 2011. The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *African Journal of Biotechnology* 10, 4895-4900.
- Gnayfeed, M.H., Daood, H.G., Biacs, P.A., Alcaraz C.F., 2001. Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *Journal of the Science of Food Agriculture* 81, 1580-1585.

- Hossain, M.A., Minami, M., Nemoto, K., 2003. Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. Jpn. J. Trop. Agr. 47, 9-16.
- Lee, J.J., Crosby, K.M., Pike, L.M., Yoo, K.S., Leskovar, D.I., 2005. Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). Scientia Horticulturae 106, 341-352.
- Liu, G.S., Qi, D.M., Zhang, W.D., Liu, J.S., Li, H.J., 2004. Highly efficient embryo germination *in vitro* shortens the breeding cycle in *Leymus chinensis*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40, 321-324.
- MAGRAMA. 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Available at <http://www.magrama.gob.es> (accessed 1 February 2013).
- Manzur, J.P., Herraiz, J., Rodríguez-Burruezo, A., Nuez, F., 2010. Evaluation of response to *in vitro* embryo rescue in *Capsicum* spp. Proceedings of the XIV TH EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant. Ed. Universitat Politècnica de València.
- Manzur, J.P., Penella, C., Rodríguez-Burruezo A., 2013. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. Scientia Horticulturae (accepted paper).
- Marín, J., 2012. Portagrano. Vademécum de variedades hortícolas. XIIIth edition. José Marín Rodríguez, Madrid.
- Monnier, M., 1995. Culture of zygotic embryos, in: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-153.
- Monroy-Barbosa, A., Bosland P.W., 2008. Genetic Analysis of Phytophthora Root Rot Race-specific Resistance in Chile Pepper. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 133:1-5.
- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V., Palloix, A., 2000. CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. Genome 43, 137-142.
- Nuez, F., Gil-Ortega, R., Costa, J., 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundiprensa, Madrid.

- Ochatt, S.J., Sangwan, R.S., Marget, P., Assoumou Ndong, Y., Rancillac, M., Perney, P., Röbbelen G., 2002. New approaches towards the shortening of generation cycles for faster breeding of protein legumes. *Plant Breeding* 121, 436-440.
- Owen H.R., Aung L.H., 1990. Genotypic and Chemical Influences on Fruit Growth of Tomato. *HortScience* 25, 1255-1257.
- Pérez-Grajales, M., González-Hernández, V. A., Mendoza-Castillo, M. C., Peña-Valdivia, C., 2004. Physiological characterization of Manzano Hot Pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 88-92.
- Quagliotti, L., 1979. Floral biology of *Capsicum* and *Solanum melongena*, in: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. (Eds.), *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, Academic Press, London, pp. 399-419.
- Randolph, L.F., 1945. Embryo culture of *Iris* seed. *Bull. Am. Iris Soc.* 97, 33-45.
- Rodríguez-Burruezo, A., Prohens, J., Raigón, M.D., Nuez, F. 2009. Variation for bioactive compounds in ají (*C. baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R.&P.) and implications for breeding. *Euphytica* 170, 169-181.
- Rodríguez-Burruezo, A., Kollmannsberger H., González-Más M.C., Nitz S., Nuez F., 2010. HS-SPME comparative analysis of genotypic diversity in the volatile fraction and aroma-contributing compounds of *Capsicum* fruits from the *annuum-chinense-frutescens* complex. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4388-4400.
- Rodríguez-Riaño, T., Dafni, A., 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction* 12, 241-244.
- Sánchez, V.M., Sundstrom, F.J., McClure, G.N., Lang, N. S., 1993. Fruit maturity. storage and postharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia horticulturae* 54, 191-201.
- Sy, O., Steiner, R., Bosland, P.W., 2008. Recombinant inbred line differential identifies race-specific resistance to *Phytophthora* root rot in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 98, 867-870.
- Topuz, A., Ozdemir, F., 2007. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *J. Food Comp. Anal.* 20, 596-602.

- Wang, X.F., Wang, Y.X., Zhang, G.Y., Ma, Z.Y., 2011. An integrated breeding technology for accelerating generation advancement and trait introgression in cotton. *Plant Breeding* 130, 569-573.
- Wubs, A.M., Ma, Y.T., Heuvelink, E., Hemerik, L., Marcelis, L.F.M., 2012. Model Selection for Nondestructive Quantification of Fruit Growth in Pepper. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 137, 71-79.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G., 2006. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breed. Sci.* 56, 31-38.

**Comparison between genetic bridge (GB)  
and embryo rescue (ER) techniques to  
achieve gene transfer from *Capsicum  
baccatum* to common pepper (*C.  
annuum*)**

Euphytica. En preparación para enviar





**Comparison between genetic bridge (GB) and embryo rescue (ER) techniques to achieve gene transfer from *Capsicum baccatum* to common pepper (*C. annuum*)**

J.P. Manzur, A. Rodríguez-Burruezo\*

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Universitat Politècnica de València. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia. Spain.

\*Corresponding author

e-mail: [adrodbur@upvnet.upv.es](mailto:adrodbur@upvnet.upv.es)

Phone# +34 963879383

Fax# +34 963879422

Complete postal address:

Dr. Adrián Rodríguez-Burruezo

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana. Edificio 8E, acceso J. Ciudad Politécnica de la Innovación, Universitat Politècnica de València.

Camino de Vera s/n

46022, Valencia, Spain.

## Abstract

*Capsicum annuum* is one of the most important vegetables in the world and, consequently, continuous breeding efforts are required to develop new materials with high yields and/or improved for resistances or fruit traits. In this regards, the use of related species to improve the commercial material increase the genetic pool available. In this regard, *C. baccatum* has been recently reported as a source of variation for many different traits to improve other *Capsicum* cultivated species, particularly *C. annuum*. However, both species show interspecific hybridization barriers and, therefore, special techniques are required to overcome these barriers. In this sense, these crossability problems between *C. annuum* and *C. baccatum* are mainly due to embryo/endosperm abortion and/or hybrid sterility. This study compared two strategies for overcome both barriers: i) genetic bridge (GB) using *C. chinense* and *C. frutescens* as bridge species and ii) *C. annuum* × *C. baccatum* direct cross combined with *in vitro* embryo rescue (ER). A total of 18 accessions from four species of *Capsicum* were utilized in the present study: *C. annuum* (12), *C. baccatum* (3), *C. chinense* (2) and *C. frutescens* (1). In the GB strategy we found *C. chinense* as the best bridge species between *C. annuum* and *C. baccatum*, showing the best response in the scheme: [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂). Furthermore, *C. frutescens* was discarded as bridge species due to hard prezygotic and postzygotic barriers. In the ER strategy, we found the best response in *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂) crosses and, moreover, BC1s were obtained according to the following scheme: [*C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂). Thus, we established specific schemes that demonstrate that both strategies are suitable to obtain interspecific hybrids and breeders will chose the best option according to availability of *in vitro* labs, embryo culture protocols (e.g. *in vitro* medium, culture conditions and excision embryo technique) and trained people. These results provide pepper breeders with useful information to optimize their breeding programs, reducing their efforts to transfer genes between these *Capsicum* species.

**Keywords:** *Capsicum* peppers, interspecific cross, genetic bridge, embryo rescue.

## 1.- Introduction

Peppers (*Capsicum* spp.) are amongst the most important vegetables in the world and they encompass an enormous variation. Thus, *Capsicum* genus includes 27 species, of which five are considered cultivated taxons namely *C. annuum* L. var. *annuum*, *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. var. *pendulum* and *C. pubescens* R. & P. (Nuez et al., 2003). *C. annuum*, and their cultivars are grown worldwide, is the most popular, genetically diverse, and economically important species. *C. chinense* (e.g. Ají Panca, Ají Limo, Habanero or Scotch Bonnet types) and *C. frutescens* (e.g. Malagueta, Peri Peri, Bhut Jolokia or Tabasco type) are also important in America, Africa, and Asia and are phylogenetically close to *C. annuum*. Thus, the three species can be intercrossed and make up the *annuum-chinense-frutescens* complex (or *annuum* complex), characterized by white flowers and yellow seeds (DeWitt and Bosland, 1996). Finally, *C. baccatum* and *C. pubescens* represent separate taxons and they have been profusely cultivated in the Andean region for millennia, although their cultivation out of this area is nowadays very scarce. *C. baccatum*, white flowers and yellow spots, is commonly knew as ají and their crossability with *C. annuum* is extremely difficult or not possible and, therefore, specific techniques are required to overcome hybridization barriers. Finally, *C. pubescens*, commonly known as ají rocoto/locoto (purple flowers and black rough seeds) is the rarest species and it does not cross with any of the other cultivated species (DeWitt and Bosland, 2009).

In this sense, the use of related species to improve the most commercial materials has been used for decades, in particular to transfer genes of resistance or tolerance to pests, diseases or abiotic stress, and many *Solanaceae* from America may serve as examples. Thus, until twelve traits have been introgressed in potato (*Solanum tuberosum*) from related species like *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. chacoense*, *S. acaule*, *S. vernei* or *S. spegazzinii* and more than fifty traits have been transferred to tomato (*S. lycopersicon*) from their wild relatives like *S. peruvianum*, *S. cheesmanii*, *S. pennellii* or *S. chilense* (Ross, 1986; Rick and Chetelat, 1995; Love, 1999).

Considering genus *Capsicum*, despite some sources of variation for the improvement of *C. annuum* have been identified in related species, successful reports on the interspecific gene introgression to *C. annuum* are still scarce, apart from a few notable exceptions, such as the introgression of resistance to *Tobacco mosaic virus*

(TMV), resistance to anthracnose or multiple flowering (Subramanya, 1983; Pickersgill, 1997; Yoon and Park, 2005; Yoon et al., 2006). This has been mainly due to the presence of different pre-zygotic barriers which avoid fertilization (e.g. pollen-pistil incompatibilities) and/or post-zygotic barriers, which prevent the achievement of fertile hybrids (e.g. embryo/endosperm abortion, hybrid weakness or sterility) (Hajjar and Hodgkin, 2007).

In this regard, *C. baccatum* has been recently reported as a source of variation for many different traits of paramount interest for the genetic improvement of the other cultivated species, particularly *C. annuum* (González-Salán and Bosland, 1992; Marinkovic et al., 1992; Jones and Black, 1992; Boiteux et al., 1993; Matsunaga and Monma, 1995; Muhyi and Bosland, 1995; Suzuki, 2003; Park et al., 2009). However successful works to introgress these traits/genes in *C. annuum* are very limited. This fact reveals the extreme difficulties which *Capsicum* breeders may expect in interspecific hybridizations of *C. annuum* with other taxons out of the *annuum* complex.

Therefore, it is of paramount importance to know the nature of each crossability barrier in order to plan the best strategy to overcome them. Thus, postzygotic barriers have been identified as the main cause of crossability problems between *C. annuum* and *C. baccatum* (e.g. embryo/endosperm abortion and hybrid sterility) (Yang, 2001). Consequently, the development of protocols which allow to overcome these barriers, as well as assessing all the difficulties which can appear during their application, will provide breeders with useful tools and information for under taking breeding programs involving the introgression of genes from *C. baccatum* to *C. annuum*.

An alternative to overcome these barriers is known as genetic bridge (GB), which is based on the use of species, phylogenetically close and compatible to the species with crossability barriers. In this sense, *C. chinense* and *C. frutescens* can play this role in crossings between *C. annuum* and *C. baccatum* as, according to McLeod et al. (1982), *C. baccatum* probably arose in the highlands of Southern Bolivia and Northern Argentina, while *C. chinense* and *C. frutescens* were domesticated in the Amazonian Basin from a genetic flow which migrated from the Bolivian Nuclear Centre through Mizque River. Finally, the genetic flow of *Capsicums* reached Central America and Mexico, where *C. annuum* was domesticated. In fact, the utilization of *C. chinense* and *C. frutescens* as a bridge between *C. annuum* and *C. baccatum* was previously suggested by Pickersgill (1988) on the basis of a comparative study about the number of chromosomal translocations in these species.

Another alternative to overcome *C. annuum* × *C. baccatum* barriers consist of the *in vitro* rescue of immature interspecific embryos or simply embryo rescue (ER) before abortion occurs (Hanning, 1904; Laibach, 1925). However, this strategy is technically more complex as it requires the use of *in vitro* labs, embryo culture protocols (e.g. *in vitro* medium, culture conditions and excision embryo technique) and trained people. Also, it should be taken into account that the stage at which embryo abortion occurs in interspecific hybridizations may depend on the genotypes involved in the crossing. Thus, for example, in while some authors could rescue interspecific embryos at the latest immature stages (Yoon et al., 2006), there are also many examples on which embryos had to be rescued at the earliest stages (e.g. Barbano and Topoleski, 1984; Chen and Adachi, 1996). In this sense, the earlier the stage at which embryo rescue must be done, the more difficult the procedure and the lower the efficiency (Monnier, 1995; Sharma, 1996, 2009).

Furthermore, even though hybrids materials could be achieved, hybrid sterility must be also considered as an important postzygotic barrier. Full sterility or, different degrees of fertility may vary depending on the parent genotypes. In this regard, interspecific hybrids are frequently used as female parent to prevent androsterility (Yoon et al., 2006). However, even low fertility levels can be improved through intensive backcrosses using hybrids as female parent. In extreme cases, when sterility is complete due to the lack of chromosome pairing during meiosis, fertility may be restored by polyploidization, enabling pairing of homologous chromosomes in the allopolyploid hybrid (Van Tuyl and De Jeu, 1997).

Unfortunately, studies on the crossability between *C. baccatum* and *C. annuum* and the overcoming of their compatibility barriers are almost nil apart from very few reports (Pickersgill, 1997; Yoon et al., 2006) and, furthermore, the genetic diversity included in these reports has been very low. Consequently, the use of a higher degree of genetic diversity may offer a more complete view of these barriers and the pros and cons to achieve *C. annuum* × *C. baccatum* crossings.

Therefore, the aim of this paper was to compare two strategies for the achievement of *C. annuum* × *C. baccatum* hybridization: i) genetic bridge (GB) using *C. chinense* and *C. frutescens* as bridge species and ii) *C. annuum* × *C. baccatum* direct cross combined with *in vitro* embryo rescue. In both strategies full diallel interspecific cross and, also, a range of genotypes were used. This study is of great interest for breeders as they show the difficulties which can be found in those breeding programs

which include interspecific crosses to transfer genes of interest between different species of the same genus. The effects of the direction of the crosses, cross compatibility at different levels and hybrid viability and fertility are also discussed and revised, not only in terms of *C. annuum* × *C. baccatum* crosses, but also for *C. annuum*/*C. baccatum* × *C. chinense*/*C. frutescens* crosses.

## 2. Material and methods

### 2.1 Plant material and growing conditions

A total of 18 accessions from four species of *Capsicum* were utilized in the present study: *C. annuum* (12), *C. baccatum* (3), *C. chinense* (2) and *C. frutescens* (1). This collection encompassed a comprehensive range of geographical origins and fruit morphological traits (Table 1). Additionally, new materials (hybrids, bridge cross, BC1s, etc.) were included in the experiment as they were obtained during the hybridization process. Plants, both parent accessions and new materials, were transplanted at the four-leaf stage to the glasshouses of the Universitat Politècnica de València (UPV) in February 2010, 2011 and 2012. Plants were grown under the Spring-Summer season as these controlled conditions provide the most favourable conditions for the development and fruit set of *Capsicum* genotypes in Spain (Nuez et al. 2003). Natural illumination was used for this experiment and temperature range was 18°C (night) to 25°C (day). Plants were pruned to four stems and trained with vertical strings. They were drip irrigated every 8 h for 3 min (4 L/h). Fertilizer was applied with the irrigation water, at a rate of 1 g/L of a commercial 15N-2.2P-24.9K water soluble fertilizer (BASF, Barcelona, Spain).

Table 1. Origin and fruit traits of the accessions utilized in the present experiment.

Accession (abbreviation)	Origin	Color	Weight (g)	Length (cm)	Width (cm)
<i>C. annuum</i>					
Arnoia (Arn)	Centro de Investigaciones Agrarias de Magebondo (Galicia, Spain)	Red	50-90	7-11	5-7
Bierzo (Bie)	Cons. Reg. IGP Pimiento Asado del Bierzo, Ponferrada (León, Spain)	Red	4-7	6-7	4-8
California Wr. red (CWr)	Breeding line, UPV-COMAV germplasm bank	Pale red	90-150	8-11	6-10
California Wr. yellow (CWy)	Breeding line, UPV-COMAV germplasm bank	Yellow	108-176	8-10	7-11
Guindilla (Gui)	Guindilla de Ibarra, Ibarra, Spain	Deep red	8-14	8-15	1-2
Numex (Num)	New Mexico State University, USA	Red	30-70	12-15	4-6
Pasilla Bajío (Pas)	Mexico, Southern USA	Brown	20-30	15-20	2-3
Pimiento de Bola (Bola)	Cons. Reg. DOP Pimentón Murcia, Murcia, Spain	Red	10-14	3-5	4-6
Pimiento del Piquillo (Piq)	Cons. Reg. IGP Piquillo Lodosa, Navarra, Spain	Red	20-33	7-9	4-6
PBC534 (P534)	Asian Vegetables Research and Development Center	Red	8-15	10-15	1-2
PBC716 (P716)	Asian Vegetables Research and Development Center	Red	2-5	4-8	>0.5
Serrano (Ser)	Mexico	Deep red	3-5	3-5	1-2
<i>C. chinense</i>					
Ají Panca (AjíP)	Ecuador	Brown	10-14	7-10	2-3
PI-152225 (PI15)	USDA	Deep red	4-6	4-5	1-2
<i>C. frutescens</i>					
Bol 144 (B144)	Bolivia	Pale red	>1	1-2	>0.5
<i>C. baccatum</i>					
Ají Rojo (AjíR)	Bolivia	Red	5-8	5-8	2-3
Ají Amarillo (AjíA)	Bolivia	Yellow	3-4	4-6	1-2
Brazilian pumkin (BrP)	Brazil	Red	2-3	2-3	2-3

## 2.2 Hybridization technique and experimental design

Previously to hybridization, female flowers were emasculated and pollen was extracted from male flowers and released carefully on the stigma. To prevent uncontrolled pollination, female flowers were covered with Scotch tape® after each hybridization. A total of more than 5000 hybridizations were performed in our study and about 1000 immature seeds were dissected in the embryo rescue technique.

### 2.2.1 Genetic bridge (GB)

All possible combinations of full diallel between *C. annuum* (12) and *C. baccatum* (3) accessions with the bridge species *C. chinense* (2) and *C. frutescens* (1) were done. Furthermore, all achieved F1 hybrid materials were further used to complete the bridge cross. Each hybridization was labelled with the genotypes involved in the hybridization and the date at which it was performed. A number of 10 to 30 hybridizations were done for each hybrid combination and direction of the cross and the two possible ways to achieve the bridge cross were performed: i) alternative 1 (*C. annuum* × GB) × *C. baccatum* and ii) alternative 2 (*C. baccatum* × GB) × *C. annuum*. As a result, a total of 2800 hybridizations were done in the GB strategy. Fully ripe fruits from each hybridization were harvested and their seeds were extracted and dried. After that, seeds were sown in seedling trays (7×12 cells, 480 × 300 × 55 mm) containing cultivation substrate (Humin-substrat N3, Klasmann-Deilmann, Germany) and, after 40-60 days, they were transferred to 5 L pots in the greenhouse to carry on the bridge cross (Figure 1).

### 2.2.2 Embryo rescue (ER)

A minimum of 10 hybridizations (and up to 47 in some cross) were performed in full diallel between *C. annuum* (12) and *C. baccatum* (3) accessions. As a result a total of 2500 hybridizations were done in the present ER experiment following the same procedure than reported above. Each pollinated flowers was labelled with the date and the genotypes involved in the cross. About 40 days after pollination (DAP) immature



fruits were carried to the lab. Embryo culture was performed following a protocol and a medium optimized by us in previous studies (Manzur et al., 2013 a, b). Thus, the medium included: agar (7 g/L), indole-3-acetic acid (IAA, 0.01 mg/L), gibberellic acid (GA<sub>3</sub>, 0.01 mg/L), zeatin (0.01 mg/L), sucrose (40 g/L), and MS (2.2 g/L), at pH 5.7. The media were sterilized by autoclave (121 °C for 20 min) and hormones by microfiltration (0.20 µm Minisart® filters), which were added to the warm (35-40 °C) autoclaved medium before solidifying. Embryos were excised carefully and immediately cultured in 90×15 mm Petri dishes, which were sealed with parafilm® and incubated in a growth chamber (25±1 °C; 70% HR; 16 h/8 h; light/dark), with a initial dark incubation of 5-days. After 30 days of incubation those seedlings which showed a clear development of root and shoot were transferred to 5 L pots containing the cultivation substrate and covered with perforated plastic glasses to prevent dehydration. After one week, plastic glasses were removed and pots were transferred to the greenhouses to evaluate these hybrid materials and to obtain BC1 generations (Figure 1).

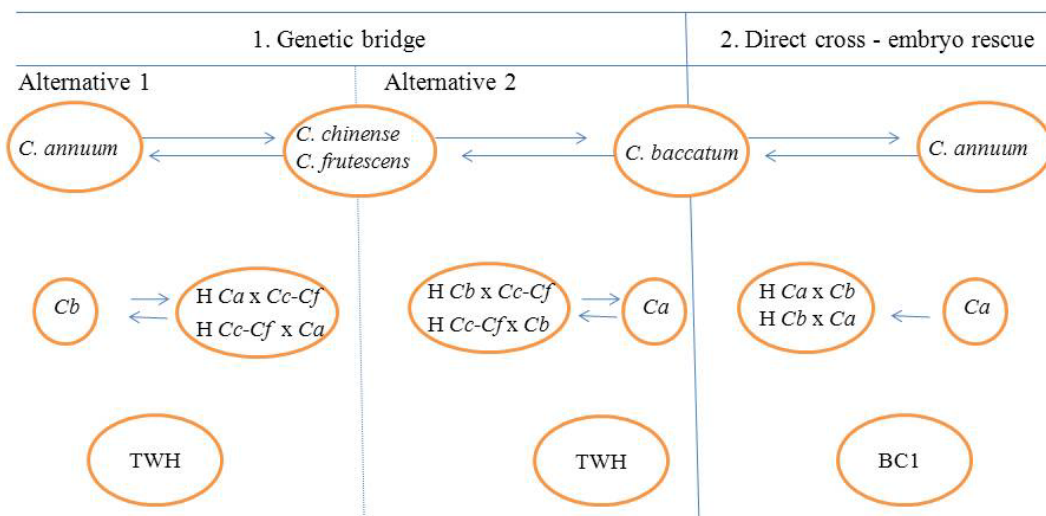


Fig. 1. Diagram of the genetic bridge and embryo rescue strategies to overcome interspecific barriers between *C. annuum* and *C. baccatum*. Arrows point in direction to female parents. H= Hybrid, Ca= *C. annuum*, Cb= *C. baccatum*, Cc= *C. chinense*, Cf= *C. frutescens*, BC1= Back cross 1, TWH= Three way hybrid.

### 2.3 Hybrid characterization and evaluated traits

To confirm the hybrid nature of new materials, we use a set of six SSRs polymorphic for the four species involved and distributes in different chromosomes (Table 2). These SSRs markers were scored according to a method described by Minamiyama et al. (2006). The compatibility of each cross was evaluated at five levels: i) ratio number fruits set/number hybridizations ii) percentage of germinated seeds/embryos after 1 month, iii) plant hybrid appearance, and iv) pollen viability, estimate with 1% (w/v) of thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) dye (M-2128, Sigma-Aldrich) (Rodríguez-Riaño and Dafni, 2000).

Table 2. SSRs utilized to confirm interspecific hybrids.

SSRs	Primer forward	Primer reverse	Size (pb)	Linkage group
CAMS-679	ttgcatgtttaccattcc	atgtgaaacacataggtagcactga	200	1
CAMS-460	cctttcacttcagccacat	accatccgctaagacgagaa	230	7
CAMS-405	ttcttgggtccacacttc	aggttgaaggagggaata	260	11
CAMS-644	cgcataagcaaatgtacca	acctgcagttgtgttga	200	4
CAMS-806	tgtcacaagtcaagtaggag	ccccaaaaatttccctcat	140	10
CAMS-398	atgggtccatggtcagcagat	gggcagaacagtggatgatt	180	7

### 3. Results and discussion

On the basis of the SSRs analysis, all new materials were confirmed as hybrids of their corresponding parents and, therefore, no uncontrolled pollination was present in our experiment. As a whole, both strategies enabled us to achieve the introgression of genetic information between *C. annuum* and *C. baccatum*: BC1 in the case of ER strategy, or the *C. annuum* × (*C. chinense*/*C. frutescens*) and *C. baccatum* × (*C. chinense*/*C. frutescens*) genetic bridge (GB) with different accessions. However, a range of results and crossability barriers was found in both strategies depending on the direction and the genotypes involved in the crosses. Consequently, all these factors must be considered to plan breeding programs which include interspecific crosses between these four species.

### 3.1 GB strategy

#### 3.1.1 *C. chinense* as genetic bridge

Despite a high crossability has been reported in literature between the species of the *annuum* complex, we found some difficulties to achieve crosses between *C. annuum* with *C. chinense* and *C. frutescens*. Thus, in the *C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂) scheme fruits set was recorded in 10 of the 24 possible combinations and, moreover, only three *C. annuum* accessions (California Wr. red, Bola and Guindilla) were able to set fruit with both *C. chinense* accessions (Table 3). Furthermore, only the seeds of 4 combinations germinated and produced normal hybrids, although with low pollen viability (17-31%) (Table 3) in comparison to their parents (80-100%) (data not shown). Noteworthy that Bola was the only *C. annuum* accession which produced hybrids with both *C. chinense* accessions and even obtaining the highest pollen viability (31%) with PI15. Therefore, this accession appears as a good alternative for the GB strategy, and also to transfer genes from *C. chinense* to commercial peppers. In the reciprocal cross *C. chinense* (♀) × *C. annuum* (♂), the number of accessions with fruit set was considerably higher, 16 of the 24 possible combinations (Table 3). However, germination was possible only in four combinations and, in addition, they arose abnormal hybrids with filiform leaves, short internodes and low growth, which avoided the beginning of the reproductive phase (Figure 2). Furthermore, the presence of the most common disease was discarded as all samples were negative to Tobamoviruses or the tomato spotted wilt virus (TSWV). Thus, the most likely reason for this abnormal was the virus-like syndrome (VLS), which has been reported by Pickersgill (1971) and it is due to the interaction between cytoplasm and nuclear genes of *C. chinense* and *C. annuum* respectively. Therefore, our results indicate that *C. chinense* must be always used as male parent to achieve viable hybrids between *C. annuum* and *C. chinense*.

After that, the 4 *C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂) hybrids available were utilized to finish the bridge cross with *C. baccatum*. In this regard, we had better results using the hybrids as female parents, achieving the bridge cross in 6 of the 8 possible combinations. These materials showed a normal appearance and a range of pollen viability (4-83%), with the highest value finding in the (Bola × AjíP) (♀) × AjíR (♂). On the contrary, when the hybrids were utilized as pollen donors, we only achieved 1 of 8 possible combinations, AjíR (♀) × (Bola × AjíP) (♂) with high pollen viability (95%),

which suggest that Bola, AjíP and AjíR have a high compatibility. Consequently, given the high combinations number (6/8) we recommend to utilize the following scheme [*C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. baccatum* (♂) to obtain the GB when breeders start by the *C. annuum* × *C. chinense* cross.

Regarding the bridge cross strategy starting by *C. baccatum*, we could achieve normal *C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂) hybrids from all of combination excluding those involving the Ají Amarillo accession (*C. baccatum*), which did not to set any fruit. Despite these hybrids had low pollen viability (19-33%) (Table 3) in comparison to their parents (85-95%) (data not shown), this was high enough to cross with *C. annuum* to achieve the GB. In the reciprocal cross *C. chinense* (♀) × *C. baccatum* (♂), we had fruit set in all possible combinations. However, as observed in *C. chinense* (♀) × *C. annuum* (♂), all these hybrids showed VLS, confirming the presence of detrimental genes in *C. chinense* cytoplasm, which provokes detrimental effects in hybrids with both *C. annuum* and *C. baccatum*. This is consistent with other works related to interspecific hybridization (Yazawa et al. 1990; Inai et al., 1993). Therefore, as suggested for crosses with *C. annuum*, *C. chinense* must be utilized as pollen donor to achieve hybrids with *C. baccatum*.

Finally, to obtain the final bridge cross we had better results utilizing *C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂) hybrids as pistillate parent, allowing 15 of the 48 possible combinations (Table 3). On the contrary, only 1 of the 48 reciprocal combinations arose hybrid material and with very low pollen fertility (3%). In addition, most [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂) combinations showed high levels of pollen viability (>50%). Therefore, this alternative should be utilized to achieve GB when starting from *C. baccatum*.

As a whole, the comparison between both ways for GB techniques showed that alternative 1 enabled 6 [*C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. baccatum* (♂) with variable pollen viability (4-83%), while by means of [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂) we achieved 13 fertile combinations with up to 94% pollen viability. Therefore, according to these findings, we recommend to utilize the latter alternative to introgress genes from *C. baccatum* to *C. annuum*. Nevertheless, it should be also considered that this strategy will require screenings of materials at the first step (*C. baccatum* × *C. chinense*) before finishing the bridge cross. For such reason Yoon

and Park (2005) utilized alternative 1 despite they also found low pollen viability. In any case, future scientists must consider which alternative is the most suitable according to their lab means.

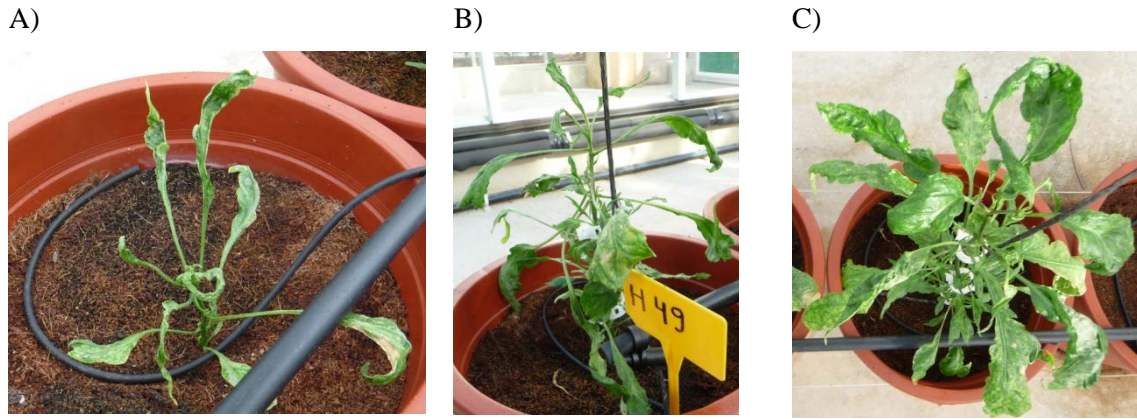


Fig. 2. *C. chinense* × *C. annuum* hybrids with virus-like syndrome (VLS) at A) 50, B) 100 and C) 150 days after sowing. Filiform leaves, short internode, and low growth symptoms can be observed.

Table 3. Descriptive results of the bridge cross technique using *C. chinense* as genetic bridge between *C. annuum* and *C. baccatum*. Those F1 combinations which did not set fruit are not included in the table.

Pistillate (♀) accessions	×	Staminate (♂) accessions	No. crosses	No. set fruit (fruit/crosses %)	Germination (%)	Hybrid appearance	Pollen viability (% ± SD)
Alternative 1: First <i>C. annuum</i> × <i>C. chinense</i> hybrids, followed by hybridization with <i>C. baccatum</i>							
<i>C. annuum</i> × <i>C. chinense</i>							
CWr	×	AjiP	20	1 (5%)	0/15 (0%)	-	-
Bola			20	3 (15%)	3/14 (21%)	Normal	17 ± 5
Gui			20	2 (10%)	0/15 (0%)	-	-
Piq			20	1 (5%)	0/15 (0%)	-	-
CWr	×	PI15	20	1 (5%)	0/15 (0%)	-	-
Arn			20	7 (35%)	0/15 (0%)	-	-
Bie			30	2 (7%)	10/15 (67%)	Normal	21 ± 4
Bola			20	4 (20%)	4/15 (27%)	Normal	31 ± 6
Gui			20	5 (25%)	0/15 (0%)	-	-
Pas			30	1 (3%)	4/14 (29%)	Normal	18 ± 8
<i>C. chinense</i> × <i>C. annuum</i>							
AjiP	×	Arn	20	10 (50%)	9/14 (64%)	VLS	-
		Bie	20	6 (30%)	6/15 (40%)	VLS	-
		Bola	10	2 (20%)	0/15 (0%)	-	-
		Gui	20	6 (30%)	0/15 (0%)	-	-
		Num	10	5 (50%)	0/15 (0%)	-	-
		Pas	20	6 (30%)	0/15 (0%)	-	-
		Piq	20	8 (40%)	0/15 (0%)	-	-
		Ser	20	6 (30%)	0/15 (0%)	-	-
PI15	×	Arn	20	7 (35%)	0/15 (0%)	-	-
		Bie	20	4 (20%)	1/15 (7%)	VLS	-
		Bola	10	2 (20%)	0/15 (0%)	-	-
		Gui	20	4 (20%)	0/15 (0%)	-	-
		Num	10	1 (10%)	0/15 (0%)	-	-
		Pas	20	3 (15%)	0/15 (0%)	-	-
		Piq	20	5 (25%)	6/15 (40%)	VLS	-
		Ser	20	3 (15%)	0/15 (0%)	-	-
(C.a × C.ch) × <i>C. baccatum</i>							
Bola × AjiP	×	AjiR	15	3 (20%)	6/14 (43%)	Normal	83 ± 6
Bie × PI15			25	1 (4%)	0/15 (0%)	-	-
Bola × PI15			25	6 (24%)	1/14 (7%)	Normal	33 ± 6
Pas × PI15			25	8 (32%)	11/14 (79%)	Normal	15 ± 7
Bola × AjiP	×	BrP	15	2 (13%)	8/14 (57%)	Normal	28 ± 5
Bola × PI15			25	3 (12%)	7/14 (50%)	Normal	12 ± 4
Pas × PI15			25	4 (16%)	3/14 (21%)	Normal	4 ± 3
<i>C. baccatum</i> × (C.a × C.ch)							
AjiR	×	Bola × AjiP	10	3 (30%)	1/5 (20%)	Normal	95 ± 2
		Bie × PI15	15	0	-	-	-
		Bola × PI15	15	0	-	-	-
		Pas × PI15	20	0	-	-	-
BrP	×	Bola × AjiP	10	1 (10%)	0/5 (0%)	-	-
		Bie × PI15	15	0	-	-	-
		Bola × PI15	20	0	-	-	-
		Pas × PI15	20	0	-	-	-

Table 3 (continued)

Pistillate (♀) accession	× Staminate (♂) accessions	No. crosses	No. set fruit (fruit/crosses %)	Germination (%)	Hybrid appearance	Pollen viability (%±SD)
Alternative 2: First <i>C. baccatum</i> × <i>C. chinense</i> hybrids, followed by hybridization with <i>C. annuum</i>						
<i>C. baccatum</i> × <i>C. chinense</i>						
AjíR	AjíP	40	4 (10%)	14/14 (100%)	Normal	24 ± 9
BrP		35	3 (9%)	10/10 (100%)	Normal	33 ± 10
AjíR	PI15	40	4 (10%)	14/14 (100%)	Normal	30 ± 12
BrP		40	5 (13%)	2/15 (13%)	Normal	19 ± 3
<i>C. chinense</i> × <i>C. baccatum</i>						
AjíP	AjíR	25	8 (32%)	7/15 (47%)	VLS	-
	AjíA	25	10 (40%)	10/15 (67%)	VLS	-
	BrP	10	2 (20%)	1/15 (7%)	VLS	-
PI15	AjíR	25	4 (16%)	6/15 (40%)	VLS	-
	AjíA	25	3 (12%)	0/15 (0%)	-	-
	BrP	10	2 (20%)	1/15 (7%)	VLS	-
(C.b × C.ch) × <i>C. annuum</i>						
AjíR × AjíP	× CWr	10	2 (20%)	3/6 (50%)	Normal	34 ± 12
BrP × AjíP		10	2 (20%)	10/29 (35%)	Normal	83 ± 10
BrP × PI15		10	1 (10%)	5/7 (71%)	Normal	87 ± 6
BrP × AjíP	× Arn	10	4 (40%)	12/45 (27%)	Normal	94 ± 1
BrP × PI15		10	1 (10%)	3/4 (75%)	Normal	58 ± 9
BrP × AjíP	× Bie	10	1 (10%)	2/15 (13%)	Normal	83 ± 5
BrP × PI15		10	1 (10%)	3/3 (100%)	Normal	68 ± 10
AjíR × AjíP	× Bola	10	3 (30%)	1/6 (17%)	Normal	10 ± 5
BrP × AjíP		10	2 (20%)	4/11 (36%)	Normal	55 ± 12
AjíR × AjíP	× Gui	10	3 (30%)	2/3 (67%)	Normal	84 ± 6
BrP × AjíP		10	1 (10%)	3/18 (17%)	Normal	55 ± 8
BrP × PI15		10	1 (10%)	7/11 (64%)	Normal	10 ± 2
AjíR × AjíP	× P534	10	1 (10%)	0/3 (0%)	-	-
AjíR × PI15		10	1 (10%)	0/4 (0%)	-	-
BrP × AjíP		10	1 (10%)	1/4 (25%)	Normal	11 ± 3
BrP × PI15		10	3 (30%)	5/22 (23%)	Ms <sup>1</sup>	-
BrP × AjíP	× Pas	10	1 (10%)	1/8 (13%)	Ms	-
<i>C. annuum</i> × (C.b × C.ch)						
Gui	× BrP × PI15	10	1 (10%)	1/10 (10%)	Normal	3 ± 2
CWr		10	1 (10%)	0/15 (0%)	-	-
Bola		10	1 (10%)	0/15 (0%)	-	-
CWr	× AjíR × PI15	10	1 (10%)	0/15 (0%)	-	-

Ms = male sterility

### 3.1.2 *C. frutescens* as genetic bridge

In comparison to *C. chinense*, *C. frutescens* showed more difficulties as bridge specie, which might be due to their phylogenetic distance to both *C. annuum* and *C. baccatum*. Thus, starting by *C. annuum* × *C. frutescens*, crosses were possible at first sight as many combinations set seeded fruits when *C. frutescens* was utilized as pollen donor. However, these seeds did not germinate. Otherwise, when *C. frutescens* was utilized as pistillate parent, we only obtain hybrids in 4 of 12 possible combinations, which after germination they all showed dwarfism (Table 4) (Figure 3). In this regard, Yazawa et al. (1989) concluded that dwarfism is controlled by two complementary dominant genes. Thus, probably our *C. frutescens* accessions present the AAbb genotype, while Piquillo, Pasilla, Bierzo and Guindilla, would have the complementary aaBB genotype.

Regarding the opposite alternative, *C. baccatum* × *C. frutescens* hybrids were only achieved when the latter was utilized as pistillate parent. However, all hybrids were affected by virus-like syndrome (VLS), probably due to *C. frutescens* cytoplasmic genes, which interact with *C. baccatum* nuclear genes, similarly to *C. chinense*. Furthermore, according to the aforementioned, *C. frutescens* should be avoided as bridge species to transfer genes from *C. annuum* to *C. baccatum*. Nevertheless, more *C. frutescens* genotypes should be further evaluated for this strategy to confirm this fact.



Fig. 3. *C. frutescens* × *C. annuum* hybrids showing dwarfism at 100 days after germination.



Table 4. Descriptive results of the bridge cross technique using *C. frutescens* as genetic bridge between *C. annuum* and *C. baccatum*. Those F1 combinations which did not set fruit are not included in the table.

Pistillate (♀) accessions	× Staminate (♂) accessions	No. crosses	No. set fruit (fruit/crosses %)	Germination (%)	Hybrid appearance
Alternative 1: First <i>C. annuum</i> × <i>C. frutescens</i> hybrids, followed by hybridization with <i>C. baccatum</i>					
<i>C. annuum</i> × <i>C. frutescens</i>					
Arn	× B144	10	6 (60%)	0/15 (0%)	-
Bie		10	1 (10%)	0/15 (0%)	-
Gui		10	2 (20%)	0/15 (0%)	-
CWr		10	2 (20%)	0/15 (0%)	-
CWy		10	2 (20%)	0/15 (0%)	-
Bola		10	4 (40%)	0/15 (0%)	-
<i>C. frutescens</i> × <i>C. annuum</i>					
B144	× Piq	10	4 (40%)	3/10 (30%)	Dwarfism
	Arn	10	5 (50%)	0/10 (0%)	-
	Pas	10	8 (80%)	1/10 (10%)	Dwarfism
	Bie	10	7 (70%)	1/10 (10%)	Dwarfism
	Gui	10	4 (40%)	1/10 (10%)	Dwarfism
	Ser	10	2 (20%)	0/10 (0%)	-
	Bola	10	2 (20%)	0/10 (0%)	-
	Num	10	6 (60%)	0/10 (0%)	-
Alternative 2: First <i>C. baccatum</i> × <i>C. frutescens</i> hybrids, followed by hybridization with <i>C. annuum</i>					
<i>C. baccatum</i> × <i>C. frutescens</i>					
AjíR	× B144	30	3 (10%)	0/10 (0%)	-
<i>C. frutescens</i> × <i>C. baccatum</i>					
B144	× AjíR	10	2 (20%)	9/10 (90%)	VLS
B144	× AjíA	10	1 (10%)	1/10 (10%)	VLS
B144	× BrP	10	6 (60%)	3/10 (30%)	VLS

### 3.2 *In vitro* rescue of immature *C. annuum* × *C. baccatum* embryos

In a preliminary experiment, diallel cross were done between eight accessions of *C. annuum* (California Wr. red and yellow, Arnoia, Bierzo, Guinidilla, Pasilla, Piquillo, and Serrano) and the three *C. baccatum* accessions. Those fruits that set and developed until the fully ripe stage were harvested and their seeds were removed and evaluated. All seeds were empty and showed necrotic points in the center, which is frequently related to embryo abortion (Figure 4). In fact, germination tests demonstrated that these seeds were not viable. These results confirmed that embryo abortion was an important barrier in *C. annuum* × *C. baccatum* crosses and, therefore, embryo rescue was necessary to achieve these hybrids. In addition, our study revealed that the main cause

of embryo abortion in hybridizations between *C. annuum* y *C. baccatum* was an early hardening of the endosperm, which limited the development of the embryos and provoked deformities and eventually their death (Figure 5).

As a whole, the use of *C. baccatum* accessions as male parents provided the best results. Thus, the number of *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂) combinations which set fruit were 26 on a total of 36 possible combinations (Table 5). Interspecific embryos could be excised and cultured *in vitro* from half of these combinations. Finally, embryos from 10 combinations were achieved and reached the adult stage. The efficiency of this *in vitro* technique varied among combinations, ranging from 6% to 75% of P534 × AjíR and P716 × AjíR, respectively (Table 5). Furthermore, Ají Rojo and Brazilian Pumpkin accessions yielded the highest number of *C. annuum* × *C. baccatum* individuals (16 hybrid plants from 4 combinations and 36 hybrid plants from 5 combinations), while Ají Amarillo only enabled 3 hybrid plants from one combination (Table 5).

By contrast, *C. baccatum* (♀) × *C. annuum* (♂) hybridizations only enabled fruit set in 14 combinations from the 36 possible combinations and, in addition, only 3 hybrid plants from 2 combinations were obtained and reached the adult stage. Furthermore, we only achieved BC1 generations from *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂) hybrid materials, using them as female parent to prevent the effect of male sterility. In fact, pollen viability of *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂) was very low compared to parent lines, ranging from 0% to 20% (Table 5). On the contrary, it was not possible to obtain BC1 from the only two *C. baccatum* (♀) × *C. annuum* (♂) combinations available as even no fruit set when backcrosses to *C. annuum* (Table 5). Finally, the three BC1 obtained showed higher pollen viability than their parental line. Thus, for example Bola × BrP had 12% and BC1= (Bola × BrP) × Bola had 91%. These results are in agreement with those from Yoon et al. (2006) to recover pollen viability by backcross.

In summary, according to our findings, we have corroborated in both strategies a high genotype dependence to obtain interspecific hybrids. Thus, if breeders have available labs and staff to perform embryo rescue, we suggest utilized both ER and GB, with our cross design (Figure 6) and ideally the genotypes with the best performance identified in our experiment. These results will allow pepper breeders to optimize their breeding programs, reducing their efforts to transfer genes between these *Capsicum* species.

Table 5. Descriptive results of the direct cross and embryo rescue technique to obtain hybrids between *C. annuum* and *C. baccatum*. Those F1 combinations which did not set fruit are not included in the table.

Pistillate (♀) accessions	×	Staminate (♂) accessions	No. crosses	No. set fruit (fruit/crosses %)	<i>In vitro</i> germination (%)	Pollen viability (% ± SD)
F1						
<i>C. annuum</i> × <i>C. baccatum</i>						
CWr	×	AjíR	45	7 (16%)	0/12 (0%)	-
CWy			22	2 (9%)	0/15 (0%)	-
Arn			50	6 (12%)	embryo not available	-
Bie			47	3 (6%)	1/12 (8%)	15 ± 1
Bola			35	2 (6%)	embryo not available	-
Gui			48	8 (17%)	5/15 (33%)	14 ± 8
P534			35	2 (6%)	1/18 (6%)	10 ± 7
P716			35	4 (11%)	9/12 (75%)	20 ± 5
Pas			40	2 (5%)	embryo not available	-
Piq			40	2 (5%)	embryo not available	-
CWr	×	AjíA	20	1 (5%)	embryo not available	-
Arn			22	3 (14%)	embryo not available	-
Bie			20	3 (15%)	0/5 (0%)	-
Bola			10	2 (20%)	embryo not available	-
Gui			20	6 (30%)	embryo not available	-
P716			10	1 (10%)	3/12 (25%)	0
Pas			25	1 (4%)	embryo not available	-
Ser			25	1 (4%)	embryo not available	-
CWr	×	BrP	45	6 (13%)	embryo not available	-
Arn			45	4 (9%)	embryo not available	-
Bie			45	6 (13%)	7/14 (50%)	5 ± 4
Bola			35	11 (31%)	19/30 (63%)	12 ± 6
Gui			40	4 (10%)	1/12 (8%)	19 ± 8
Num			25	1 (4%)	embryo not available	-
P534			25	1 (4%)	4/18 (22%)	14 ± 4
P716			25	2 (8%)	5/14 (35%)	6 ± 2
<i>C. baccatum</i> × <i>C. annuum</i>						
AjíR	×	Arn	35	4 (11%)	0/4 (0%)	-
		Bie	35	4 (11%)	1/3 (33%)	33 ± 6
		Bola	10	1 (10%)	embryo not available	-
		Gui	25	3 (12%)	0/10 (0%)	-
		Num	25	1 (4%)	embryo not available	-
		Pas	25	2 (8%)	0/12 (0%)	-
		Piq	25	2 (8%)	2/12 (17%)	21 ± 8
		Ser	25	2 (8%)	embryo not available	-
AjíA	×	Num	10	4 (40%)	embryo not available	-
		Piq	25	1 (4%)	embryo not available	-
BrP	×	Arn	35	1 (3%)	embryo not available	-
		Pas	35	1 (3%)	embryo not available	-
		Piq	40	1 (3%)	embryo not available	-
		Ser	40	2 (5%)	embryo not available	-

Table 5. (continued)

Pistillate (♀) accessions	×	Staminate (♂) accessions	No. crosses	No. set fruit (fruit/crosses %)	<i>In vitro</i> germination (%)	Pollen viability (% ± SD)
BC1						
<i>(C.a × C.b)</i> × <i>C. annuum</i>						
Bie × AjíR		Bie	20	0 (0%)	-	-
Gui × AjíR		Gui	20	0 (0%)	-	-
P534 × AjíR		P534	20	0 (0%)	-	-
P716 × AjíR		P716	20	0 (0%)	-	-
P716 × AjíA		P716	20	0 (0%)	-	-
Bie × BrP		Bie	20	2 (10%)	8/16 (50%)	35 ± 4
Bola × BrP		Bola	20	4 (20%)	7/16 (44%)	91 ± 4
Gui × BrP		Gui	20	0 (0%)	-	-
P534 × BrP		P534	20	0 (0%)	-	-
P716 × BrP		P716	20	4 (20%)	8/16 (50%)	40 ± 4
<i>(C.b × C.a)</i> × <i>C. annuum</i>						
AjíR × Bie		Bie	20	0 (0%)	-	-
AjíR × Piq		Piq	30	0 (0%)	-	-

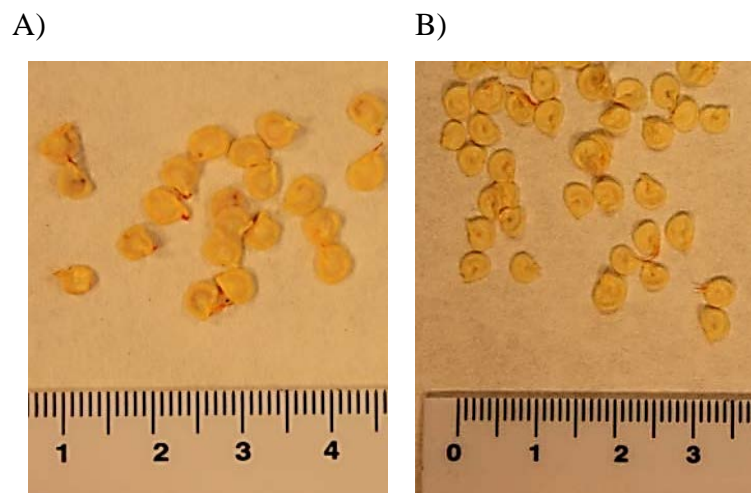


Fig. 4. Comparison between: A) normal seeds from *C. annuum* selfpollination and B) abortion seeds from interspecific cross *C. annuum* × *C. baccatum*.

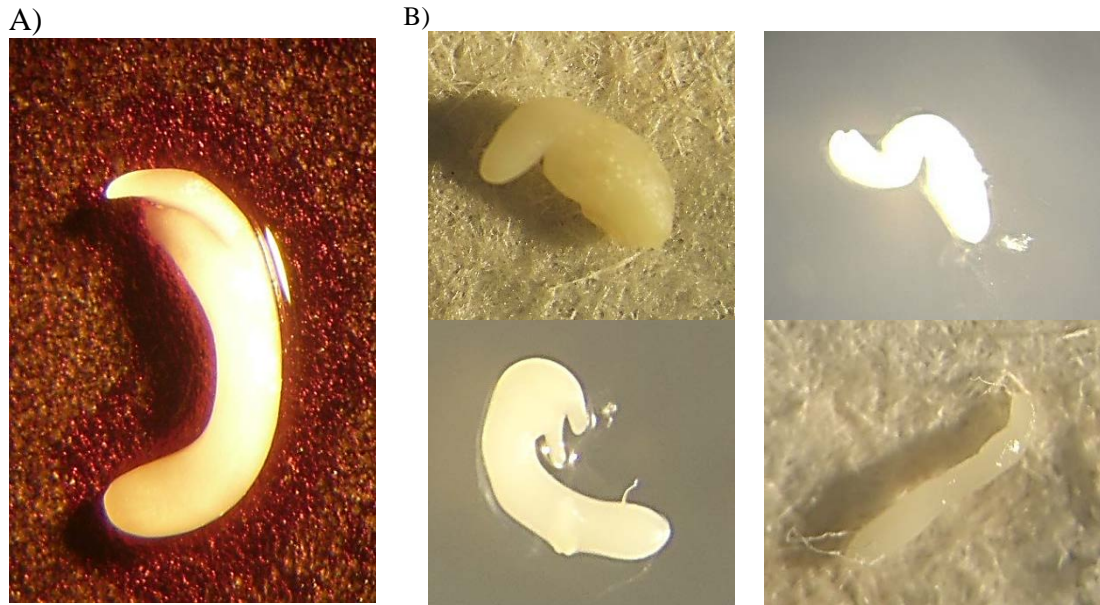


Fig. 5. Comparison between: A) normal seeds embryo from *C. annuum* self-pollination and B) embryos from interspecific cross *C. baccatum* × *C. annuum* before abortion occur.

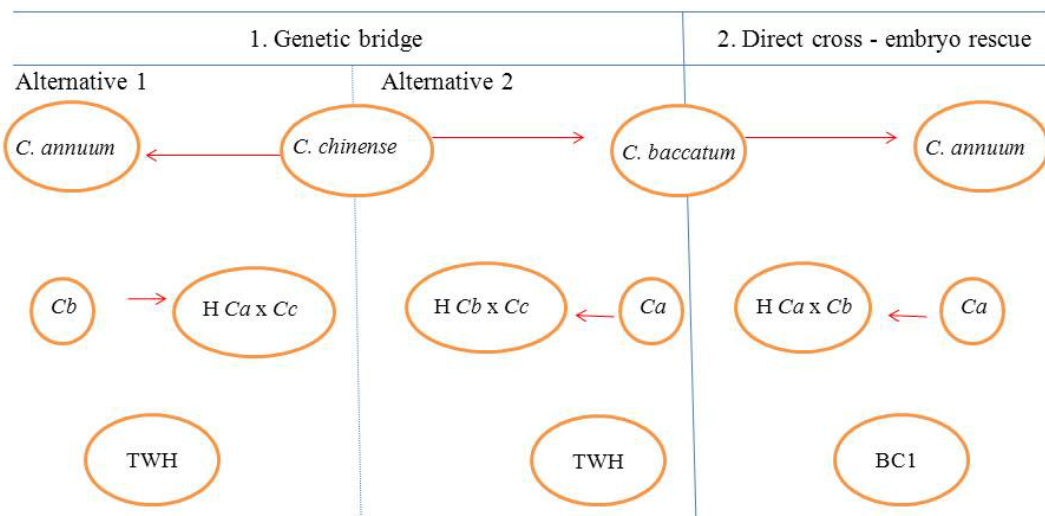


Fig. 6. Diagram recommended by us to transfer genes between different species of *Capsicum*. Arrows point in direction to female parents. H= Hybrid, Ca= *C. annuum*, Cb= *C. baccatum*, Cc= *C. chinense*, BC1= Back cross 1, TWH= Three way hybrid.

## Acknowledgements

Juan P. Manzur thanks Universitat Politècnica de València for a research grant (2011-S2-4264, programa para la formación de personal investigador, FPI).

## REFERENCES

- Barbano, P.P., Topoleski, L.D., 1984. Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* *Lycopersicon peruvianum* ovules. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109, 95-100.
- Boiteux, L.S., Nagata, T., Dutra, W.P., Fonseca, M.E.N., 1993. Sources of resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. Euphytica 67, 89-94.
- Chen, L.Z., Adachi, T., 1996. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via 'embryo rescue' and *In vitro* propagation. Plant Breeding, 115, 251-256.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 1996. Peppers of the World: An identification Guide, Ten Speed Press, Berkeley.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 2009. The complete chile pepper book. Timber Press, Portland.
- González-Salán, M.M., Bosland, P.W., 1992. Sources of resistance to *Verticillium* wilt in *Capsicum*. Euphytica 59, 49-53.
- Hajjar, R., Hodgkin, T., 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. Euphytica 156, 1-13.
- Hannig, E., 1904. Zur Physiologie pflanzlicher embryonen. I. Über die kultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. Bot. Ztg. 62, 45-80.
- Inai, S., Ishikawa, K., Nunomura, O., Ikehashi, H., 1993. Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. Theor Appl Genet 87, 416-422.
- Jones, M.M., Black, L.L., 1992. Sources of Resistance among *Capsicum* spp. to *Fusarium* Wilt of Pepper, *Capsicum* Newsletter 11, 33-34.
- Laibach, F., 1925. Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früt absterbender Bastardembyonen. Zeitschar. Bot. 17, 417-459.

- Love, S.L., 1999. Founding clones, major contributing ancestors, and exotic progenitors of prominent north american potato cultivars. *Am. J. Potato Res.* 76, 263-272.
- Manzur, J.P., Penella, C., Rodríguez-Burruezo A., 2013a. Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae* (accepted paper).
- Manzur, J.P., Calvache-Asensio, M.N., Rodríguez-Burruezo A., 2013b. Effect of growth regulators and initial dark incubation on the *in vitro* culture efficiency of immature zygotic embryos from peppers (*Capsicum annuum*). *Scientia Agricola* (under review).
- Marinkovic, N., Aleksic, Z., Obradovic, A., Mijatovic, M., 1992. New pepper line resistant to *Verticillium* Wilt. Proceedings of VIIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, Roma, Italy. pp. 195-201.
- Matsunaga, H., Monma, S., 1995. Varietal differences in resistance to bacterial wilt in related species of *Capsicum annuum*. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 14, 60-61.
- McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbaugh, W.H., 1982. Early Evolution of Chili Peppers (*Capsicum*). *Economic Botany* 36, 361-368.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Hirai, M., 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breed.* 18, 157-169.
- Monnier, M., 1995. Culture of zygotic embryos, in: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-153.
- Muhyi, R., Bosland, P.W., 1995. Evaluation of *Capsicum* germplasm for sources of resistance to *Rhizoctonia solani*. *HortScience* 30, 341-342.
- Nuez, F., Gil-Ortega, R., Costa, J., 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundiprensa, Madrid.
- Park, S.K., Kim, S.B., Park, H.G., Yoon, J.B., 2009. *Capsicum* germplasm resistant to pepper anthracnose differentially interact with *Colletotrichum* isolates. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 50, 17-23.
- Pickersgill, B., 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution* 25, 683-691.
- Pickersgill, B., 1988. The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. *Biol. Zent.* BI. 107, 381-389.
- Pickersgill, B., 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96, 129-133.

- Rick, C.M., R.T., Chetelat., 1995. Utilization of related wild species for tomato improvement, First International Symposium on Solanaceae for Fresh Market. Acta Hort. 412, 21-38.
- Rodriguez–Riaño, T., Dafni, A., 2000. A new procedure to assess pollen viability. Sexual Plant Reproduction 12, 241-244.
- Ross, H., 1986. Potato breeding-problems and perspectives. Advances in Plant Breeding.
- Sharma, D.R., Kaur, R., Kumar, K., 1996. Embryo rescue in plants-a review. Euphytica 89, 325-337.
- Sharma, H.P., 2009. Plant Embryology: Classical and Experimental. Alpha Science Intl Ltd., USA.
- Subramanya, R., 1983. Transfer of genes for multiple flowers from *Capsicum chinense* to *Capsicum annuum*. HortScience 18, 747-749.
- Suzuki, K., Kuroda, T., Miura, Y., Murai, J., 2003. Screening and field trials of virus-resistant sources in *Capsicum* spp. Plant Disease 87, 779-783.
- Van Tuyl, J.M., De Jeu, M.J., 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Chapter13 In: Shivanna K.R., Sawhney V.K. (eds.), Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, Cambridge University Press, 273-293.
- Yang, D.C., 2001. Interspecific hybridization for the breeding of anthracnose-resistant hot Peppers lines. M.S thesis, Seoul National University, Korea.
- Yazawa S., Sato, T., Namiki, T., 1989. Interspecific Hybrid Dwarfism and Geographical Distribution of the Dwarfness Gene in *Capsicum*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 58, 609-618.
- Yazawa S., Sato T., Namiki, T. 1990. Dwarfism and a Virus-like Syndrome in Interspecific Hybrids of Genus *Capsicum*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 58, 935-943.
- Yoon, B., Park, H.G., 2005. Trispecies bridge crosses (*Capsicum annuum* x *C. chinense*) x *C. baccatum*, as an Alternative for Introgression of Anthracnose Resistance from *C. baccatum* into *C. annuum*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 46, 5-9.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G., 2006. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. Breed. Sci. 56, 31-38.



## **4. DISCUSIÓN GENERAL**



#### 4.1 Optimización del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros

En las actividades dirigidas a optimizar el cultivo de embriones inmaduros en los cuatro estadios de desarrollo (i.e. globular, corazón, torpedo, cotiledonar temprano), tanto para el acortamiento de ciclos generacionales como la hibridación interespecífica, se realizaron dos grandes bloques de ensayos. Por un lado, se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa y sales MS sobre una colección de genotipos que incluían a las cinco especies cultivadas del género *Capsicum*. Posteriormente, con la combinación sacarosa/MS más favorable se evaluó el efecto de diferentes niveles de una auxina – ácido indol-acético (AIA)– y una citoquinina –zeatina– sobre la germinación *in vitro* de embriones inmaduros de varios genotipos de *C. annuum*, representativos de diversos tipos varietales de esta especie (i.e. California Wonder, Bola, Guindilla y Piquillo). Adicionalmente, en este mismo experimento, se evaluó el efecto de la incubación en oscuridad durante un período de cinco días sobre el medio con la mejor combinación AIA/zeatina.

Los parámetros y dosis elegidas para la optimización del cultivo de embriones inmaduros fueron definidos en base a la información disponible en otras especies y, más escasa, en *Capsicum* (Monnier, 1995; Razdan, 2003; Yoon et al., 2006; Sharma, 2009). Para llevar a cabo todos los ensayos de optimización fue necesaria la extracción, la identificación del estadio, el cultivo y posterior seguimiento de un total de 3500 embriones, lo que involucró la disección de más de 5000 semillas inmaduras, para cubrir adecuadamente los diseños experimentales.

En términos generales, durante la extracción de los embriones se observó que su desarrollo no seguía un patrón excluyente, solapándose en la mayoría de los casos dos estadios de desarrollo en un mismo fruto (globular/corazón, corazón/torpedo o torpedo/cotiledonar) y en menos medida hasta tres. Asimismo, el estadio más avanzado siempre se hallaba en la zona distal del fruto. Esta distribución de estadios intrafruto coincide con la descrita en otra solanácea relacionada como el tomate (Berry y Bewley, 1992) y podría deberse a la mayor densidad de semillas presentes en la región proximal, lo que incrementaría la competencia por los nutrientes entre embriones y, consecuentemente, un desarrollo más lento (Lee, 1988; Gómez y Zamora, 2003) o, alternativamente, debido a que la fecundación se produce antes en la zona distal más cercana al estigma, donde germina el polen.

Por otra parte, también se encontraron diferencias entre especies y genotipos en la pauta del desarrollo de embriones, registrándose diferencias de diez o más días para un mismo estadio embrionario dependiendo de la accesión. Así, por ejemplo, los embriones de California Wonder y Bola (*C. annuum*) requirieron 27 días tras la polinización (DTP) para alcanzar el estadio torpedo, mientras que para embriones de *C. frutescens* (B-144) sólo fueron necesarios 16 DTP. En otras palabras, un mismo valor de DTP puede estar relacionado con diferentes estadios embrionarios según el genotipo o especie que se trate. Por estos motivos, en nuestra opinión y a diferencia de otros autores (Hossain et al., 2003), sugerimos que es más preciso identificar y utilizar el estadio embrionario para relacionarlo con la capacidad de germinación *in vitro* de embriones inmaduros que basarse en las meras estimas de DTP.

Otro importante aspecto que advertimos fue que un alto porcentaje de embriones germinados *in vitro* (alrededor del 50%), independiente del estadio embrionario, fueron incapaces de dirigir la radícula en la dirección de la gravedad, lo que indicó ausencia de gravitropismo. Por ello, fue necesario realizar una corrección de raíces hacia el medio a los 10-20 días, dependiendo del estadio embrionario, evitando la deshidratación e inanición de la plántula. Estos resultados sugieren que el gravitropismo puede perderse durante la germinación precoz *in vitro* de embriones en el género *Capsicum*.

Dentro de las actividades de optimización de niveles de sacarosa y MS, los análisis de la varianza revelaron un efecto significativo en todos los factores estudiados: genotipo, estadio embrionario y medio de cultivo. En este sentido, nuestro estudio demostró que la contribución a la variación observada y, en consecuencia, en la germinación de embriones *in vitro* depende en mayor medida del estadio embrionario, seguido por la composición del medio de cultivo y, finalmente, el genotipo. A este respecto, aunque otras técnicas de cultivo *in vitro*, como la micropropagación, presentan una importante influencia del genotipo en *Capsicum* (Kothari et al., 2010), en el caso de la germinación *in vitro* de embriones inmaduros, esta influencia ha sido menor. Por otra parte, independientemente del genotipo o estadio embrionario utilizado, el posterior desarrollo de las plántulas provenientes de cultivo de embriones inmaduros fue normal, por lo que, al contrario de otros casos descritos como en la cebada (Norstog y Klein, 1972), la germinación precoz no afectó a la morfología o fertilidad de las plantas en estado adulto.

Profundizando en los resultados obtenidos en este primer bloque de optimización, fue posible germinar *in vitro* y obtener plantas desarrolladas de las cinco especies estudiadas a partir de todos los estadios embrionarios, con la única excepción de los embriones globulares de *C. chinense*, para los cuales no fue posible siquiera germinarlos *in vitro*. De este modo, a pesar de ser considerado un género recalcitrante para el cultivo *in vitro* comparado a otras solanáceas como la patata, el tabaco o el tomate (Ochoa-Alejo y Ramirez-Malagón, 2001; Kothari et al., 2010), *Capsicum* muestra una eficiencia considerable cuando se trabaja con embriones inmaduros.

Respecto al estadio embrionario, encontramos que en los estadios inmaduros más avanzados (etapa autótrofa) las tasas de germinación fueron mayores que en el caso de embriones precoces (etapa heterótrofa), demostrando que los primeros son capaces de desarrollarse con más facilidad en medios simples, basados en sales minerales y sacarosa. Así, coincidiendo con otras especies (Monnier, 1995; Sharma, 2009), se observó un aumento gradual de la eficiencia promedio a medida que avanzaba el estadio embrionario: globular (5%), corazón (21%), torpedo (37%) y cotiledonar (69%).

En términos del efecto especie/genotipo, las accesiones de *C. chinense* y *C. baccatum* mostraron las tasas medias de germinación más bajas, con un rango promedio de 25% a 30%, mientras que *C. frutescens* y *C. pubescens* presentaron mayores tasas (38% y 51%, respectivamente). En el caso de *C. annum*, por su mayor variabilidad genética y genotipos representados, el rango de respuestas fue muy amplio (29-46%). El hecho de que *C. pubescens* mostrara las mayores tasas de eficiencia sugiere que el proceso de domesticación de *Capsicum* puede haber reducido la aptitud de estos materiales al cultivo *in vitro*, pues esta rara especie andina ha sufrido una domesticación menos intensa que el resto de las especies cultivadas (DeWitt y Bosland, 1996; Rodríguez-Burruezo et al., 2009). De hecho, Christopher y Rajam (1996) ya describieron una mejor respuesta al cultivo *in vitro* de la especie silvestre *C. praetermissum* en comparación a las cultivadas de *Capsicum*. De igual modo, las especies silvestres *S. peruvianum* y *S. chilense* mostraron mejores resultados en el cultivo *in vitro* que el tomate (Koorneef et al., 1993; Satoh et al., 2000).

Respecto a los medios de cultivo empleados, se observó que las dosis de sacarosa (4% y 8%) afectó notablemente a la eficiencia, mientras que el efecto de la dosis MS ( $1/2 \times MS$  y  $1 \times MS$ ) tuvo un efecto menor. Así, al contrario de las concentraciones de sacarosa recomendadas para la germinación *in vitro* de embriones

precoces de diversas especies, en torno a 8-12% (Ziebur y Brink, 1951; Norstog, 1961; Rijven, 1952; Rietsema et al., 1953; Veen, 1963; Monnier, 1976 y 1978; Fisher y Neuhaus, 1995), nosotros demostramos que niveles del 4% ofrecen la mejor respuesta a la germinación en todos los estadios evaluados, con una tasa media de germinación de 43% y especialmente en el estadio globular, en cuyo caso se logró la germinación de casi todas las accesiones, salvo *C. chinense*, con unas tasas de germinación comprendidas entre 8% y 25%. En el caso de las sales minerales, aunque la dosis 1×MS permitió germinar embriones globulares en más accesiones que  $\frac{1}{2}$ ×MS (6 v/s 4 accesiones), ésta última presentó una mayor tasa promedio de germinación considerando todos los estadios (48 v/s 38%). En consecuencia se decidió utilizar la formulación de sacarosa al 4% y sales minerales a  $\frac{1}{2}$ ×MS para continuar la optimización de medios.

Fijado estos parámetros, se evaluó el efecto de los reguladores de crecimiento AIA y zeatina sobre la germinación de embriones inmaduros de *C. annuum* en los cuatro estadios. Del mismo modo que el experimento previo, se detectaron diferencias significativas debidas al efecto de los niveles de estos reguladores, el estadio embrionario y el genotipo. Así, se observó que los reguladores a baja dosis (0,01 mg/L) permitieron las tasas medias más altas (33%), seguidos del medio en que estos reguladores estaban ausentes (24%). Por otra parte, se observó que estos reguladores a altas dosis (0,2 mg/L) afectaron negativamente a las tasas de germinación, especialmente en el caso de la zeatina, con tasas extremadamente bajas, comprendidas entre 0% y 6% en todos los genotipos y estadio de desarrollo. En este sentido, nuestros resultados coinciden con la recomendación de Monnier (1995) de utilizar los reguladores de crecimiento en baja concentración, ya que las altas dosis conducirían a anomalías en el embrión. Por otra parte, en cebada y *Capsella bursa-pastoris* se ha descrito que el uso de reguladores de crecimiento favoreció sobre todo a los embriones precoces (Raghavan, 1964; Umbeck y Norstog, 1979).

En relación a los genotipos utilizados casi todos mostraron una mejor respuesta en el medio con los reguladores a bajas dosis, salvo Guindilla que obtuvo la mejor germinación en el medio sin reguladores. Esta respuesta estaría relacionada con el efecto genotipo, donde no todas las accesiones responden del mismo modo a una determinada composición de medio. Sin embargo, dado que la diferencia no fue

excesivamente alta (28% frente a 17%), hemos decidido seguir adelante utilizando el medio con bajos niveles de hormonas.

Finalmente, trabajando sobre el medio con bajos niveles (0,01 mg/L) de AIA y zeatina, la incubación en oscuridad durante un período de cinco días mostró ser un factor positivo en la eficiencia de la germinación *in vitro* de embriones de pimiento (*C. annuum*). En especial en el estadio más temprano y problemático, el globular, en el que la tasa de germinación media aumentó de un 3% a un 22%, alcanzando un 47% en el caso concreto de la accesión Guindilla. También se registraron incrementos notables, aunque menores, en el estadio corazón (17% al 27%), torpedo (52% al 65%) y cotiledonar (60% al 68%). Este hallazgo coincide con resultados descritos en embriones de lino y cebada, donde unos días de incubación inicial en oscuridad permitieron un aumento en las tasas de eficiencia (Razdan, 2003).

Si bien una tasa de germinación media en embriones globulares del 22%, puede parecer baja, realmente debe ser considerada un éxito pues, se trata de la primera descripción de este hecho en el género *Capsicum*. Adicionalmente, como se ha mencionado, algunos genotipos pueden llegar alcanzar tasas del 47%. Por ello estos resultados son de gran interés para aquellos mejoradores interesados en la consecución de cruces interespecíficos en *Capsicum* afectados por aborto embrionario, pues este puede ocurrir en un estadio extremadamente precoz según los genotipos implicados. En consecuencia, nuestros resultados abren la puerta a la posibilidad de recuperar embriones interespecíficos en cualquier estadio embrionario.

## **4.2 Consecución de la hibridación interespecífica *C. annuum* × *C. baccatum* mediante rescate de embriones y cruce puente genético con *C. chinense* y *C. frutescens***

En la presente tesis doctoral, en paralelo a la optimización del cultivo de embriones se ha evaluado su principal aplicación: el rescate de embriones interespecíficos problemáticos. En este sentido, una de las principales barreras postcigóticas descrita en cruces interespecíficos e intergenéricos de diversos cultivos es el aborto prematuro del embrión (Razdan, 2003). El principal caso en el que este fenómeno tiene lugar en el género *Capsicum* es el del cruzamiento entre el pimiento común *C. annuum* y la especie andina *C. baccatum*. Precisamente, esta última especie se ha mostrado como una fuente de interés para numerosos genes de resistencia a plagas y enfermedades (González-Salán y Bosland, 1992; Jones y Black, 1992; Marinkovic et al., 1992; Boiteux et al., 1993; Matsunaga y Monma, 1995; Muhyi y Bosland, 1995; Suzuki, 2003; Park et al., 2009), por lo que el desarrollo y optimización de protocolos que faciliten la hibridación de ambas especies es de gran relevancia para los mejoradores de pimiento. Asimismo, otra alternativa para sobrepasar este tipo de barrera es utilizar una especie intermedia filogenéticamente que actúe como un puente genético. Por todo ello, en el presente bloque de experimentos se propuso evaluar ambas estrategias y hacer un estudio comparativo de sus ventajas e inconvenientes. Asimismo, el propio procedimiento del cruce puente nos permitió valorar y revisar las incompatibilidades o problemas que pueden surgir en cruzamientos de *C. annuum* o *C. baccatum* con *C. chinense* o *C. frutescens*. Este bloque experimental se realizó utilizando un total de 18 accesiones de las cuatro especies mencionadas: *C. annuum* (12), *C. baccatum* (3), *C. chinense* (2) y *C. frutescens* (1), con las cuales se realizaron casi 3000 operaciones de hibridación durante tres temporadas (años 2010, 2011 y 2012) en distintos niveles generacionales e implicando los dos sentidos de cada cruzamiento.

En el caso del cruce directo *C. annuum* (12) × *C. baccatum* (3) se intentó conseguir un total de 36 combinaciones híbridas y en ambos sentidos, totalizando 2500 operaciones de hibridación. Dado que el aborto en los embriones híbridos entre estas especies ocurría en un estadio inmaduro avanzado (cotiledonar temprano), el rescate se llevó a cabo en embriones en el intervalo de estadios torpedo-cotiledonar temprano, por



ofrecer mayor eficiencia que los más tempranos, aproximadamente a los 40 días tras polinización (DTP).

Por otra parte, en el caso del cruce puente genético empleando *C. chinense*, se utilizaron dos vías. La primera vía consistió en cruzar *C. annuum* (12) con *C. chinense* (2), para finalmente obtener el híbrido a tres vías cruzando con *C. baccatum*. En esta vía se intentó obtener un máximo de 24 combinaciones potenciales híbridas *C. annuum* × *C. chinense* y en ambos sentidos. Posteriormente, los materiales F1 obtenidos fueron hibridados en ambos sentidos con las accesiones de *C. baccatum* (2). La segunda vía consistió en realizar los cruzamientos en sentido inverso: cruzar *C. baccatum* (3) con *C. chinense* (2), para finalmente obtener el híbrido a tres vías cruzando con *C. annuum*. En esta vía se intentó obtener un máximo de 6 combinaciones potenciales híbridas *C. baccatum* × *C. chinense* en ambos sentidos y los materiales obtenidos fueron hibridados en ambos sentidos con las accesiones de *C. annuum* (12). Todos los híbridos obtenidos fueron confirmados mediante marcadores microsatélites desarrollados por Minamiyama et al. (2006) polimórficos para las cuatro especies. Asimismo, se evaluó la apariencia de los materiales híbridos que se iban obteniendo y su fertilidad, en base a estimas de viabilidad de polen mediante un test de actividad enzimática y biológica de tinción con tetrazolio (Rodríguez-Riaño y Dafni, 2000).

#### **4.2.1 Rescate de embriones interespecíficos *C. annuum* × *C. baccatum***

En relación al cruce directo entre *C. annuum* y *C. baccatum* con posterior rescate del embrión interespecífico, nuestros resultados muestran una mejor respuesta al utilizar a esta última especie como parental masculino. Así, utilizando este sentido del cruce se logró una proporción de 10 híbridos sobre las 36 posibles combinaciones, mientras que en el cruce recíproco sólo se lograron 2 de las 36. Esta baja proporción de híbridos obtenidos en este sentido del cruce, estaría asociada a un endurecimiento precoz del endospermo desfasado al desarrollo del embrión, que advertimos durante la escisión. Este fenómeno deformaba a los embriones inmaduros y dificultó su rescate, reduciendo la eficiencia de esta técnica.

Profundizando en el cruce *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂), la germinación *in vitro* fue variable, siendo alta (aproximadamente 50%) en híbridos cuyos parentales

femeninos fueron las accesiones Bierzo, Bola y PBC716. En todo caso la apariencia de los materiales híbridos al alcanzar el estado adulto fue normal. En relación a la viabilidad biológica del polen de los materiales híbridos, ésta fue considerablemente baja (inferior al 20%) en comparación a sus parentales (80-90%), coincidiendo con otros autores (Dumas de Vaulx y Pitrat, 1977; Egawa y Tanaka, 1986; Kumar et al., 1987; Yoon et al., 2006). Sin embargo, posteriormente pudimos obtener la generación BC1 sin acudir al rescate de embriones, utilizando al híbrido como parental femenino. El material BC1 presentó unas tasas de germinación *in vivo* de 44-50% y una viabilidad del polen de hasta un 91%. Por el contrario, aunque el cruce recíproco *C. baccatum* (♀) × *C. annuum* (♂) dio híbridos con viabilidad de polen algo mayor (21-33%), la obtención de la generación BC1 no fue posible mediante cruzamientos convencionales.

Por todo lo anteriormente expuesto, es obvio que el endurecimiento prematuro del endospermo que se produce en cruces *C. baccatum* (♀) × *C. annuum* (♂), complica la extracción del embrión y provoca un bajo rendimiento en la recuperación de híbridos. Posteriormente, también encontramos la imposibilidad de conseguir la BC1 mediante cruzamiento. Por todo ello, es más conveniente trabajar con el cruce entre *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂) con posterior rescate de embrión.

#### 4.2.2 Cruce puente genético

En el caso del puente genético, se eligieron las especies evolutivamente intermedias, *C. chinense* y *C. frutescens*. A pesar de que diversos autores han descrito que la cruzabilidad dentro del complejo *annuum* (*C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*) es relativamente fácil, nuestros resultados muestran algunas dificultades a este nivel de cruzamientos.

##### 4.2.2.1 Puente genético: *C. chinense*

Para obtener el híbrido a tres vías, realizando el primer cruce entre *C. annuum* y *C. chinense*, nuestros resultados mostraron que emplear *C. chinense* como parental femenino permitía obtener frutos con semillas en 16 de 24 posibles combinaciones *C. chinense* (♀) × *C. annuum* (♂). Sin embargo, las semillas de tan sólo 4 de estas 16

combinaciones germinaron y todos los individuos híbridos obtenidos presentaron hojas filiformes, acortamiento de entrenudos y escaso desarrollo vegetal, lo cual impidió que las plantas híbridas llegasen a floración y fueran fértiles. Tras los análisis pertinentes que descartaron las virosis más comunes, se inició una búsqueda exhaustiva de la manifestación de anomalías similares a virosis en *Capsicum* y solanáceas relacionadas. Tras identificar la similitud de nuestros síntomas con los descritos por Pickersgill (1971) en el cruce *C. frutescens* (♀) × *C. baccatum* (♂) se llegó a la conclusión de que se trataba del síndrome similar a virosis (SSV) motivado por la interacción de genes citoplasmáticos de una especie (*C. chinense*) con los nucleares de otra (*C. annuum*) (Casali y Couto, 1984; González de León, 1986; Yazawa et al. 1990; Bapa Rao et al., 1992).

Por el contrario, en el cruce recíproco *C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂), si bien el número de combinaciones que presentaron fruto con semilla fue menor (10 de 24), la germinación de las semillas fue similar (4 de 10) y todos los híbridos conseguidos presentaron una apariencia normal, con una viabilidad del polen de 17 a 31%, manifiestamente menor que la de sus respectivos parentales (>80%) y, similar a lo observado en los híbridos *C. annuum* (♀) × *C. baccatum* (♂), de padres más alejados filogenéticamente. Esta disminución de la viabilidad de polen en híbridos interespecíficos del género *Capsicum*, frente a los parentales, ha sido descrita por otros autores (Casali y Couto, 1984; Egawa y Tanaka, 1986; Bapa Rao et al., 1992; Cheng et al., 2007), siendo la segunda barrera postcigótica en importancia después del aborto de embrión. No obstante, al tratarse de una disminución de la viabilidad de polen sin llegar a la infertilidad, para superarla bastaría con aplicar 1-2 retrocruces que permiten recuperar el fondo genético y la fertilidad de los gametos (Pratt et al., 1985). En cualquier caso, los resultados hallados aconsejan emplear siempre a *C. chinense* como parental masculino en el cruce entre *C. annuum* y *C. chinense*.

Finalmente, una vez conseguidos los híbridos *C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂), se realizó y evaluó su cruzabilidad con *C. baccatum* para conseguir el híbrido a tres vías. En este sentido, encontramos una mejor respuesta al utilizar el híbrido *C. annuum* × *C. chinense* como parental femenino, logrando híbridos a tres vías en 6 de 8 potenciales combinaciones (4 híbridos *C. annuum* × *C. chinense* con 2 accesiones *C. baccatum*) frente a 1 de 8 combinaciones en el caso de utilizarlo como parental masculino. Con respecto a la viabilidad del polen, todos los híbridos a tres vías

obtenidos mostraron un porcentaje muy variable, con un rango comprendido entre el 4 y el 83% dependiendo de la combinación híbrida involucrada, destacando los híbridos basados en Bola × Ají Panca como parental femenino. Por todo lo expuesto, mediante esta vía recomendamos la siguiente estructura para conseguir el híbrido a tres vías y transferir genes entre estas especies: [*C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. baccatum* (♂).

Respecto a la vía alternativa de realizar el primer cruce entre *C. baccatum* y *C. chinense*, para luego hibridar con *C. annuum* y conseguir así el híbrido a tres vías, nuestros resultados muestran, como en el caso anterior, que utilizar *C. chinense* como parental femenino, también provoca SSV en híbridos *C. chinense* (♀) × *C. baccatum* (♂). Así, aunque se obtuvieron híbridos en 5 de 6 combinaciones, este hecho impidió completar el híbrido a tres vías. Estos datos confirman los resultados de otros autores utilizando estas mismas especies (Yazawa et al. 1990; Inai et al., 1993) y ahora puede hacerse extensible a cualquier combinación de genotipos *C. chinense* × *C. baccatum*. Por el contrario, al utilizar a *C. chinense* como parental masculino conseguimos híbridos con buena apariencia y polen relativamente fértil (19-33%) en casi todas las combinaciones, salvo con la accesión Ají amarillo de *C. baccatum*. Por todo ello, en el cruce entre *C. baccatum* y *C. chinense* nuestros resultados sugieren utilizar a esta última como parental masculino.

Una vez conseguidos los materiales *C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂), se procedió a realizar y evaluar la hibridación con *C. annuum* para conseguir el híbrido a tres vías. En este sentido, encontramos una mejor respuesta al utilizar los híbridos *C. baccatum* × *C. chinense* como parental femenino, logrando híbridos a tres vías en 15 de 48 potenciales combinaciones (4 híbridos *C. baccatum* × *C. chinense* con las 12 accesiones de *C. annuum*), con dos accesiones androestériles y las trece restantes con una viabilidad del polen comprendida entre el 10% y el 94%, frente a 1 de 48 combinaciones con baja viabilidad de polen (3%) en el caso de utilizarlo como parental masculino. Así, mediante esta vía nosotros recomendamos la siguiente estructura para conseguir el híbrido a tres vías y transferir genes entre estas especies: [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂).

En términos generales, al comparar ambas vías, se aprecia que con la primera [*C. annuum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. baccatum* (♂), obtuvimos 6 híbridos a tres

vías con viabilidad de polen variable (4-83%), mientras que en la segunda [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂), obtuvimos 13 híbridos a tres vías con viabilidad de polen de hasta un 94%. En consecuencia, de cara a la transferencia de genes desde *C. baccatum* hacia *C. annuum* mediante la estrategia del puente genético, es recomendable utilizar la segunda vía, salvo que el carácter sea complejo de cribar o que no se disponga de marcadores moleculares, ya que esta vía podría involucrar un primer cribado en los híbridos *C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂). No obstante, Yoon y Park (2005) obtuvieron híbridos a tres vías utilizando nuestra primera vía, y coincidiendo con nuestros resultados, encontraron baja viabilidad de polen. Sin embargo, la pudieron superar mediante la autofecundación del híbrido a tres vías, por lo que tampoco debe necesariamente descartarse esta vía.

#### 4.2.2.2 Puente genético: *C. frutescens*

Por lo que respecta a utilizar *C. frutescens* como puente genético, no fue posible obtener híbridos a tres vías. Así, aunque en el cruce *C. annuum* (♀) × *C. frutescens* (♂), se obtuvieron frutos con semillas en la mayoría de las combinaciones, éstas semillas híbridas fueron incapaces de germinar. En contraste, el cruce recíproco *C. frutescens* (♀) × *C. annuum* (♂) permitió germinar semillas en 4 de las 12 posibles combinaciones, pero las plántulas híbridas mostraron síntomas de enanismo, lo cual impidió que llegasen a florecer. En este sentido, Yazawa et al. (1989 y 1990), concluyeron que este fenotipo estaría controlado por dos genes dominantes complementarios. Así, probablemente nuestra accesión de *C. frutescens* tendría genotipo AAbb y las accesiones de *C. annuum* empleadas tendrían el genotipo complementario aaBB. De este modo, aunque se podría evaluar un número mayor de accesiones *C. frutescens* para profundizar en su potencialidad como puente genético, tanto nuestros resultados como los de Yazawa et al. (1989 y 1990) no invitan al optimismo con esta especie.

En el cruce entre *C. baccatum* (♀) × *C. frutescens* (♂), aunque conseguimos frutos en una de las tres posibles combinaciones, las semillas no germinaron. Alternativamente, en el cruce recíproco *C. frutescens* (♀) × *C. baccatum* (♂), los híbridos conseguidos en las tres potenciales combinaciones mostraron SSV, concluyendo que al igual que *C. chinense*, *C. frutescens* poseería genes de incompatibilidad en su citoplasma que se manifiestan al cruzarlos con *C. baccatum*.

En conclusión a todo lo descrito anteriormente, parece razonable utilizar en primera instancia a *C. chinense* como puente genético entre las especies *C. annuum* y *C. baccatum*, prestando especial atención al sentido de los cruces realizados, y descartamos la utilización de *C. frutescens* como puente genético, debido a los problemas de obtención de semillas viables, ya sea por falta de germinación en los cruces en los que participa como parental masculino, como por anomalías (enanismos y SSV) en su empleo como parental femenino. Asimismo, hay que prestar especial atención a la forma en que se planifica el puente genético *C. annuum* - *C. chinense* - *C. baccatum*, para evitar problemas de eficiencia en la obtención de materiales híbridos y/o la aparición de fenómenos deletéreos o infertilidad, siendo aconsejable la combinación: [*C. baccatum* (♀) × *C. chinense* (♂)] (♀) × *C. annuum* (♂).

### **4.3 Evaluación del acortamiento de ciclo generacional, mediante el cultivo de embriones, en pimiento**

Otra importante aplicación colateral del cultivo *in vitro* de embriones es acortar el ciclo generacional de un cultivo para acelerar los programas de mejora. Para este fin se concibió un experimento exhaustivo utilizando cinco genotipos de *C. annuum* (California Wonder rojo y amarillo, Bola, Guindilla y Piquillo) en los cuales se registró y comparó, bajo las condiciones de los ciclos de cultivo de Otoño-Invierno y Primavera-Verano en la zona Mediterránea, el número de días requeridos para completar una generación mediante la siembra y cultivo *in vitro* de embriones inmaduros procedentes de frutos al principio de su desarrollo frente a la metodología convencional. En ambos casos, se consideraron las siguientes fases sucesivas: i) desde polinización a siembra convencional/cultivo de embriones (fase 1), ii) desde siembra convencional/cultivo de embriones a cuatro hojas verdaderas (fase 2) y iii) desde cuatro hojas verdaderas al inicio de la floración (fase 3). En el caso de la metodología convencional, la fase 1 implicaba dejar los frutos hasta su plena madurez para extraer las semillas y sembrarlas, mientras que en el caso del cultivo de embriones, los frutos inmaduros se cosecharon en el momento de disponer embriones inmaduros en estadios avanzados (torpedocotiledonar temprano) entre 20 a 40 días tras polinización (DTP), dependiendo del ciclo y el genotipo. La elección de los estadios embrionarios avanzados se debió a que, por lo visto en apartados anteriores, estadios más precoces poseen una baja tasas de

germinación *in vitro*, dificultando el completar los diseños experimentales. Además esto sólo permitiría ganar 5-10 días, no presentando una gran utilidad. Adicionalmente, en todas las accesiones se evaluó la tasa de germinación, altura, biomasa y viabilidad del polen mediante test enzimático de tetrazolio (Rodríguez-Riaño y Dafni, 2000), con el fin de comparar la estrategia *in vitro* frente a la convencional en términos de caracteres de desarrollo y fertilidad de las plantas, para, de este modo, confirmar (o descartar) potenciales efectos negativos de la germinación precoz (*in vitro*).

#### 4.3.1 Ciclo de Otoño-Invierno

En el caso del pimiento, durante el ciclo de Otoño-Invierno (OI), encontramos que las accesiones evaluadas requirieron entre 148 y 184 días tras polinización (DTP) en completar el ciclo generacional mediante el método convencional. En este sentido, las accesiones California Wonder y Bola, fueron las que requirieron el mayor tiempo, mientras que Guindilla y Piquillo cubrieron su ciclo en el menor tiempo. Así, en el caso de las accesiones California Wonder el tiempo requerido durante la fase 1 (polinización-siembra) fue más de la mitad del ciclo generacional. Ello podría estar relacionado con la alta biomasa que presentan sus frutos (tamaño de fruto, grosor de pericarpio), lo que conllevaría una tasa de crecimiento más lenta en comparación con frutos de tamaño y/o grosor medio o pequeño (Owen y Aung, 1990; Wubs et al., 2012). Por otra parte, el tiempo requerido en la fase 2 (siembra-cuatro hojas verdaderas) fue más uniforme (30-40 días), salvo en Guindilla que requirió más de 50 días. Finalmente, en la fase 3 (cuatro hojas verdaderas-antesis), Guindilla y California Wonder rojo y amarillo requirieron aproximadamente 30 días, mientras que Piquillo y, particularmente, Bola necesitaron unos 50 días. Estas diferencias entre genotipos para iniciar la floración han sido descritas también en otras especies como algodón y tomate (Gebologlu et al., 2011; Wang et al. 2011) y serían debidas a diferentes requerimientos climáticos entre los genotipos empleados (e.g. temperatura, iluminación).

En comparación, el cultivo de embriones en este ciclo OI permitió acortar el ciclo generacional en todas las accesiones estudiadas. Así, la duración del ciclo total se redujo a un rango de 96 a 133 DTP en Guindilla y Bola, respectivamente. La mayor eficiencia en acortar el ciclo se consiguió con las accesiones de California Wonder, ganando 60-70 días por generación (35-40% de reducción) frente al método

convencional. Estos resultados son de gran interés dado que en España y Europa los pimientos tipo California son los tipos varietales de mayor importancia económica, por lo que compañías de semillas y centros de investigación dedican los mayores esfuerzos en mejorarlos (Marín, 2012). En comparación, el resto de las accesiones mostraron ganancias de 33 días en el caso de Bola y 45-50 días en Guindilla y Piquillo. En general, las ganancias logradas en pimiento fueron ligeramente inferiores a las descritas en tomate por otros autores (Bhattarai et al., 2009; Gebologlu et al., 2011), debido probablemente a la tasa de crecimiento más alta de esta última especie. Dentro de esta estrategia, el tiempo requerido tanto para la fase 1 (30-40 DTP) como para la fase 2 (40-50 días) fue bastante uniforme entre accesiones. Mientras que, al igual que en la estrategia convencional, el tiempo requerido durante la fase 3 fue más variable, estando comprendida entre 20 y 47 días en Guindilla y Bola, respectivamente. Así, las diferencias en eficiencia entre accesiones dentro del método de cultivo de embriones en ciclo OI serían principalmente explicadas por el tiempo requerido entre el estadio de cuatro hojas verdaderas y la antesis.

#### **4.3.2 Ciclo de Primavera-Verano**

Al igual que en el ciclo OI, también en el ciclo Primavera-Verano (PV) encontramos diferencias entre accesiones en la duración del ciclo convencional. Así, el menor período de tiempo se registró en las accesiones Guindilla y Piquillo con aproximadamente 115 días, frente a Bola que requirió unos 154 días. Las accesiones California Wonder presentaron valores intermedios. En todos los casos, la duración del ciclo convencional PV fue inferior al homólogo OI, lo que puede atribuirse a las condiciones de luz y temperatura de PV, pues presenta condiciones más favorables para el cultivo del pimiento (Nuez et al., 2003; Wubs et al., 2012). No obstante, el grado de las diferencias varió entre accesiones. Así por ejemplo, California Wonder rojo cubrió el ciclo PV en 56 días menos que bajo OI, mientras que esta diferencia fue de sólo 13 días en Bola. Con respecto a las fases del ciclo, en todas ellas se encontraron diferencias significativas entre accesiones, especialmente en la fase 3. Finalmente, al igual que Bhattarai et al. (2009) en tomate, la mayoría de fases fueron más cortas en el ciclo PV, especialmente en la fase 1 (e.g. 45 días menos en California Wonder rojo).



Debido al rápido desarrollado mostrado durante el ciclo PV, el acortamiento de ciclo generacional mediante el cultivo de embriones fue menor al registrado en el ciclo OI, por lo cual esta técnica mostró una mayor eficiencia en esta última temporada. A modo de ejemplo, el acortamiento promedio de las cinco accesiones evaluadas durante el ciclo OI fue de 51 días, mientras que el ciclo PV fue de 29 días.

#### 4.3.3 Implicaciones para la mejora

En todo caso, nuestro estudio demostró que en pimiento se puede realizar un máximo de dos generaciones al año mediante la metodología convencional. Así, a pesar de desarrollarse bajo condiciones mediterráneas e invernadero, la suma de los ciclos convencionales OI + PV ascendió a un rango de 264 y 321 días de Guindilla y Bola, respectivamente. Estos datos son similares a los encontrados en tomate (Ochatt et al., 2002). Frente a ello, el cultivo de embriones permitió acortar la suma de los ciclos OI + PV a un rango de 183 y 240 días para las accesiones previamente mencionadas. Este hecho posibilitaría a los mejoradores alcanzar al menos tres generaciones por año en *C. annuum*, incluidas las accesiones California Wonder, y hasta cuatro generaciones en Guindilla. De este modo, esta técnica permitiría desarrollar programas de mejora que requieran F8-F10 en dos o tres años.

Respecto al desarrollo de las plántulas, en ambas temporadas, las tasas de germinación de embriones *in vitro* de las distintas accesiones fue similar o incluso mayor que las registradas en siembra convencional. Esto se debe en gran medida a los trabajos previos de optimización (apartado 4.1) en los cuales establecimos: i) un medio mejorado, ii) el estadio más adecuado para la extracción de embriones (torpedo o cotiledonar temprano), y iii) una experiencia en la técnica y aclimatación de las plantas. Así, frente a unas tasas de germinación para la siembra convencional comprendidas entre 31% y 100% de California Wonder rojo y Bola en OI y 36% y 67% de Bola y Piquillo en PV, los rangos de germinación para la siembra *in vitro* fueron del 51% al 87% en Piquillo y California Wonder amarillo en OI y del 47% al 81% en California Wonder rojo y Bola en PV.

Por otra parte, con la única excepción de Bola, no se detectaron diferencias significativas en ningún genotipo para la altura y biomasa entre ambos métodos durante

el ciclo PV. Sin embargo, durante el ciclo OI si se observaron diferencias significativas entre métodos en todas las accesiones estudiadas. En este sentido, casi todas las accesiones provenientes del cultivo de embriones mostraron menores estimas de altura y biomasa. Esto se explicaría debido a que las plántulas provenientes del cultivo de embriones tardaron menos en completar la fase 1, pues su aislamiento y siembra *in vitro* se realizó durante Diciembre-Enero. En cambio, la siembra del método convencional se realizó durante Febrero-Marzo, cuando los frutos habían madurado completamente, por lo que el desarrollo de estas plantas se produjo bajo unas condiciones de luz y temperatura más favorables para el pimiento. Finalmente, la viabilidad del polen fue similar entre ambas estrategias en el ciclo PV, pero se observaron diferencias significativas en el ciclo OI, a favor del método de cultivo de embriones, en casi todas las accesiones. Del mismo modo que en altura y biomasa, estas diferencias serían debidas muy probablemente a que las plantas provenientes del método tradicional florecieron avanzado el verano, con una exposición más prolongada a temperaturas iguales o superiores a 30°C, lo cual afectaría negativamente a la viabilidad del polen del pimiento (Quagliotti, 1979; Bosland y Votava, 2000). Todo lo expuesto muestra que el cultivo de embriones no afecta la viabilidad del polen, por lo que puede ser utilizado sin problemas de desarrollo posterior o fertilidad en los programas de mejora del pimiento.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. Conclusiones

1.- Se consiguió optimizar un medio de cultivo para germinar *in vitro* embriones inmaduros de pimientos, chiles y ajíes (*Capsicum* spp.). Esta optimización basada en concentración de sales minerales MS, sacarosa y reguladores del crecimiento ha permitido mejorar notablemente las tasas de germinación *in vitro*, siendo el primer trabajo en el que se logra la germinación de embriones en estadio globular, los más inmaduros y delicados. Estas tasas de eficiencia han podido ser incrementadas aún más mediante un tratamiento de incubación inicial de cinco días en oscuridad, en especial en los estadios más precoces (globular y corazón).

2.- Se evaluó la respuesta al cultivo de embriones de las cinco especies domesticadas del género *Capsicum*, encontrando que las especies que han experimentado el proceso de domesticación menos intenso, *C. frutescens* (38%) y, en especial, *C. pubescens* (51%), mostraron altas tasas de germinación *in vitro*, mientras que *C. chinense* o *C. baccatum* tuvieron menores tasas (25-30%).

3.- Coincidiendo con otros géneros, se demostró que el cultivo de embriones en las especies domesticadas del género *Capsicum* presentó un aumento gradual de la eficiencia a medida que avanzaba el estadio embrionario: globular (5%), corazón (21%), torpedo (37%) y cotiledonar (69%).

4.- Respecto a facilitar la transferencia de material genético de interés desde *C. baccatum* a *C. annuum*, se han validado dos estrategias que permitieron superar la barrera del aborto embrionario: el cruce puente genético y el cruce directo entre *C. annuum* y *C. baccatum* combinado con rescate *in vitro* del embrión inmaduro. Con respecto a la primera estrategia, se ha establecido a *C. chinense* como una buena especie puente, mientras que se ha descartado a *C. frutescens* por su baja cruzabilidad con *C. annuum* y/o *C. baccatum* y las anomalías de los híbridos obtenidos. Así, se han evaluado diversos esquemas de cruzamiento para la consecución de híbridos puente,

destacando, por el número de combinaciones obtenidas y la viabilidad de polen de los híbridos puente, el siguiente esquema:  $[(C. \textit{baccatum} (\text{♀}) \times C. \textit{chinense} (\text{♂})] (\text{♀}) \times C. \textit{annuum} (\text{♂})$ .

5.- Relacionado con lo anterior, se observó una marcada influencia del sentido de los cruces en la obtención de híbridos interespecíficos viables. Así, en el caso de los cruces  $C. \textit{chinense} (\text{♀}) \times C. \textit{baccatum} (\text{♂})$  y  $C. \textit{chinense} (\text{♀}) \times C. \textit{annuum} (\text{♂})$ , la totalidad de los híbridos mostraron síndrome similar a virosis (SSV), producto de una interacción de genes citoplasmáticos de *C. chinense* con los nucleares de las otras dos especies. Por otra parte, los híbridos del cruce  $C. \textit{frutescens} (\text{♀}) \times C. \textit{annuum} (\text{♂})$  mostraron enanismo, producto de dos genes dominantes complementarios, y los del cruce  $C. \textit{frutescens} (\text{♀}) \times C. \textit{baccatum} (\text{♂})$  mostraron SSV. El resto de combinaciones utilizando a *C. frutescens* no consiguieron siquiera germinar.

6.- Por lo que respecta a la estrategia del cruce directo entre *C. annuum* y *C. baccatum* combinado con rescate *in vitro* de embriones, el empleo de *C. baccatum* como parental femenino provocaba un endurecimiento prematuro del endospermo, lo cual complicaba la extracción del embrión y en consecuencia daba una eficiencia muy baja. Todo ello daba lugar a obtener muy pocos individuos híbridos e imposibilitaba la consecución de generaciones BC1. Por el contrario, el cruce  $C. \textit{annuum} (\text{♀}) \times C. \textit{baccatum} (\text{♂})$  ofreció una eficiencia considerable, con un alto número de híbridos interespecíficos y varias poblaciones BC1.

7.- Debido a la alta influencia de los genotipos implicados para transferir material genético desde *C. baccatum* a *C. annuum* se sugiere que, si se dispone de infraestructura y personal cualificado, utilizar tanto el cruce puente genético como el cruce directo con rescate de embriones, respetando el sentido y estructura de los cruces establecidos anteriormente y, en lo posible, utilizando las accesiones más eficientes identificadas en este estudio.

8.- Finalmente, se demostró que mediante el cultivo de embriones es posible incrementar el número de ciclos generacionales en pimiento de dos al año a tres o hasta cuatro al año, lo cual ofrece la posibilidad de reducir en los programas de mejora el tiempo requerido para fijación de líneas F8-F10 de cuatro o cinco años a tan sólo dos o tres.

9.- Como conclusión general, se ha logrado optimizar la técnica del cultivo de embriones inmaduros de pimiento, a la vez que se ha validado esta técnica en dos importantes aplicaciones directas de mejora vegetal, como son la hibridación interespecífica y el acortamiento de ciclo generacional, dejando disponible para los mejoradores de pimiento una información de gran utilidad para el desarrollo de sus programas de mejora.





## **6. BIBLIOGRAFÍA**



- Bapa Rao, N., Sri Valli, T., Lakshmi, N., 1992. Cytogenetic studies on the interspecific hybrid *Capsicum baccatum* L. - *C. frutescens* L. and its progeny. *Euphytica* 59, 135-140.
- Becerra, C.M., 2006. Genes implicados en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana* L.: caracterización de los genes At Ank Tm. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Bennici, A., Cionini, P.G., 1979. Cytokinins and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* 147, 27-29.
- Berry, T., Bewley, J.D., 1992. A role for the surrounding fruit tissues in preventing the germination of tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds. *Plant Physiol.* 100, 951-957.
- Bhattarai, S.P., De La Pena, R.C., Midmore, D.J., Palchamy, K., 2009. *In vitro* culture of immature seed for rapid generation advancement in tomato. *Euphytica*, 167, 23-30.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K., 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier, Amsterdam.
- Black, L.L., Green, S.K., Hartman, G.L., Poulos, J.M., 1991. *Pepper Diseases- A Field Guide*. Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei (Taiwan).
- Blakeslee, A.F., 1945. Removing some of the barriers to crossability in plants. *Proc. Amer. Phi. Soc.* 89, 561-574.
- Blanco, E., Morales, R., 1990. Plantas cultivadas y drogas, intercambio entre dos mundos. En: Fernández Pérez, J., González Tascón J. (Eds.). *La Agricultura Viajera. Cultivos y manufacturas de plantas industriales y alimentarias en España y en la América Virreinal*. Real Jardín Botánico, Madrid, pp. 83-95.

- Boiteux, L.S., Nagata, T., Dutra, W.P., Fonseca, M.E.N., 1993. Sources of resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. *Euphytica* 67, 89-94.
- Bosland, P.W., Votava, E.J., 2000. Peppers: Vegetable and spice Capsicums. CABI Publishing, New York.
- Boukema, I.W., 1980. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L. *Euphytica* 29, 433-439.
- Brown, H.T., 1906. On the cultura of the excised embryos of barley on nutrient solutions containing nitrogen in different forms. *Trans. Guinness Res. Lab.* 1, 288-299.
- Brown, C.R., Adiwilaga, K.D., 1991. Use of rescue pollination to make a complex interspecific cross in potato. *American Potato Journal* 68, 813-820.
- Burghardtova, K., Tupy, J., 1980. Utilization of exogenous sugars by excised maize embryos in culture. *Biol. Plant.* 22, 57-64.
- Camadro, E.L., Carputo, D., Peloquin, S.J., 2004. Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear-cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 109, 1369-1376.
- Capron, A., Chatfield, S., Provart, N., Berleth. T., 2009. Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologist.
- Casali, V.W., Couto, F.A.A., 1984. Origem e botanica de *Capsicum*. *Informe Agropecuario Belo Horizonte*. 10, 8-10.
- Cheng, Z., Qian, C., Chen, X., Chen, J., 2007. Interspecific Hybridization and Identification of Hybrid in *Capsicum*. *Acta Horticulturae Sinica* 34, 883 – 888.

- Christopher, T., Rajam, M.V., 1996. Effect of genotype, explants and medium on *in vitro* regeneration of red pepper. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 46, 245-250.
- Cionini, P.G., Bennici, A., Alpi, A., D'Amato, F., 1976. Suspensor, gibberellins and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta* 131, 115-117.
- Consoli, D., Andolfi, A., Errico, A., Saccardo, F., 1992. Studies of incompatibility of interspecific crosses between *C. annuum* and different lines of *C. baccatum*. Meeting "Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant", Rome, Italy, pp. 254-259.
- Cravero, V., Cointy, E., 2007. Shortening the seed-to-seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. *Plant Breeding* 126, 222-224.
- Crosby, K.M., 2008. Pepper. En: Prohens, J., Nuez, F. (Eds.). *Vegetables II*. Springer, New York, NY, USA, pp. 221-248.
- Dagustu, N., Sincik, M., Bayram, G., Bayraktaroglu, M., 2010. Regeneration of fertile plants from sunflower (*Helianthus annuus* L.) – immature embryo. *Helia* 33, 95-102.
- Daubeze, A.M., Hennart, J.W., Palloix, A., 1995. Resistance to *Leveillula taurica* in pepper (*Capsicum annuum*) is oligogenically controlled and stable in Mediterranean regions. *Plant Breeding* 114, 327-332.
- Davey, M., Anthony, P., 2010. *Plant cell culture: essential methods*. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 1996. *Peppers of the World: An identification Guide*, Ten Speed Press, Berkeley.
- DeWitt, D., Bosland, P.W., 2009. *The complete chile pepper book*. Timber Press, Portland.

- Diamond, J.D., 1997. *Guns, Germs, and Steel: The Fates of Human Societies*. Norton, New York.
- Dietrich, K., 1924. Über Kultur von Embryonen ausserhalb des Samens. *Flora* 117, 379-298.
- Dumas de Vaulx, R., Pitrat, M., 1977. Croisement interespecific entre *Capsicum annuum* et *Capsicum baccatum*. IIIrd Eucarpia *Capsicum* Meeting. Avignon- Montfavet, pp. 75- 81.
- Egawa, Y., Tanaka, M., 1984. Cytogenetic relationship among three species of chili peppers, *Capsicum chinense*, *C. frutescens* and *C. baccatum*. *Jpn J Breed* 34, 50-56
- Egawa, Y., Tanaka, M., 1986. Cytogenetical study of the interspecific hybrid between *Capsicum annuum* and *C. baccatum*. *Jpn J Breed* 36, 16-21
- Emsweller, S.L., Stuart, N.W., 1948. Use of growth regulating substances to overcome incompatibilities in *Lilium*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 51, 581-589.
- Falusi, O.A., Morakinyo, J.A., 1994. Intra- and Interspecific Hybridization in the Genus *Capsicum*. *African Crop Science Journal* 2, 169-171.
- FAOSTAT. 2011. FAOSTAT Agriculture Data. FAO, Rome, Italy. Disponible en: <http://faostat.fao.org> (consultado en Febrero de 2013).
- Fery, R.L., Thies, J.A., 1998. PA-353, PA-398, and PA-426: Southern root-knot nematode-resistant *Capsicum chinense* Jacq. germplasm lines. *HortScience*. 33, 700-761.
- Fiore, M.C., Trabace, T., Sunseri, F., 1997 High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant cell reports* 16, 295-298.

- Fischer, C., Neuhaus, G., 1995. *In vitro* development of globular zygotic wheat embryos. *Plant Cell Rep.* 15, 186-191.
- Gaj, M.D., 2002. Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 37, 93-98.
- Gebologlu, N., Bozmaz, S., Aydın, M., Çakmak, P., 2011. The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *African Journal of Biotechnology* 10, 4895-4900.
- George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J., 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Gil Ortega, R., Barriuso, J., 1989. Realización de cruces interespecificos en el género *Capsicum*. Resultados preliminares. *Actas de Horticultura* 3, 95-102.
- Gómez, J.M., Zamora, R., 2003. Factors affecting intrafruit pattern of ovule abortion and seed production in *Hormathophylla spinosa* (Cruciferae). *Plant Syst. Evol.* 239, 215-229.
- González, J., 2003. The inheritance and genetic relationships of the resistance to *Phytophthora capsici* in two chile pepper (*Capsicum annuum*) genotypes. M.Sc. Thesis, Texas A&M University, College Station.
- González de León, R.D., 1986. Interestpecific Hybridization and the Cytogenetic Architecture of two Species of Chili pepper (*Capsicum-Solanaceae*). PhD thesis, Department of Agricultural Botany. University of Reading.
- González-Salán, M.M., Bosland, P.W., 1992. Sources of resistance to *Verticillium* wilt in *Capsicum*. *Euphytica* 59, 49-53.

- Gopalakrishnan, T.R., 2007. Vegetables Crops: Vol. 04. Horticulture Science Series. Ed. New India Publishing Agency.
- Greenleaf, W.H., 1956. Inheritance of resistance to tobacco etch virus in *Capsicum frutescens* and in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 46, 371-375.
- Greenleaf, H., 1986. Pepper Breeding. Edited by Mark J. Bassett. Vegetable Crops Department. University of Florida. Gainesville, Florida. AVI Publishing Company, INC., Westport, Connecticut.
- Griesbach, R.J., Bhat, R.N., 1990. Colchicine induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. *HortScience* 25, 1284-1286.
- Grube, R.C., Blauth, J.R., Arnedo, M.S., Caranta, C., Jahn, M.K., 2000. Identification and comparative mapping of a dominant potyvirus resistance gene cluster in *Capsicum*. *Theor. Appl. Genet.* 101, 852-859.
- Hajjar, R., Hodgkin, T., 2007. The use of wild relatives in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* 156, 1-13.
- Hamann, T., 2001. The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *J. Plant Growth Reg.* 20, 292-299.
- Hannig, E., 1904. Zur Physiologie pflanzlicher embryonen. I. Über die kultur von cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosacks. *Bot. Ztg.* 62, 45-80.
- Heiser, C.B. Jr., Smith, P.G., 1953. The cultivated *Capsicum* peppers. *Eco. Bot.* 7, 214-226.
- Hermesen, J.G., 1984. Some fundamental considerations on interspecific hybridization. *Iowa State Journal of Research* 58, 461-474.
- Holmes, F.O., 1937. Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in the pepper. *Phytopathology* 27, 637-642.



- Hossain, M.A., Minami, M., Nemoto, K., 2003. Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. *Jpn. J. Trop. Agr.* 47, 9-16.
- Howel, S.H., 1998. Molecular genetics of plant development. Cambridge. United Kingdom.
- Hu, C., Wang, P., 1986. Embryo culture: technique and applications. En: Evans, D. A., W. R. Sharp and P. V. Ammirato, (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. IV, Macmillan Publishing Co., New York, pp. 43-96.
- Inai, S., Ishikawa, K., Nunomura, O., Ikehashi, H., 1993. Genetic analysis of stunted growth by nuclear-cytoplasmic interaction in interspecific hybrids of *Capsicum* by using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87, 416-422.
- Inomata, N., 1979. Production of interspecific hybrid in *Brassica campestris* × *B. oleracea* by culture *in vitro* of excised ovaries. II. Development of excised ovaries on various media. *Jpn. J. Breed.*, 29, 115-120.
- Jones, M.M., Black, L.L., 1992. Sources of Resistance among *Capsicum* spp. to *Fusarium* Wilt of Pepper, *Capsicum Newsletter* 11, 33-34.
- Kaan, F., Anais, G., 1977. Breeding large fruited peppers (*Capsicum annuum* L.) in French West Indies for climatic adaptation, bacterial disease resistance (*Xanthomonas vesicatorie*, *Pseudomonas solanacearum*) and potato virus Y resistance. 3° congress EUCARPIA. *Genetique et Selction du Piment Avignon Montfavet*, pp. 265-273.
- Kameya, T., Hinata, K., 1970. Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. *Japan Journal of Breeding*, 20, 82-87.

- Kanoh, K., Hayashi, M., Serizawa, Y., Konishi, T., 1988. Production of interspecific hybrids between *Lilium longiflorum* and *Lilium elegance* by ovary slice culture. Japan. J. Breed. 38, 278-282.
- Kent, N., Brink, R.A., 1947. Growth *in vitro* of immature *Hordeum* embryos. Science 106, 547-548.
- Koornneef, M., Bade, J., Hanhart, C., Horsman, K., Schel, J., Soppe, W., Verkerk, R., Zabel, P., 1993. Characterization and mapping of a gene controlling shoot regeneration in tomato. Plant J. 3, 131-141.
- 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.
- Kott, L.S., Kasha, K.J., 1985. Embryo culture and haploid plant production. En: Bright, S.W.J., Jones, M.G.K. (Eds.). Cereal tissue and cell culture. Springer, Dordrecht, pp. 45-78.
- Kranz, E., Lorz, H., 1993. In Vitro Fertilization with Isolated, Single Gametes Results in Zygotic Embryogenesis and Fertile Maize Plants. Plant Cell. 5, 739-746.
- Kumar, A.O., Panda, R.C., Raja, R.K.G., 1987. Cytogenetic studies of the hybrids of *Capsicum annuum* with *C. chinense* and *C. baccatum*. Theoretical and Applied Genetics 74, 242-246.
- Laibach, F., 1925. Das Taubwerden von Bastardsamen und die kustliche Aufzucht früt absterbender Bastardembyonen. Zeitschar. Bot. 17, 417-459.
- Laibach, F., 1929. Ectogenesis in plants. Jour. Hered. 20, 201-208.
- Lanteri, S., Pickersgill, B., 1993. Chromosomal structural changes in *Capsicum annuum* L. and *C. chinense* Jacq. Euphytica 67, 155-160.

- Lee, T.D., 1988. Patterns of fruit and seed production En: Lovett-Doust, J., Lovett-Doust, L. (Eds.). Plant reproductive ecology, patterns and strategies. Oxford University Press, New York, pp. 179-202.
- Liu, C.M., Xu, Z.H., Chua, N.H., 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *Plant Cell* 5, 261-630.
- Liu, G.S., Qi, D.M., Zhang, W.D., Liu, J.S., Li, H.J., 2004. Highly efficient embryo germination *in vitro* shortens the breeding cycle in *Leymus chinensis*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40, 321-324.
- Lofland, H.B. Jr., 1950. *In vitro* culture of cotton embryo. *Bot. Gazz.* 111, 307-311.
- MAGRAMA. 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es> (consultado en Febrero de 2013).
- Marín, J., 2012. Portagrano. Vademécum de variedades hortícolas. XIIIth edition. José Marín Rodríguez, Madrid.
- Marinkovic, N., Aleksic, Z., Obradovic, A., Mijatovic, M., 1992. New pepper line resistant to *Verticillium* Wilt. Proceedings of VIIIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Roma, Italy, pp. 195-201.
- Matsubara, S., 1962. Studies on the groth-promoting substance “embryo factor” necessary for the culture of young embyos of *Datura tatula in vitro*, *Bot. Mag. Tokyo*, 75, 10-18.
- Matsubara, S., 1964. Effect of nitrogen compounds on the growth of isolated young embryos of *Datura*. *Bot. Mag. Tokyo* 77, 253-259.
- Matsubara, S., Nakahira, R., 1965. Some factors affecting the growth of young embryo *in vitro*. *Sci. Rep. Kyoto. Pref. Univ. (Nat. Sci., Liv. Sci. & Welf. Sci.) Ser. A* 16, 1.

- Matsunaga, H., Monma, S., 1995. Varietal differences in resistance to bacterial wilt in related species of *Capsicum annuum*. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 14, 60-61.
- Mauney, J.R., 1961. The culture *in vitro* of immature cotton embryos. *Bot. Gaz.* 122, 205-209.
- McLeod, M.J., Guttman, S.I., Eshbaugh, W.H., 1982. Early Evolution of Chili Peppers (*Capsicum*). *Economic Botany* 36, 361-368.
- Minamiyama, Y., Tsuru, M., Hirai, M., 2006. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*. *Mol. Breed.* 18, 157-169.
- Mizanur Rahim Khan, Md., Hasnunnahar, Mst., Isshiki, S., 2013. Production of Amphidiploids of the Hybrids between *Solanum macrocarpon* and Eggplant. *Hortscience* 48, 422-424
- Molhova, E., 1977. Cytoembriologie du genre *Capsicum*. En: Porchard, E. (Ed.). *Capsicum 77: Comptes Rendus 3<sup>rd</sup> Congress EUCARPIA Piment*. Institut National de la Recherche Agronomique, Montfavet, Avignon, pp. 191-197.
- Mongkolporn, O., Montri, P., Supakaew, T., Taylor, P.W.J., 2010. Differential reactions on mature green and ripe chili fruit infected by three *Colletotrichum* species. *Plant Disease* 94, 306-310.
- Monnier, M., 1976. Culture *in vitro* de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench. *Rev. Cyto. Biol. Vég.* 39, 1-120.
- Monnier, M., 1978. Culture des embryons adultes de *Phaseolus vulgaris*: rôle des réserves. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 286, 461.
- Monnier, M., 1995. Culture of zygotic embryos. En: Thorpe, T.A. (Ed.). *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 117-153.

- Montri, P., Taylor, P.W.J., Mongkolporn, O., 2009. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose in Thailand. *Plant Disease* 93, 17-20.
- Muhyi, R., Bosland, P.W., 1995. Evaluation of *Capsicum* germplasm for sources of resistance to *Rhizoctonia solani*. *HortScience* 30, 341-342.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- Nakajima, T., 1962. Physiological studies of seed development, especially embryonic growth and endosperm development. *Bull. Univ. Osaka. Pref. Ser. B* 13, 13-48.
- Namesny, A., 2006. Pimientos. 2ª edición. Compendios de horticultura 16. Ediciones de horticultura, S.L. Reus. España.
- Norstog, K., 1956. The growth of barley embryos on coconut milk media. *Bull Torrey Bot. Club.* 83, 27-29.
- Norstog, K., 1961. The growth and differentiation of cultured barley embryos, *Amer. J. Bot.*, 48, 876.
- Norstog, K., Klein, R.M., 1972. Development of cultured barley embryos. Precocious germination and dormancy. *Canadian Journal of Botany* 50, 1887-1894.
- Nuez, F., Gil-Ortega, R., Costa, J., 2003. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Mundiprensa, Madrid.
- Ochatt, S.J., Sangwan, R.S., Marget, P., Assoumou Ndong, Y., Rancillac, M., Perney, P., Röbbelen G., 2002. New approaches towards the shortening of generation cycles for faster breeding of protein legumes. *Plant Breeding* 121, 436-440.
- Ochoa-Alejo, N., Ramirez-Malagón, R., 2001. *In vitro* chili pepper biotechnology. *In vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 37, 701-729.

- Olsen, K.M., Gross, B.L., 2008. Detecting multiple origins of domesticated crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105, 13701-13702.
- Onus, A.N., Pickersgill, B., 2004. Unilateral incompatibility in *Capsicum* (*Solanaceae*): occurrence and taxonomic distribution. *Ann Bot* 94, 289-295.
- Owen H.R., Aung L.H., 1990. Genotypic and Chemical Influences on Fruit Growth of Tomato. *HortScience* 25, 1255-1257.
- Pakdeevaporn, P., Wasee, S., Taylor, P.W.J., Mongkolporn, O., 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breeding* 124, 206-208.
- Paris, D., Rietsema, J., Satina, S., Blakeslee, A.F., 1953. Effect of amino acids, especially aspartic and glutamic acid and their amides, on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 39, 1205-1212.
- Park, S.K., Kim, S.B., Park, H.G., Yoon, J.B., 2009. *Capsicum* germplasm resistant to pepper anthracnose differentially interact with *Colletotrichum* isolates. *Horticulture, Environment and Biotechnology* 50, 17-23.
- Paul, H., Daigny, G., Sangwan-Norreel, B.S, 1994. Somatic embryogenesis in apple. *Plant Cell Reports* 19, 768-774.
- Pérez de la Vega, M., 2010. El proceso de domesticación. En: Carrillo J. M., Diez M. J., Pérez de la Vega M., Nuez F. (Eds.). *Mejora genética y recursos fitogenéticos: "Nuevos avances en la conservación y utilización de los recursos fitogenéticos"*. Centro de Publicaciones del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.
- Pickersgill, B., 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution* 25, 683-691.

- Pickersgill, B., 1988. The genus *Capsicum*: a multidisciplinary approach to the taxonomy of cultivated and wild plants. *Biol. Zent. BI.* 107, 381-389.
- Pickersgill, B., 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96, 129-133.
- Pierik, R.L.M., 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands
- Pradeep-Kumar, J., Gopalkrishnan, T.R., Peter, K.V., 1993. Heterosis in interspecific hybrids of *Capsicum*. *Horticultural Journal*, 4, 27-32.
- Pratt, R.C., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1985. Genotypic diversity enhances recovery of hybrids and fertile backcrosses of *Phaseolus vulgaris* × *P. acutifolius* A. Gray. *Euphytica* 34, 329-344.
- Quagliotti, L., 1979. Floral biology of *Capsicum* and *Solanum melongena*. En: Hawkes, J.G., Lester, R.N., Skelding, A.D. (Eds.). *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*, Academic Press, London, pp. 399-419.
- Raghavan, V., 1964. Interaction of Growth Substances in Growth and Organ Initiation in the Embryos of *Capsella*. *Plant Physiology* 39, 816-821.
- Raghavan, V., 1976. *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*. Academic Press, London.
- Raghavan, V., 1980. Embryo culture. En: Vasil, I. K., (Ed.). *Perspectives in plant cell and tissue culture*. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 11B. New York: Academic Press, pp. 209-240.
- Raghavan, V., Srivastava, P.S., 1982. Embryo culture. En: John, B.M. (Ed.). *Experimental Embryology of Vascular Plants* Springer Verlag, Berlin, pp. 195-230.

- Randolph, L.F., 1945. Embryo culture of *Iris* seed. Bull. Am. Iris Soc. 97, 33-45.
- Randolph, L.F., Cox, L.G., 1943. Factors Influencing the Germination of Iris Seed and the Relation of Inhibiting Substances to Embryo Dormancy. Proc. Amer. Soc. for Hort. Sci. 43, 284-300.
- Rangan, T.S., 1984. Culture of ovules. En: Vasil, I.K. (Ed.). Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1: Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press, New York, pp. 227-231.
- Rangaswamy, N.S., 1961. Experimental studies on female reproductive structures of *Citrus microcarpa* Bunge., Phytomorphology, 11, 109.
- Razdan, M.K. 2003. Plant tissue culture. Second edition. Science Publishers, Inc. Enfield (NH), USA.
- Rietsema, J., Satina, S., Blakeslee, A.F., 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro*. Am. J. Bot. 40, 538-545.
- Rijven, A.H.G.C., 1952. *In vitro* studies on the embryo of *Capsella bursa-pastoris*. Acta Bot. Neerl. 1, 157-200.
- Rijven, A.H.G.C., 1955. Effects of glutamine, asparagines and other related compounds in the *in vitro* growth of embryos of *Capsella bursa-pastoris*. K. Ned. Akad. Wet. Proc., 58, 368-376.
- Rodríguez-Burruezo, A., Nuez, F., 2006. Mejora de la calidad del pimiento. Capítulo 5. Mejora genética de la calidad de las plantas. Sociedad española de ciencias hortícolas. Sociedad española de genética. Universidad Politécnica de Valencia, pp. 361-391.
- Rodríguez-Burruezo, A., Prohens, J., Raigón, M.D., Nuez, F. 2009. Variation for bioactive compounds in ají (*C. baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R.&P.) and implications for breeding. Euphytica 170, 169-181.



- Rodriguez–Riaño, T., Dafni, A., 2000. A new procedure to assess pollen viability. *Sexual Plant Reproduction* 12, 241-244.
- Roumet, P., Morin, F., 1997. Germination of immature soybean seeds to shorten reproductive cycle duration. *Crop science*.37, 521-525.
- Ryczkowski, M., 1960. Changes of osmotic value during the development of the ovule. *Planta* 55, 343-356.
- San José, M.C., Vieitez, A.M., 1993. Regeneration of *Camellia* plantlets from leaf explant cultures by embryogenesis and caulogenesis. *Scientia Hortic.* 54, 303-315.
- Satoh, H., Takashina, T., Escalante, A., Egashira, H., Imanishi, S., 2000. Molecular markers mapped around the high shoot regeneration capacity gene Rg-2 in *Lycopersicon chilense*. *Breed. Sci.* 50, 251-256.
- Seguí, J.M., 2010. *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Sharma, H.P., 2009. *Plant Embryology: Classical and Experimental*. Alpha Science Intl Ltd., USA.
- Shifriss, C., Pilowsky, M., Zacks, J.M., 1992. Resistance to *Leveillula taurica* mildew (*Oidopsis taurica*) in *Capsicum annuum*. *Phytoparasitica* 20, 279-283.
- Smith, J.G., 1973. Embryo development in *Phaseolus vulgaris*. II. Analysis of selected inorganic ions, ammonia, organic acids, amino acids, and sugar in the endosperm liquid. *Plant Physiol.* 51, 454-458.
- Sommer, H., Brown, C., Kormanik, P., 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured in vitro. *Bot Gatz* 136, 196-200.

- Sousa, J.A., Maluf, W.R., 2003. Diallel analyses and estimation of genetic parameters of hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *Scientia Agricola* 60, 105-113.
- Stebbins, G.L., 1950. *Variation and Evolution in plants*. Columbia Univ. Press. New York.
- Subrahmanyam, N.C., 1979. Haploidy from *Hordeum* interspecific crosses. Part 2. Dihaploids of *H. brachyantherum* and *H. depressum*. *Theor. Appl. Genet.* 55, 139-144.
- Suprunova, T.P., Dzhos E.A., Pishnaya, O.N., Shmikova N.A., Mamedov, M.I. 2010. Production and analysis of interspecific hybrids among four species of the genus *Capsicum*. *Proceedings of the XIV TH EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant*. Ed. Universitat Politècnica de València.
- Suzuki, K., Kuroda, T., Miura, Y., Murai, J., 2003. Screening and field trials of virus-resistant sources in *Capsicum* spp. *Plant Disease* 87, 779-783.
- Taiz, L., Zeiger E., 2006. *Fisiología vegetal*. Volumen 2. Publicaciones de la Universitat Jaume I, D. L. Col·lecció: "Ciències experimentals". Castellón de la plana, pp. 581-1336.
- Tamaki, M., Urasaki, N., Nakamura, I., Motomura, K., Adaniya, S., 2011. Shortening the breeding cycle of papaya (*Carica papaya* L.) by culturing embryos treated with ethrel. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106, 225-233.
- Topfer, R., Gronenborn, G., Schell, J., Steinbiss, H.H., 1989. Uptake and transient expression chimeric genes in seed-derived embryos. *Plant cell.* 1, 133-139.
- Tukey, H.B., 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos. *J. Hered.* 24, 7-12.
- Umbeck, P.F., Norstog, K., 1979. Effects of abscisic acid and ammonium ion on morphogenesis of cultured barley embryos. *Bull. Torrey. Bot. Club* 106, 110-116.

- Van Overbeek, J., Conklin, M.E., Blakeslee, A.F., 1942. Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. *Am. J. Bot.* 29, 472-477.
- Van Tuyl, J.M., De Jeu, M.J., 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Chapter 13. In: Shivanna K.R., Sawhney V.K. (eds.), *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*, Cambridge University Press, pp. 273-293.
- Veen, H., 1963. The effect of various growth-regulators on embryos of *Capsella bursa-pastoris* growing *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.* 12, 129-171.
- Wang, X.F., Wang, Y.X., Zhang, G.Y., Ma, Z.Y., 2011. An integrated breeding technology for accelerating generation advancement and trait introgression in cotton. *Plant Breeding* 130, 569-573.
- Warmke, H., Rivera-Pérez, E. y Ferrer-Monge, J. A. (1946). The culture of sugar cane embryos *in vitro*. Fourth Annu. Rep., Inst. Trop. Agric., University of Puerto Rico.
- Wubs, A.M., Ma, Y.T., Heuvelink, E., Hemerik, L., Marcelis, L.F.M., 2012. Model Selection for Nondestructive Quantification of Fruit Growth in Pepper. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 137, 71-79.
- Yang, D.C., 2001. Interspecific hybridization for the breeding of anthracnose-resistant hot Peppers lines. M.S thesis, Seoul National University, Korea.
- Yazawa S., Sato, T., Namiki, T., 1989. Interspecific Hybrid Dwarfism and Geographical Distribution of the Dwarfness Gene in *Capsicum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 58, 609-618.
- Yazawa S., Sato T., Namiki, T. 1990. Dwarfism and a Virus-like Syndrome in Interspecific Hybrids of Genus *Capsicum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 58, 935-943.

- Yoon, J.B., 2003. Identification of genetic resources, interspecific hybridization and inheritance analysis for breeding Peppers (*Capsicum annuum*) resistant to anthracnose. Ph. D. Dissertation, Seoul National University, Korea.
- Yoon, B., Park, H.G., 2005. Trispecies bridge crosses (*Capsicum annuum* x *C. chinense*) x *C. baccatum*, as an Alternative for Introgression of Anthracnose Resistance from *C. baccatum* into *C. annuum*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 46, 5-9.
- Yoon, J.Y., Green, S.K., Tschanz, A.T., Tsou, S.C.S, Chang, L.C., 1989. Pepper improvement for the tropics, problems and the AVRDC approach. En: Tomato and pepper production in the tropics. Compiled by S.K. Green, T.D. Griggs and B.T. Mclean, B.T. (Eds.). Proceeding of the international symposium on integrated management practices 21-26 March 1998, Tainan, Taiwan, pp. 86-98.
- Yoon, J.B., Yang, D.C., Do, J.W., Park, H.G., 2006. Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. Breed. Sci. 56, 31-38.
- Ziebur, N.K., Brink, R.A., 1951. The stimulative effect of *Hordeum* endosperms on the growth of immature plant embryos in vitro, Amer. J. Bot. 38, 253.
- Ziebur, N.K., Brink, R.A., Graf, L.H., Stahmann, M.A., 1950. The effect of casein hydrolysate on the growth *in vitro* of immature *Hordeum* embryos. Am. J. Bot. 37, 144-148.
- Zijlstra, S.C., Purimahua, C., Lindout, P., 1991. Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. Hortscience 26, 585-586.

