

OBTENCIÓN DE PLANTAS HAPLOIDES EN CHILE MIAHUATECO (*Capsicum annuum* L.)*

OBTAINING HAPLOID PLANTS FROM MIAHUATECO CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L.)

Marcelina Vélez Torres¹, Alejandrina Robledo Paz^{2§}, Tarsicio Corona Torres¹, Víctor Heber Aguilar Rincón¹, Porfirio Ramírez Vallejo¹ y Javier Suárez Espinosa³

¹Posgrado en Genética. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Fax. 01 595 9520262. (velez@colpos.mx), (tcoronat@colpos.mx), (aheber@colpos.mx). ²Posgrado en Semillas. Colegio de Postgraduados. Fax. 01 595 9520262. ³Posgrado en Estadística. Colegio de Postgraduados. Fax. 01 595 9520262. (sjavier@colpos.mx). [§]Autora para correspondencia: arobledo@colpos.mx.

RESUMEN

La regeneración de plantas haploides, es una herramienta importante en los programas de mejoramiento y estudios genéticos, ya que permite obtener líneas puras más rápido que los métodos convencionales a través de la duplicación de plantas haploides. El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología que permita la regeneración de plantas haploides de chile tipo miahuateco (*Capsicum annuum* L.). Las anteras se cultivaron en los medios basales de Murashige y Skoog (1962); Chu *et al.* (1975), suplementados con 6-furfurilaminopurina (0.1-1 mg L⁻¹), ácido naftalenacético (0.1 mg L⁻¹), ácido indolacético (1 mg L⁻¹) y ácido 2-4 diclorofenoxiacético (1 mg L⁻¹). La embriogénesis se indujo hasta en 2.23% de anteras cuando se cultivaron en una combinación de 6-furfurilaminopurina con 2-4, diclorofenoxiacético (1 mg L⁻¹ de ambos) o de ácido indolacético con 6-furfurilaminopurina (0.1 mg L⁻¹ de ambos). El análisis cromosómico de las plantas regeneradas mostró que eran haploides con número cromosómico 2n= x= 12.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, anteras, embriogénesis somática, haploides.

ABSTRACT

Haploid plant regeneration is an important tool in breeding programs and genetics studies, since it helps obtain pure lines faster than conventional methods by the duplication of haploid plants. The aim of this study was to establish a methodology to regenerate haploid Miahuateco chili pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Anthers were grown on Murashige and Skoog (1962); Chu *et al.* (1975) basal media, supplemented with 6-furfurylaminopurine (0.1-1 mg L⁻¹), naphthaleneacetic acid (0.1 mg L⁻¹), indolacetic acid (1 mg L⁻¹), and 2-4 dichlorophenoxyacetic acid (1 mg L⁻¹). Embryogenesis was induced in 2.23% of anthers grown in a combination of 6-furfurylaminopurine with 2-4 dichlorophenoxyacetic acid (1 mg L⁻¹, of each), or indolacetic acid with 6-furfurylaminopurine (0.1 mg L⁻¹ of each). Chromosome analysis of regenerated plants showed that they were haploids with a chromosome number of 2n= x= 12.

Key words: *Capsicum annuum*, anthers, haploids, somatic embryogenesis.

INTRODUCCIÓN

La obtención de líneas puras u homocigotas puede requerir al menos seis ciclos de autofecundación usando las técnicas convencionales (Polci *et al.*, 2004). El empleo de herramientas como la producción *in vitro* de haploides y doble haploides, permite obtener líneas homocigotas hasta en una generación, reduciendo tiempo y costo de producción de estas líneas (González y Jouve, 2003; Polci *et al.*, 2004; Maraschin *et al.*, 2005). Además, la regeneración de plantas haploides tiene aplicación en estudios citogenéticos y genómicos (Jauhar, 1993; Aleza *et al.*, 2003), para la construcción de mapas genéticos (Oliver *et al.*, 2000) y en la evaluación de diversidad genética (Maraschin *et al.*, 2005). En varias especies hortícolas se han regenerado plantas completas a partir del gametofito masculino (granos de polen) con un número haploide de cromosomas el cual se diploidiza para generar líneas puras doble haploides (Dolcet-Sanjuan y Clavería, 2003).

En *Capsicum annuum* L. el método más empleado para la obtención de haploides es el cultivo *in vitro* de anteras; se han desarrollado varios protocolos para la inducción de embriogénesis a partir de microsporas y la regeneración de plantas haploides en diferentes variedades (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1997; Bárány *et al.*, 2001; Kim y Jang, 2001; Kim *et al.*, 2004; Supena *et al.*, 2006); no obstante, no se conocen reportes sobre la generación de haploides de genotipos de chile cultivados en México.

Entre los tipos de chile más importantes en nuestro país se encuentran los denominados anchos, y dentro de éstos sobresalen los subtipos mulato, ancho y miahuateco (Laborde y Pozo, 1982). El chile miahuateco difiere de los otros por la ausencia de cajete y por tener un fruto más delgado, además es apreciado en la región comprendida entre los Municipios de Tehuacán y Tecamachalco del estado de Puebla, por sus características culinarias. Este tipo de chile es susceptible a la incidencia de enfermedades presentes en el suelo y han reducido el área de producción. También, su cultivo mezclado con otros tipos de chile como ancho y copi, ha ido ocasionando la pérdida de su identidad morfológica (Aguilar *et al.*, 2006).

En el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (CP) se tienen varias recolectas de chile miahuateco, algunas de las cuales han mostrado resistencia a *Phytophthora capsici* (Morán, 2008), pudiendo utilizarse como fuente de variación en programas de mejoramiento genético. Una forma de estudiar la herencia de estos caracteres en menor tiempo es con la formación de líneas homocigotas mediante la

INTRODUCTION

Obtaining pure or homozygotic lines may require at least six cycles of self-fertilization using conventional techniques (Polci *et al.*, 2004). The use of tools such as the production *in vitro* of haploids and double haploids, helps obtain homozygotic lines up to one generation, reducing production costs and time on these lines (González and Jouve, 2003; Polci *et al.*, 2004; Maraschin *et al.*, 2005). Also, the regeneration of haploid plants is applicable in cytogenetic and genomic studies (Jauhar, 1993; Aleza *et al.*, 2003), for the creation of genetic maps (Oliver *et al.*, 2000) and in the evaluation of genetic diversity (Maraschin *et al.*, 2005). Entire plants have been regenerated in several horticultural species from the male gametophyte (pollen grains) with a haploid number of chromosomes which is diploidized to create double haploid pure lines (Dolcet-Sanjuan and Clavería, 2003).

In *Capsicum annuum* L., the most commonly used method for obtaining haploids is the plantation *in vitro* of anthers; several protocols have been developed to induce embryogenesis from spores and the regeneration of haploid plants in different varieties (Dolcet-Sanjuan *et al.*, 1997; Bárány *et al.*, 2001; Kim and Jang, 2001; Kim *et al.*, 2004; Supena *et al.*, 2006); however, there are no known reports on the generation of haploids of genotypes of chili pepper planted in Mexico.

One of the most important types of chilies in Mexico is called wide, and in these, the most outstanding are the subtypes mulato, wide and miahuateco (Laborde and Pozo, 1982). The miahuateco chili differs from the rest by not having a cajete and having a narrower fruit; it is also valued highly in the area between the municipalities of Tehuacán and Tecamachalco, Puebla State of for its culinary features. This type of chili is susceptible to the incidence of diseases in the soil that have reduced the area of production. Also, its plantation, combined with other types of chilies, such as wide and copi, has caused the loss of its morphological identity (Aguilar *et al.*, 2006).

In the Colegio de Postgraduados in Agricultural Science (CP) there are several miahuateco chili collections, some of which have proven to be resistant to *Phytophthora capsici* (Morán, 2008), and can be used as a source of variation in genetic breeding programs. One way to study the characteristics in less time is with the formation

producción de plantas haploides y su posterior duplicación. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue establecer una metodología para generar haploides de chile miahuateco a partir del cultivo de anteras.

of homozygous lines by producing haploid plants and then duplicating them. Therefore, the aim of this work was to determine a methodology to generate miahuateco chili haploids from the plantation of anthers.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon las accesiones CP631, CP633, CP634 y CP643 provenientes de los Municipios de Tepanco de López y Tlacotepec, Puebla, proporcionadas por el proyecto: Los recursos genéticos del chile (*Capsicum* spp.) en México: estudio, conservación y utilización; financiado por el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI). Dichas accesiones se encuentran resguardadas en el banco de germoplasma de chile del CP, ubicado en el *Campus* Montecillo, Texcoco, Estado de México (Cuadro 1).

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Accessions CP631, CP633, CP634 and CP643 were used, from the municipalities of Tepanco de López and Tlacotepec, Puebla, provided by the project: The genetic resources of chili pepper (*Capsicum* spp.) in Mexico: study, conservation and use; financed by the National Pythogenetic Resource System for Food and Agriculture (SINAREFI). The accessions are kept in the chili germplasm bank in the CP, *Campus* Montecillo, Texcoco, Mexico State (Table 1).

Cuadro 1. Localidades de colecta de las accesiones de chile miahuateco, en el estado de Puebla.

Table 1. Locations of collection of miahuateco chili accessions in the state of Puebla.

Municipio	Localidad	Accesión	Latitud norte	Longitud oeste	Altitud (m)	Año de colecta
Tepanco de López	Paraje Cruz Verde	CP631	18°34'43"	97°33'48.9"	1 836	2004
"	El Cuatillo	CP633	18°34'25.1"	97°33'37.4"	1 817	2004
"	Rancho Tecajete	CP634	18°35'26.5"	97°29'49.6"	1 800	2004
Tlacotepec	El Zapote	CP643	18°39'51.7"	97°40'9.1"	1 912	2004

Con la finalidad de obtener anteras para su establecimiento *in vitro*, 15 plantas de cada una de las accesiones de chile crecieron en los invernaderos del CP, ubicado en la carretera México- Texcoco, km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México; situado a una altitud de 2 250 m, latitud norte 19° 29' y longitud oeste 98° 53', con temperaturas promedio máximas y mínimas de 25 y 12 °C respectivamente.

To obtain anthers for their production *in vitro*, 15 plants of each chili accession were grown in the CP greenhouses, located on the Mexico City- Texcoco road, km 36.5, Montecillo, Texcoco, State of Mexico; at an altitude of 2 250 m, latitude north 19° 29' and longitude west 98° 53', with average high and low temperatures of 25 and 12 °C respectively.

Establecimiento *in vitro* de anteras

Todos los medios empleados para el cultivo de anteras contenían sales y vitaminas del medio de Murashige y Skoog (MS) (1962), con excepción del medio A2 que se componía de las sales del medio N6 de Chu *et al.* (1975) y de las vitaminas del MS (Cuadro 2). El pH de los medios se ajustó a 5.7±0.1 y éstos se esterilizaron 15 min en autoclave a 1.05 kg cm⁻².

Production *in vitro* of anthers

All the media used for the plantation of anthers contained salts and vitamins from the Murashige and Skoog (MS) medium (1962), except for A2 which was composed of the salts of medium N6 by Chu *et al.* (1975) and of the vitamins of the MS (Table 2). The pH of the media was set to 5.7 ± 0.1 and they were sterilized for 15 min in an autoclave at 1.05 kg cm⁻².

Cuadro 2. Composición de los medios usados en el cultivo de anteras, de cuatro accesiones de chile miahuateco.
Table 2. Composition of the media used in the plantation of anthers, from four miahuateco chili accessions.

Medio de cultivo	Sacarosa (g L ⁻¹)	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	Aminoácidos (mg L ⁻¹)	Agar (g L ⁻¹)	Suplementos
A1	60	Cinetina (1) y 2,4-D (1)	sd	7	Agua de coco (20%)
A2	60	2,4-D (2)	sd	8	sd
A3	60	AIA (1) y cinetina (2)	Cisteína (50)	7	AA (200 mg L ⁻¹)
A4	60	Cinetina (1) y 2,4-D (0.5)	sd	7	Agua de coco (20%)
A5	60	ANA (0.1) y cinetina (0.1)	sd	sd	Agua de coco (20%)
MD1	30	sd	sd	7	sd
MD2	30	AG ₃ (1)	sd	7	sd
MM	30	BA (4); y AIA (0.3)	sd	7	sd
ME	30	AIB (1)	sd	7	sd

BA=benciladenina; ANA=ácido naftalenacético; AIA=ácido indolacético; AG₃=ácido giberélico; Cinetina=6-furfurilaminopurina; 2, 4-D=ácido 2,4-diclorofenoxiacético; AIB= ácido indolbutírico; AA= ácido ascórbico; sd= sin dato.

Desinfestación y siembra

Las anteras utilizadas para el cultivo *in vitro* se obtuvieron de botones florales de 3 mm de diámetro, dado que en el estudio citológico que se llevó a cabo previamente, el mayor número de células en la fase de tétrada (uninucleadas) se presentaron en botones de este tamaño. La desinfestación de las anteras se realizó con etanol al 96% (v/v) durante 2 min, seguido de 10 min en una solución de hipoclorito de sodio al 1.8% de ingrediente activo.

Las anteras se sembraron de dos maneras, en una de ellas se colocaron intactas sobre el medio de cultivo y en la otra se les hizo una incisión longitudinal en la parte media.

Inducción de la embriogénesis somática

Las anteras de las cuatro accesiones se cultivaron como explantes en frascos de 50 mL de capacidad con 10 mL de los medios A1, A2, A3, A4 y A5 (Cuadro 2). Estas se mantuvieron en obscuridad a 26±2 °C durante cinco semanas para inducir la formación de callo embriogénico. No se cultivaron anteras de las accesiones CP634 y CP643 en el medio A5.

Desarrollo de los embriones somáticos

Para promover la diferenciación y germinación de los embriones somáticos formados en las anteras que permanecieron durante cinco semanas en los medios de inducción, éstas se transfirieron a frascos con 10 mL de medio MD1, en el que se cultivaron por dos semanas en oscuridad y dos semanas en un fotoperiodo de 16 horas de luz (lámparas

Disinfestations and plantation

The anthers used for the plantation *in vitro* were taken from flower buds, 3 mm in diameter, since in the cytological study carried out previously; the largest number of cells in the tetrad phase (uninucleate) was found in buds this size. The anthers were disinfested with ethanol at 96% (v/v) for 2 min, followed by 10 min in a 1.8% active ingredient sodium hypochlorite solution.

Anthers were planted in two ways. In one of them, they were placed intact on the culture medium and in the other they were cut longitudinally down the middle.

Induction of somatic embryogenesis

The anthers of all four accessions were planted as explants in 50 mL flasks with 10 mL of the media A1, A2, A3, A4 and A5 (Table 2). These were kept in the dark at 26±2 °C for five weeks to induce the formation of embryogenic callus. No anthers were planted from accessions CP634 or CP643 in medium A5.

Development of the somatic embryos

In order to promote the differentiation and germination of the somatic embryos formed in the anthers that remained in the induction media for five weeks, the anthers were moved to flasks with 10 mL of MD1 medium, in which they grew for two weeks in the dark and another two in a photoperiod of 16 hours of light (cold fluorescent white light, with an intensity of 25 μmol m⁻² s⁻¹).

de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plántulas obtenidas en el medio MD1 se transfirieron a un medio MD2 en condiciones de luz para continuar su desarrollo (Cuadro 2).

Multiplicación de plantas haploides

Los ápices de vástago de las plantas haploides obtenidas a partir de las anteras, se cultivaron durante cuatro semanas en el medio MM (Robledo-Paz y Carrillo-Castañeda, 2004). Los brotes adventicios regenerados en el medio MM se transfirieron al medio MD2 por cuatro semanas para promover su crecimiento; posteriormente, éstos se individualizaron y se colocaron en el medio ME durante dos semanas para promover la formación del sistema radical (Cuadro 2).

Análisis cromosómico

Para observar cromosomas mitóticos, se colocaron los ápices radicales de las plantas regeneradas a partir de anteras en una solución acuosa de colchicina (0.05%) (p/v) por 3.5 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, los ápices se transfirieron al fijador Farmer 3:1 (etanol: ácido acético) (v/v) por 12 h; se hidrolizaron 10 min en HCl 1 N a 60°C y se tiñeron con una solución de Feulgen, preparada de acuerdo a García (1990) a 60°C por 5 min. Los ápices coloreados se maceraron en solución enzimática (pectinasa 2%, celulasa 5% y buffer citrato, pH 4.5) y después, se llevó a cabo el aplastado de los mismos sobre portaobjetos agregando una gota de orceína propiónica al 2% para luego cubrirlos con cubreobjetos. El conteo y toma de fotografías de los cromosomas se hizo utilizando un microscopio óptico Karl Zeiss modelo 4700801-9099.

Duplicación cromosómica

Las plantas haploides regeneradas se extrajeron del medio de cultivo, se lavaron las raíces con agua corriente para eliminar residuos del mismo y se sumergieron hasta el cuello de la raíz en una solución acuosa de colchicina al (0.05%) (p/v) durante 6 h, a temperatura ambiente.

Transferencia al suelo

Después del tratamiento con colchicina, las plantas se colocaron en macetas con una mezcla de agrolita y tierra de monte (1:1) y se cubrieron con bolsas de plástico transparente con dos perforaciones en los extremos para evitar deshidratación. Después de siete días se retiraron las bolsas y las plantas se llevaron al invernadero para continuar su crecimiento;

The plantlets obtained in medium MD1 were moved to a medium MD2 under the light to continue their growth (Table 2).

Multiplication of haploid plants

The shoot tips of the haploid plants obtained from the anthers were cultivated for four weeks in the medium MM (Robledo-Paz and Carrillo-Castañeda, 2004). The sprouts regenerated in the medium MM were moved to medium MD2 for four weeks to promote their growth. They were later separated and placed in the medium ME for two weeks to promote the formation of the radical system (Table 2).

Chromosomal analysis

To observe mitotic chromosomes, the root tips of plants regenerated from anthers were placed in an aqueous solution of colchicine (0.05%) (p/v) for 3.5 h, at room temperature and in the dark. The apices were then transferred to the Farmer 3:1 fixer (ethanol: acetic acid) (v/v) for 12 h; they were hydrolyzed for 10 min in HCl 1 N at 60°C and tinted with Feulgen solution, prepared according to García (1990) at 60°C for 5 min. The colored apices were soaked in an enzyme solution (pectinase 2%, cellulase 5% and citrate buffer, pH 4.5), crushed with a drop of propionic orcein at 2% and finally covered with a slide. The chromosome count and photography was carried out using a Karl Zeiss 4700801-9099 optical microscope.

Chromosomal duplication

The regenerated haploid plants were taken from the growth medium; their roots were washed with tap water to eliminate medium remains and submerged to the neck in an aqueous colchicine solution at (0.05%) (p/v) for 6 h, at room temperature.

Transfer to soil

After the treatment with colchicine, plants were placed in pots with a mixture of agrolita and soil (1:1) and covered with transparent plastic bags with two holes in the ends, to avoid dehydration. The bags were removed after seven days and the plants were taken to the greenhouse to continue their growth, during which they were irrigated with normal water as required

durante este tiempo se aplicaron riegos con agua normal de acuerdo al requerimiento de las plantas y a cada una se le agregó 200 ml de fertilizante triple 17 (1 g L⁻¹) (Pelicano, Disagro®, México) cada 15 días.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó el diseño experimental completamente al azar, en el que la unidad experimental consistió de un frasco con una antera, teniendo un número variable de repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron el número de explantes que formaron callo y el número de explantes que diferenciaron embriones.

Los resultados en el presente trabajo consistieron en la presencia o ausencia tanto de callos como de embriones, el análisis de la primera variable se llevó a cabo mediante la metodología de regresión logística, usando el paquete estadístico SAS versión 8.1 con el procedimiento PROC LOGIST con contraste. La comparación del efecto entre los factores (medios de cultivo y accesiones) se hizo mediante contrastes haciendo el ajuste de Bonferroni.

En el caso de la variable formación de embriones, se utilizó la prueba exacta de Fisher para la comparación de dos proporciones independientes, usando el procedimiento PROC FREQ, además de hacer el ajuste de Bonferroni, de la misma forma que en la variable formación de callo, se utilizó para declarar diferencias significativas entre medios y colectas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de anteras

La metodología empleada para la desinfección de las anteras permitió obtener 100% de éstas libres de contaminación. Sembrar las anteras intactas dio los mejores resultados en cuanto a la formación de callo, ya que cuando se les practicó la incisión longitudinal, estas se oxidaron tornándose café y aunque produjeron callo, este fue muy pequeño y de corta duración.

Lo anterior indica que la integridad de la antera es importante para la respuesta morfogénica, tal como lo observaron Pacheco-Sánchez *et al.* (2003) en anteras de *Solanum iopetalum*. En *Lilium*, Clément y Audran (1995) encontraron que las capas de la pared de la antera actúan como un amortiguador fisiológico al almacenar nutrientes en granos de almidón, lo que permite al grano de polen germinar.

and 200 ml of triple fertilizer 17 (1 g L⁻¹) (Pelicano, Disagro®, México) was added to each one every 15 days.

Experimental design and statistical analysis

A randomized experimental design was used, in which the experimental unit consisted of a flask with an anther, with a variable number of repetitions per treatment. The variables evaluated were the number of explants that formed a callus and the number of explants that differentiated embryos.

The results in this work were the presence or absence of calluses or embryos; the analysis of the first variable was performed with the logistic regression methodology, using the SAS statistical package, version 8.1, with the procedure PROC LOGIST with contrast. The comparison of the effect between factors (crop medium and accessions) was carried out using by contrasts using the Bonferroni adjustment.

In the variable formation of embryos, Fisher's exact test was used for the comparison of two independent proportions, using the procedure PROC FREQ, apart from making the Bonferroni adjustment, in the same way in which, in the variable callus formation, it was used to declare significant differences between medium and collections.

RESULTS AND DISCUSSION

Plantation of anthers

The method used to disinfect anthers helped clean them 100% pollutant-free. Planting anthers intact gave the best results in terms of callus formation, because when they were cut longitudinally, they oxidized, turning brown, and although they produced a callus, it was small and its duration were short.

The above indicates that the integrity of the anther is important to the morphogenetic response, as observed by Pacheco-Sánchez *et al.* (2003) in *Solanum iopetalum* antherse. In *Lilium*, Clément and Audran (1995) found that the anther wall layers act as a physiological shock absorber, since it stores nutrients in starch grains, which helps the pollen grains germinate.

Con respecto a la proporción de anteras que formaron callo, las accesiones CP631 y CP633 mostraron los valores más altos (Figura 1). Por otro lado, de los medios de cultivo probados, los que indujeron el mayor porcentaje de anteras con callo fueron el A1, A2 y A4 (Figura 2).

Regarding the proportion of anthers that formed a callus, accessions CP631 and CP633 displayed the highest values (Figure 1). On the other hand, out of the crops medium tested, the ones that induced the greatest percentage of anthers with calluses were A1, A2 and A4 (Figure 2).

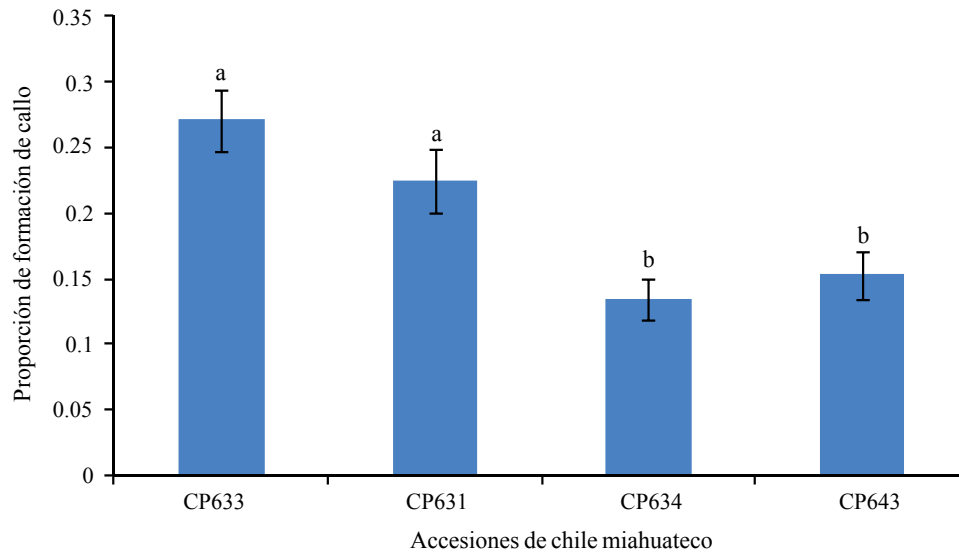


Figura 1. Diferencias estadísticas entre las proporciones de anteras que formaron callo, en cuatro accesiones de chile miahuateco (Bonferroni, $p < 0.05/4 = 0.0125$). Líneas verticales sobre las barras indican el error estándar.
Figure 1. Statistical differences between the proportions of anthers that formed calluses in four accessions of miahuateco chili peppers (Bonferroni, $p < 0.05/4 = 0.0125$).

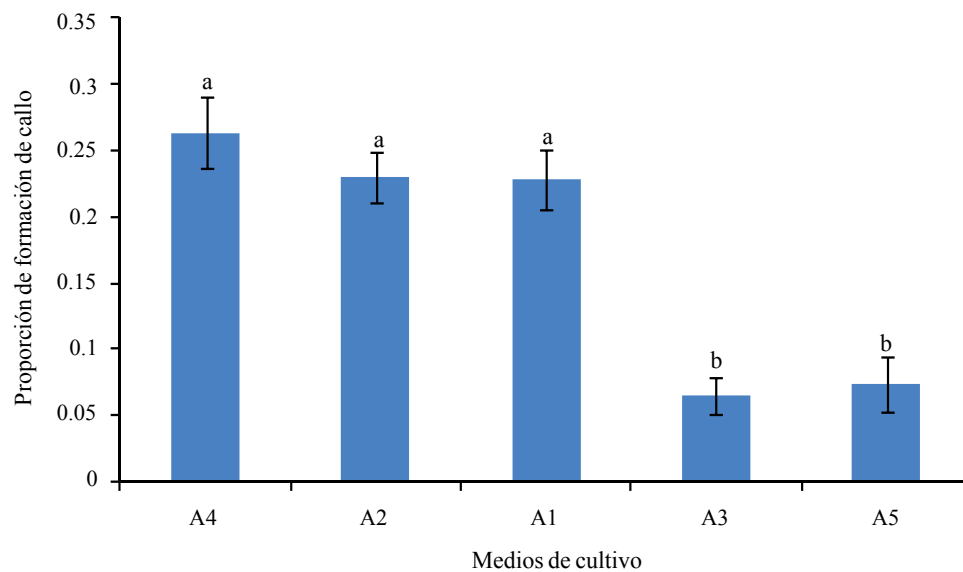


Figura 2. Diferencias estadísticas entre las proporciones de anteras de chile miahuateco, que formaron callo en cinco medios de cultivo (Bonferroni, $p < 0.05/5 = 0.01$). Líneas verticales sobre las barras indican el error estándar.
Figure 2. Statistical differences between the proportions of miahuateco chili anthers that formed calluses in, five culture media (Bonferroni, $p < 0.05/5 = 0.01$).

Respecto a la variable formación de embriones de acuerdo a la prueba exacta de Fisher con ajuste de Bonferroni, no se encontraron diferencias significativas entre los cinco medios de cultivo probados, tampoco en las cuatro accesiones utilizadas. Por otro lado, sólo los tratamientos A1-CP634 y A5-CP633 formaron embriones; el A1-CP634 produjo un embrión somático por antera y el A1-CP633 dos.

Dichos embriones se convirtieron en plántulas haploides después de dos semanas de cultivarse en el medio MD1 (Cuadro 3). Solamente se presentaron diferencias a $p < 0.0911$ en la comparación A5-CP633 (90 anteras) en relación a A2-CP643, debido a la mayor información que proporcionó el número de repeticiones (207 anteras) en este último tratamiento. De lo anterior, se podría inferir que, utilizando un mayor número de anteras sería posible encontrar diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos.

Regarding the variable of embryo formation according to Fisher's exact test with the Bonferroni adjustment, there were no significant differences between the five culture media tested, not the four accessions used. On the other hand, only treatments A1-CP634 and A5-CP633 formed embryos; A1-CP634 produced one somatic embryo per anther and A1-CP633 produced two.

These embryos became haploid plantlets after two weeks of being planted in the medium MD1 (Table 3). There were only differences at $p < 0.0911$ in the comparison of A5-CP633 (90 anthers) to A2-CP643, due to the greater information provided by the number of repetitions (207 anthers) in this last treatment. From this we could infer that with a larger number of anthers, it would be possible to find significant differences to other treatments.

Cuadro 3. Formación de callo y embriones en anteras de cuatro accesiones (CP631, CP633, CP634 y CP643), de chile miahuateco cultivadas en cinco medios de cultivo.

Table 3. Formation of callus and embryos in anthers of four accessions (CP631, CP633, CP634 and CP643), of miahuateco chili grown in five crop medium.

Medio de cultivo	Anteras sembradas (número)				Anteras con embriones (%)					
	CP631	CP633	CP634	CP643	Total	CP631	CP633	CP634	CP643	Total
A1	72	73	151	59	355	0	0	0.6	0	0.6
A2	60	64	143	207	474	0	0	0	0	0
A3	53	56	95	70	274	0	0	0	0	0
A4	69	78	96	68	311	0	0	0	0	0
A5	60	90	0	0	150	0	2.2	0	0	2.2
Total	314	361	485	404	1 564	0	2.2/2*	0.6/1*	0	2.8

*= número promedio de plantas haploides formadas por antera.

El hecho de que no todas las accesiones hayan formado embriones aun cuando se cultivaron en un mismo medio, podría deberse a la interacción del genotipo con el medio de cultivo. Este tipo de respuesta diferencial ha sido observado por otros autores (Achar, 2002; Koleva-Gudeva *et al.*, 2007). Asimismo, se encontraron diferencias en la respuesta de las anteras de una misma flor, pues no todas ellas formaron embriones, lo que pudo deberse a que el grado de desarrollo de las anteras del mismo botón floral no era homogéneo, tal como lo observaron Kim *et al.* (2004) en el cultivar Milyang-jare de Chile.

Al respecto, algunos autores han encontrado variación en el desarrollo del polen de una antera, de las anteras de una yema o de anteras de diferentes yemas en la misma estadía. Dicha asincronía también podría explicar la baja frecuencia de embriogénesis en las anteras de Chile miahuateco, pues al no

The fact that not all accessions formed embryos, even when planted in the same medium, could be due to the interaction of the genotype with the crop medium. This type of differential response has been observed by other authors (Achar, 2002; Koleva-Gudeva *et al.*, 2007). Likewise, there were differences in the response of anthers of a same flower, since not all formed embryos, which could be due to the degree of anther development in the same bud not being homogenous, as observed by Kim *et al.* (2004) in the Milyang-jare chili pepper cultivar.

Regarding this, some authors have found a variation in the production of pollen in an anther, in the anthers of a bud or of different buds in the same stage. This asynchrony could also explain the low frequency of embryogenesis in the miahuateco chili anthers, because the microspores of an

estar todas las microsporas de una antera sincronizadas en el mismo estado de desarrollo, posiblemente sólo algunas de ellas se encontraban en condiciones para formar embriones, o bien, pudo haber sucedido que muchos granos de polen murieron en el transcurso del cultivo *in vitro*, como lo observaron Kim *et al.* (2004) en anteras de *C. annuum* del cultivar Milyang-jare.

Un porcentaje de 2.4 en la regeneración de embriones fue obtenido con anteras del cultivar Slatko Luta de *C. annuum* por Koleva-Gudeva *et al.* (2007), valor cercano al encontrado en el presente trabajo en la accesión CP633 (2.23%). Por otro lado, Nowaczyk y Kisiala (2006) obtuvieron una frecuencia de androgénesis no mayor a 5% en los genotipos de *C. annuum* ATZ1, PO y el híbrido F1 de ambos. La baja frecuencia con la que se obtienen embriones somáticos haploides es una respuesta común en el cultivo de anteras de distintas especies; como en la mayoría de los casos este valor no excede al 0.01% (Polci *et al.*, 2004).

Cabe señalar que aun cuando de todos los medios probados, el medio A5 tenía la concentración más baja de reguladores de crecimiento, este logró inducir la formación de embriones, al igual que el medio A1 que contenía 10 veces más cantidad de estos compuestos.

La respuesta de las anteras en medios de cultivo con una diferencia en la concentración de reguladores tan amplia concuerda con lo que postulan Fehér *et al.* (2003), quienes consideran que la embriogénesis somática no puede definirse como una respuesta a los reguladores aplicados exógenamente, sino más bien que son los niveles hormonales endógenos los que primordialmente determinan la respuesta de las células a los estímulos que se generan en el cultivo *in vitro*; asimismo, sugieren que los cambios drásticos en el ambiente celular, tal como exponer las células o los tejidos a condiciones nutritivas u hormonales sub o supra óptimas como las que se manejan en el cultivo de anteras, generan efectos de estrés y que este puede causar la reorganización celular y cambio en el desarrollo para permitir la embriogénesis somática.

Los reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas, son los compuestos más involucrados en los cambios de desarrollo mediante la regulación de la división y diferenciación celular. La influencia de la aplicación de auxinas y citocininas exógenas en la embriogénesis somática ya se ha documentado por distintos autores (Dudits *et al.*, 1991; Yeung, 1995; Sagare *et al.*, 2000) y se corrobora con

anther synchronized in the same stage of growth, possibly only some of them were in conditions to form embryos, or many pollen grains could have died during the plantation *in vitro*, as observed by Kim *et al.* (2004) in *C. annuum* anthers of the Milyang-jare cultivar.

A percentage of 2.4 in the regeneration of embryos was obtained with anthers from the *C. annuum* Slatko Luta cultivar by Koleva-Gudeva *et al.* (2007), a value close to the one obtained in this work for accession CP633 (2.23%). On the other hand, Nowaczyk and Kisiala (2006) obtained a frequency of androgenesis no higher than 5% in the genotypes of *C. annuum* ATZ1, PO and the F1 hybrid of both. The low frequency with which haploid somatic embryos are obtained is a common response in the plantation of anthers of different species; like in most cases, this value does not surpass 0.01% (Polci *et al.*, 2004).

It is worth noting that even when, out of all the media tested, A5 had the lowest concentration of growth regulators, it managed to induce embryo formation, as well as medium A1, that contained 10 times the amount of these compounds.

The response of anthers in culture media with such a great difference in the concentration of regulators agrees with what Fehér *et al.* (2003) postulate when considering that somatic embryogenesis cannot be defined as a response to exogenously applied regulators, but instead, it is the endogenous hormone levels that determine cell response to stimuli produced in the plantation *in vitro*. Likewise, they suggest that drastic changes in the cell environment, such as exposing cells or tissues to nutrient or hormone conditions below or above the optimum, such as those in anther plantations, produce stressful effects, causing cellular reorganization and changes in development to permit somatic embryogenesis.

Growth regulators such as auxins and cytokinins are the compounds with the greatest involvement in the changes in development, with the regulation of cell division and differentiation. The influence of exogenous auxins and cytokinins in somatic embryogenesis has been documented by different authors (Dudits *et al.*, 1991; Yeung, 1995; Sagare *et al.*, 2000), and is corroborated by the results of the present work, in which combining two auxins (2,4-D and ANA) with a cytokinin (kinetin) brought about the formation of somatic embryos.

los resultados del presente trabajo, en donde combinar dos auxinas (2,4-D y ANA) con una citocinina (cinetina) originó la formación de embriones somáticos.

Aún cuando los medios A1 y A5 indujeron la formación de embriones somáticos, el patrón de desarrollo que se observó en cada uno de ellos fue diferente; las anteras cultivadas en el medio A1 tuvieron como primera respuesta la formación de callos y fue hasta después de cuatro semanas de cultivar estos callos en el medio MD1 (nueve semanas de iniciar el cultivo) que apareció la primera planta, en la cual se podían observar los cotiledones, el hipocótilo y la raíz. En contraste, las anteras cultivadas en el medio A5 formaron embriones sin una fase de callo y estos fueron evidentes a la quinta semana de que éstas se colocaron en dicho medio (Figura 3A).

La formación directa de embriones a partir del polen observada al emplear el medio A5, podría representar una ventaja al reducir la posible variación somaclonal frecuentemente asociada a la producción de callo previa a la embriogénesis. Además, bajo estas condiciones el tiempo para obtener plantas haploides es menor al no requerir la formación de callo.

Después de 15 semanas de cultivo las plantas regeneradas se desarrollaron con la morfología típica de una planta de chile miahuateco, pero menos vigorosas que las diploides, característica que también observaron Bárány *et al.* (2005) en plantas haploides del cultivar Yolo Wonder B de *C. annuum*. La falta de vigor es común en plantas haploides y se atribuye principalmente a la disminución en el tamaño celular (Polci *et al.*, 2004).

Análisis cromosómico, desarrollo y multiplicación de plantas

El análisis cromosómico de las microplantas regeneradas reveló que éstas tenían un número cromosómico $2n = x = 12$; es decir, eran plantas haploides (Figura 3C). Las plantas tratadas con colchicina que crecieron en el invernadero alcanzaron la etapa de floración (Figura 3D).

Cultivar los ápices de vástago de las plantas haploides regeneradas en un medio MM, promovió la diferenciación de 2 a 3 nuevos brotes a partir de cada ápice (Figura 3B). Los brotes regenerados formaron raíces cuando se cultivaron en un medio que contenía AIB (ME) para dar lugar a una nueva planta.

Although media A1 and A5 induced the formation of somatic embryos, the growth pattern observed in each was different; the response of anthers planted in medium A1 was the formation of calluses and only four weeks after planting these calluses in medium MD1 (nine weeks after plantation began) did the first plant appear, which showed cotyledons, the hypocotyl and the root. In contrast, anthers planted in medium A5 without a callus phase, and they became evident five weeks after they were placed in the medium (Figure 3A).

The direct formation of embryos from the pollen observed when using medium A5 could be an advantage, since it reduces possible somaclonal variation, frequently related to the production of calluses before embryogenesis. It is also under these conditions that the time to obtain haploid plants is less, since callus formation is not required.

Fifteen weeks after plantation, the regenerated plants developed with the typical morphology of a miahuateco chili plant, yet less vigorous than diploids; this feature was also observed by Bárány *et al.* (2005) in haploid plants of the *C. annuum* Yolo Wonder B cultivar. Lack of vigor is common in haploid plants and is due mostly to reduction in cell size (Polci *et al.*, 2004).

Chromosomal analysis, development and plant multiplication

The chromosomal analysis of microplants revealed that they had a chromosome number $2n = x = 12$; that is, they were haploid plants (Figure 3C). Plants treated with colchicine that grew in the greenhouse reached the flowering period (Figure 3D).

Planting the shoot tips of haploid plants regenerated in a medium MM, promoted the difference of 2 to 3 new sprouts from each apex (Figure 3B). The regenerated sprouts formed roots when planted in a medium that contained AIB (ME) to give rise to a new plant.

After analyzing chromosome numbers of the plants regenerated from the apices of haploid plants, it was found that they had the same haploid number ($2n = 12$) of chromosomes as those that gave rise to them. Being able to multiply the number of haploid plants by the plantation of apices would help make up for the low frequency of embryogenesis obtained with the plantation of anthers.

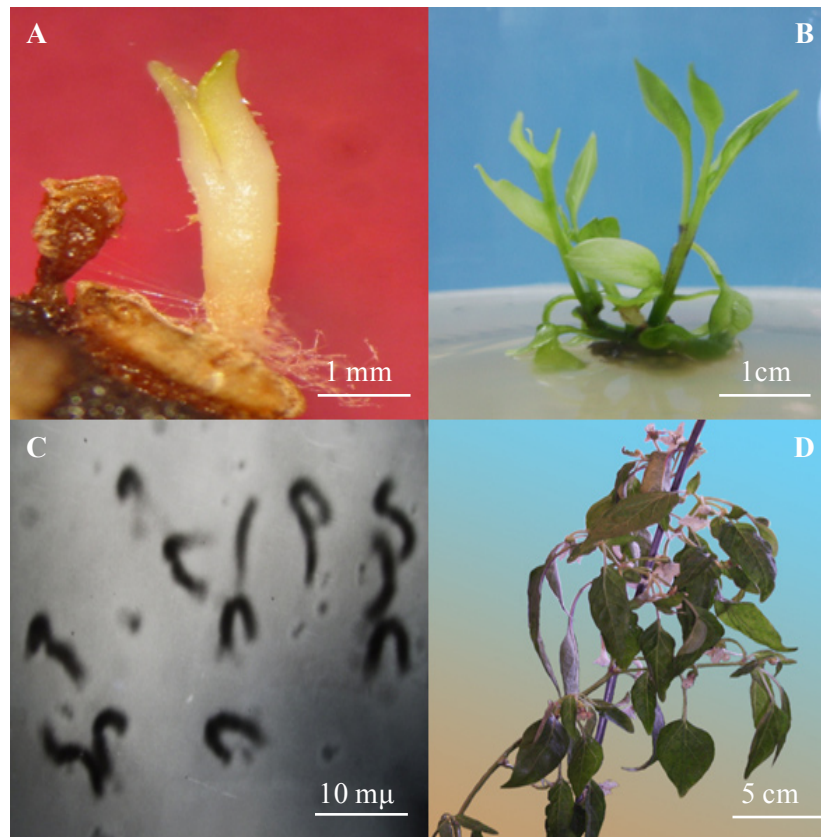


Figura 3. Regeneración de plantas haploides de chile miahuateco: A) embrión en etapa cotiledonal; B) brotes regenerados a partir de ápices de plantas haploides en el medio MM; C) cromosomas mitóticos de una planta haploide ($2n= x= 12$); D) planta presuntamente doble haploide en floración, obtenida del cultivo de anteras y sometida a tratamiento con colchicina.

Figure 3. Regeneration of miahuateco chili haploid plants de chile miahuateco: A) embryo in cotyledonal stage; B) sprouts regenerated from haploid plant apices in medium MM; C) mitotic chromosomes from a haploid plant ($2n= x= 12$); and D) allegedly double haploid plant in bloom, obtained from the growing of anthers and subjected to a treatment with colchicine.

Después de analizar el número cromosómico de las plantas regeneradas a partir de los ápices de plantas haploides, se encontró que poseían un número haploide ($2n= x= 12$) de cromosomas igual a las que les dieron origen. El hecho de poder multiplicar el número de plantas haploides por el cultivo de ápices, permitiría compensar la baja frecuencia de embriogénesis obtenida con el cultivo de anteras.

El protocolo desarrollado permitió, después de nueve semanas de iniciar el cultivo de las anteras, obtener plantas haploides de chile miahuateco. Estas plantas fueron capaces de producir flores 25 días después del tratamiento con colchicina; sin embargo, no fue posible confirmar la duplicación de su número cromosómico (doble haploide) debido a la muerte prematura de las mismas.

The protocol developed helped produce miahuateco chili haploid plants nine weeks after anther plantation began. These plants were able to produce flowers 25 days after the treatment with colchicine; however, it was not possible to confirm the duplication of its chromosome number (double haploid) due to their premature deaths.

The present protocol is a contribution to the development of the methodology for obtaining double haploid lines, which could be used in the genetic studies of desirable characteristics (Aleza *et al.*, 2003), and there must even be, as pointed out by Dolcet-Sanjuan and Clavería (2003), lines produced to obtain commercial hybrids of chili peppers.

El presente protocolo contribuye al avance en el desarrollo de la metodología para la obtención de líneas doble haploides que podrían ser utilizadas en los estudios genéticos de características deseables (Aleza *et al.*, 2003), e incluso, tal como lo señalan Dolcet-Sanjuan y Clavería (2003), se deben producir líneas para obtener híbridos comerciales de Chile.

CONCLUSIONES

El protocolo desarrollado permitió regenerar plantas haploides de Chile mihuateco a partir del cultivo de anteras. La baja frecuencia de embriogénesis somática de las anteras puede incrementarse mediante una fase de multiplicación.

LITERATURA CITADA

- Achar, P. N. 2002. A study of factors affecting embryo yields from another culture of cabbage. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 69:183-188.
- Aguilar, R. V. H.; Corona, T. T. y Morán, B. S. H. 2006. Chiles nativos (*Capsicum* spp. Solanaceae) de los estados de Puebla y Morelos. *In: López, L. P. y Montes, S. (eds). Avances de investigación de la red de hortalizas del SINAREFI. Campo Experimental Bajío. INIFAP. Celaya, México. Libro científico. Núm. 1. 28-58 pp.*
- Aleza, P.; Juárez, P.; Olivares, O. y Navarro, L. 2003. Obtención de plantas haploides y dihaploides de clementino (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan). *In: V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Memoria. Pamplona, España. 29 p.*
- Bárany, I.; Testillano, P. S.; Mitykó, J. and Risueño, M. C. 2001. The switch of the microspore development program in *Capsicum* involves HSP70, expression and leads to the production of haploid plants. *Int. J. of Dev. Biol.* 45(S1):S39-S40.
- Bárany, I.; González-Melendi, P.; Fadón, B.; Mitykó, J.; Risueño, M. C. and Testillano, P. S. 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol. Cell.* 97:709-722.
- Clément, C. and Audran, J. C. 1995. Another wall layers control pollen sugar nutrition in *Lilium*. *Protoplasma.* 187:172-181.

CONCLUSIONS

The protocol developed helped regenerate mihuateco chili pepper haploid plants from the plantation of anthers. The low frequency of somatic embryogenesis of anthers can be increased by a multiplication phase.

End of the English version



- Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Hsü, C.; Yin, K. C.; Chu, C. Y. and Bi, F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 18:659-668.
- Dolcet-Sanjuan, R.; Clavería, E. and Huerta, A. 1997. Androgenesis in *Capsicum annuum* L. Effect of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122:468-475.
- Dolcet-Sanjuan, R. y Clavería, E. 2003. Obtención de líneas puras dihaploides en especies hortícolas. *In: V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Memoria. Pamplona, España. 8-9 p.*
- Duijs, J. G.; Voorrips, R. E.; Visser, D. L. and Custers, J. B. M. 1992. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica.* 60:45-55.
- Dudits, D.; Bögre, L. and Györgyey, J. 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *J. Cell Sci.* 99:473-482.
- Fehér, A.; Pasternak, T. P. and Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74:201-228.
- García, V. A. 1990. Técnicas y procedimientos de citogenética vegetal. 3^{ra} edición. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 144 p.
- González, J. M. y Jouve, N. 2003. Estudio del desarrollo de las microsporas en la androgénesis *in vitro* de triticale (*Triticosecale* Wittmack). *In: V Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Memoria. Pamplona, España. 39 p.*
- Jauhar, P. P. 1993. Citogenetics of the festuca-lolium complex. Springer-Verlag. New York, USA. 255 p.

- Kim, M. and Jang, I. C. 2001. Cytological analysis of microspores during temperature pretreatment in another culture of *Capsicum annuum* L. Korean J. Plant Tissue Cult. 28:263-271.
- Kim, M.; Kim, J.; Yoon, M.; Choi, D. I. and Lee, K. M. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell Tissue Organ Cult. 77:63-72.
- Koleva-Gudeva, L. R.; Spasenoski, M. and Trajkova, F. 2007. Somatic embryogenesis in pepper anther culture: the effect of incubation treatments and different media. Sci. Hortic. 111:114-119.
- Laborde, C. J. A. y Pozo, C. O. 1982. Presente y pasado del chile en México. SARH. INIA. México. 80 p.
- Maraschin, S. F.; Priester, W.; Spink, H. P. and Wang, M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from male gametophyte perspective. J. Exp. Bot. 56:1711-1726.
- Morán, B. S. H. 2008. Caracterización biológica de chiles criollos (*Capsicum annuum* L.) del sur del estado de Puebla. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 89 p.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nowaczyk, P. and Kisiala, A. 2006. Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. J. Appl. Gen. 47:113-117.
- Oliver, M.; García-Mas, J.; Morales, M.; Dolcet-Sanjuan, R.; Vicente, M.; Gómez, H.; Leeuwen, H.; Monfort, A.; Puigdomènech, P. and Arús, P. 2000. The spanish melon genome project: construction of a saturated genetic map. Acta Hortic. 510:375-378.
- Pacheco-Sánchez, M.; Lozoya-Saldaña, H. y Colinas-León, M. T. 2003. Reguladores de crecimiento y pretratamiento con frío en la androgénesis *in vitro* de *Solanum iopetalum* L. Agrociencia. 37:257-265.
- Polci, P.; Conti, V. y Miranda, R. 2004. Obtención de plantas doblehaploides. In: Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. (eds). Biotecnología y mejoramiento vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. 137-148 p.
- Robledo-Paz, A. y Carrillo-Castañeda, G. 2004. Regeneración *in vitro* de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. Rev. Fitotéc. Méx. 27:121-126.
- Sagare, A. P.; Lee, Y. L.; Lin, T. C.; Chen, C. C. and Tsay, H. S. 2000. Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) a medicinal plant. Plant Sci. 160:139-147.
- Satistical Analysis System Institute (SAS). 1999. SAS/STAT. User's Guide. Version 8.1. SAS Publishing, Cary, N. C. 3848 p.
- Supena, E. D. J.; Suharsono, S.; Jacobsen, E. and Custers, J. B. M. 2006. Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep. 25:1-10.
- Yeung, E. C. 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis in plants. In: *in vitro* embryogenesis in plants. Thorpe, T. A. (ed). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 205-248 p.