



Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán

Tomás González Estrada · José Juan Zúñiga Aguilar · Felipe Vázquez Flota



*Mejoramiento genético del
chile habanero de la Península de Yucatán*

Tomás González Estrada
Director del Libro
José Juan Zúñiga Aguilar | Felipe Vázquez Flota
Coordinadores

Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán

Tomás González Estrada
Director del Libro

José Juan Zúñiga Aguilar | Felipe Vázquez Flota
Coordinadores



Mérida, Yucatán, México
2018

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Directorio

Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Téyer
Director General

Dr. Pedro Iván González Chi
Director de Investigación

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Dr. Manuel L. Robert Díaz
Director de Gestión Tecnológica

Dr. José Manuel Cervantes Uc
Director de Planeación y Gestión

M.A. Lesvia del Carmen Chalé Novelo
Directora Administrativa

Esta obra se editó con apoyo FOMIX.

D.R. © Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2018

Integrante del Sistema de Centros Públicos de Investigación Conacyt

Calle 43 Núm. 130 x 32 y 34, Col. Chuburná de Hidalgo,
CP 97200, Mérida, Yucatán, México
Tel.: (01 999) 942 83 30
www.cicy.mx

ISBN 978-607-7823-39-1 libro digital



Editado en Mérida-México
Made in Merida-Mexico

Presentación



El cultivo del chile habanero en la Península de Yucatán ha sido una actividad favorecida por diferentes circunstancias a lo largo de la historia reciente. No siendo una especie originaria de México, las condiciones agroclimáticas de la región, derivadas mayoritariamente por el impacto del meteorito de Chicxulub, propiciaron un nicho de diversidad genética aprovechado de manera empírica y magistral por los productores de traspatio para generar una multiplicidad de formas, colores, sabores y niveles de pungencia de los frutos del chile habanero, convirtiendo a este cultivo en un elemento distintivo de la cultura peninsular. La estrecha relación entre las condiciones del medio ambiente y las características agronómicas del chile habanero es tan distintiva e indisoluble que de manera natural propiciaron el otorgamiento de lo que constituye su acta de naturalización como un producto mexicano, la Denominación de Origen “Chile Habanero de la Península de Yucatán”.

El pujante crecimiento en los ámbitos económico y cultural, en el sector educativo de nivel superior, así como en la investigación científica y técnica en Yucatán, ha contribuido también de manera directa al fortalecimiento de los diversos eslabones de la cadena de valor del chile habanero. Específicamente, los resultados de la investigación científica han incidido favorablemente para conseguir el reconocimiento y la apropiación de la semilla de las variedades criollas, para la generación del entendimiento lógico de los sistemas de producción y consumo, así como los modelos de comercialización en los niveles nacional e internacional.

Las investigaciones en el sector científico, desarrolladas por diversas universidades e instituciones de investigación ubicadas en el estado de Yucatán, han sido determinantes para el mejoramiento de prácticamente todas las actividades relacionadas con el cultivo e industrialización del chile habanero. Así, con sus investigaciones sobre diferentes temáticas del chile habanero, la Universidad Autónoma de Yucatán, el Instituto Tecnológico de Mérida, el Instituto Tecnológico de Conkal, el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), entre otras instituciones, han contribuido al establecimiento de la mayor masa crítica a nivel mundial para el estudio integral de la cadena de valor del chile habanero.

Una de las instituciones que comprometieron sus actividades de investigación para apoyar al sector productivo del chile habanero fue el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), mediante la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP). En esta Unidad, con la idea visionaria del Dr. Armando Escamilla Bencomo, entonces director de la UBBMP, se estableció desde principios de la década pasada un proyecto estratégico cuya meta es la aplicación del conocimiento científico para la mejora de las variedades criollas del chile habanero. Mediante el establecimiento de este proyecto estratégico, los investigadores de la UBBMP decidieron iniciar proyectos en respectivas líneas de investigación científica.

La presente obra presenta una recopilación de las investigaciones en los niveles básico y aplicado desarrollados en los primeros diez años del proyecto estratégico. Los trabajos atienden diferentes aspectos relacionados con la influencia de factores internos y del medio ambiente sobre aspectos bioquímicos, genéticos, fisiológicos y moleculares que en su conjunto permiten entender el desarrollo integral de la planta y su adecuación al medio ambiente. Las actividades de la UBBMP derivadas de este proyecto coadyuvaron a incrementar los índices de productividad estatal con relación a estudios del chile habanero, observados a partir del año 2003, en el número de investigaciones financiadas con recursos externos, el número de publicaciones de investigación original en revistas internacionales indizadas, el número de presentaciones magistrales en congresos nacionales e internacionales, así como en la generación de recursos humanos altamente capacitados en los niveles de Licenciatura, Maestría y Doctorado.

Los impactos de las investigaciones presentadas en esta obra pueden ubicarse en los ámbitos ecológico, social, comercial, industrial y científico-tecnológico. La generación del mayor banco de germoplasma de variedades criollas, el registro de nuevas variedades, la construcción del mayor banco de genes del chile habanero, el establecimiento de procesos de proliferación clonal, así como la construcción de las instalaciones para el procesamiento de semilla de alta calidad, únicas en América Latina por la tecnología empleada, representan productos de transferencia tecnológica. Mientras que por su amplitud y variedad de áreas de estudio, los resultados aportados por la UBBMP representan en su conjunto un aporte invaluable para el conocimiento científico universal y constituyen herramientas robustas que se encuentran a disposición de grupos de investigación, de fitomejoradores y de biotecnólogos.

Dr. Raúl Godoy Montañez
Secretario de Investigación, Innovación
y Educación Superior del Estado de Yucatán



Introducción Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Téyer	13
Sección I	
El chile habanero cultivado en la Península de Yucatán	15
Capítulo 1 El chile habanero en la cultura peninsular	17
Capítulo 2 La caracterización bioquímica y molecular del germoplasma de chile habanero de la Península de Yucatán para su mejoramiento genético: un proyecto estratégico	25
Sección II	
Los recursos genéticos	35
Capítulo 3 Caracterización de los recursos genéticos de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. en la Península de Yucatán	37
Capítulo 4 Los recursos genéticos de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. en la Península de Yucatán. Caracterización de variedades “criollas” de chile habanero	45
Capítulo 5 Procedimientos para la certificación de semillas y el registro y obtención del título de obtentor de variedades vegetales	53
Sección III	
La interacción con el medio ambiente	65
Capítulo 6 Mejoramiento genético de chile habanero: selección y registro de variedades mejoradas	67
Capítulo 7 El efecto de ácido salicílico en la bioproductividad de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	77

Capítulo 8 Las principales plagas en chile habanero y su manejo en la Península de Yucatán	87
Capítulo 9 Desarrollo del sistema radical de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) durante las fases iniciales de postransplante	97
Capítulo 10 Regulación celular en respuesta a ambientes fluctuantes de nitrógeno en el suelo: chile habanero como modelo de estudio	109
Capítulo 11 Absorción de potasio en raíces de plántulas de <i>Capsicum chinense</i> Jacq. y su relación con cloruro de cesio y tetraetilamonio	123
Capítulo 12 Comportamiento del desarrollo radicular del chile habanero en presencia de aluminio	137
Capítulo 13 Aislamiento de hongos y bacterias a partir de plantas de chile habanero cultivadas en distintos municipios del estado de Yucatán	157
Capítulo 14 Proteínas antimicrobianas, una bioprospección en chile habanero y generación de herramientas bioquímicas para su estudio	165
Capítulo 15 El papel de los reguladores del crecimiento vegetal en la defensa del chile habanero contra microorganismos patógenos	179
Capítulo 16 La regulación molecular de las respuestas de defensa del chile habanero contra microorganismos patógenos	189
Capítulo 17 Tratamientos de termoterapia en semillas de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) infectadas con virus de ARN	199
Capítulo 18 Variación intragenómica de la región ITS1-RNAr 5.8S-ITS2 en <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	209
Sección IV	
El metabolismo secundario	219
Capítulo 19 Estudios sobre metabolismo nitrogenado en placentas de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	221
Capítulo 20 Inmovilización de placentas de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	231

Capítulo 21 Patrones proteicos de proteínas extracelulares en cultivos hidropónicos de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	239
Capítulo 22 El uso de los cultivos <i>in vitro</i> para el estudio de la síntesis de capsaicina en chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	249
Capítulo 23 Estudio de la señalización fosfolipídica en la regulación de la producción de vainillina inducida por el ácido salicílico en suspensiones celulares de <i>Capsicum chinense</i> Jacq.	261
Sección V	
Los desarrollos biotecnológicos	267
Capítulo 24 Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) de la Península de Yucatán	269
Capítulo 25 Análisis microscópico de la interacción <i>Phytophthora capsici-Capsicum chinense</i> Jacq. durante la inducción de resistencia	281
Capítulo 26 Aislamiento de genes de chile habanero de interés agroindustrial	293
Capítulo 27 La transformación estable del gen TPS1 y su efecto en chile habanero	307
Capítulo 28 La transformación temporal para estudiar la resistencia contra enfermedades causadas por microorganismos patógenos	317
Capítulo 29 Producción académica del Centro de Investigación Científica de Yucatán sobre el chile habanero que se cultiva en la Península de Yucatán	329
Índice de autores	371

Introducción

Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Téyer
Director General
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.



El Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), consciente de su papel ante la sociedad y de las necesidades del campo en el sureste del país, ha participado en la generación de conocimiento científico y tecnológico orientado hacia los cultivos y encadenamientos productivos de importancia para la región.

En este sentido, los investigadores del CICY han contribuido con estudios relevantes al cultivo del chile habanero mediante la generación de ciencia básica y aplicada, que permitió el desarrollo de nuevas variedades. Cabe destacar la participación de los investigadores, técnicos e ingenieros, que realizaron el trabajo coordinado que posibilitó poner a disposición de los productores las nuevas variedades, mediante la producción de semilla mejorada en cantidad y calidad suficiente para abastecer las demandas local y regional. Resultado de este esfuerzo condujo a la creación de la Unidad Productora de Semillas en el Parque Científico Tecnológico de Yucatán en Sierra Papacal. El CICY ha contribuido a formar recursos humanos a diferentes niveles académicos, desde la licenciatura hasta el doctorado y el postdoctorado, que se han integrado a diversas instituciones de educación superior, centros de investigación y empresas de la región sureste. Son numerosas las tesis de grado sobre chile habanero que han generado los estudiantes bajo la dirección de los investigadores del Centro y los artículos arbitrados publicados en revistas internacionales y nacionales.

En su momento, los investigadores del CICY contribuyeron a la gestión de la Denominación de Origen del Chile Habanero de la Península de Yucatán y a la creación de Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y de normas internacionales del *Codex Alimentarius* y de la Comisión Económica para Europa (CEPE).

El presente libro representa el esfuerzo conjunto de casi quince años de investigación llevada a cabo por el personal académico del CICY y da cuenta de las colaboraciones establecidas con otras instituciones durante este periodo. La obra incluye temas relacionados con los Recursos Genéticos, la Interacción con el Medio Ambiente, el Metabolismo Secundario y los Desarrollos Biotecnológicos del Chile Habanero. En este sentido deseo agradecer a las diversas instancias como el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, el Gobierno del Estado de Yucatán, a través de la Secretaría de Investigación, Innovación y Educación Superior, y del Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Yucatán, por su valioso apoyo y compromiso a lo largo de más de una década, mismos que hicieron posible la realización de esta obra.





Sección I 

El chile habanero cultivado en la Península de Yucatán



El chile habanero en la cultura peninsular

Capítulo 1

Tomás Augusto González Estrada,*
Luis Carlos Gutiérrez Pacheco y Fernando A. Contreras Martín
*Autor responsable: tge@cicy.mx



Resumen

El chile habanero no tiene origen mexicano pero, al igual que muchos otros extranjeros, ha adquirido carta de naturalización después de conocer nuestra tierra. Proveniente de la cuenca del Amazonas, *Capsicum chinense* ha encontrado un nicho ecológico en la Península de Yucatán, en donde ha desarrollado una interesante diversidad genética. El arraigo de este cultivo a la cultura peninsular ha permeado hacia diversos estratos sociales, incluido el popular, el productivo, el empresarial, el gubernamental y el científico. Cada uno de estos sectores ha contribuido a hacer sentir al chile habanero nativo de estas tierras; particularmente el sector productivo, pues fue en los traspatios y las pequeñas parcelas donde el agricultor peninsular generó una riqueza botánica tan importante que, además de convertirse en un elemento representativo de la cocina y la cultura regional, le ha valido en la actualidad el otorgamiento de una Denominación de Origen y el constituirse como una promesa para el desarrollo económico de la región.

Palabras clave

Chile habanero, variedades criollas, diversidad genética

Origen y dispersión prehispánica del chile habanero

El chile habanero proviene de las tierras bajas de la cuenca amazónica y de ahí se dispersó a Perú durante la época prehispánica. La distribución también se dirigió hacia la cuenca del Orinoco (ubicada actualmente en territorios de Colombia y Venezuela) hacia Guyana, Surinam, Guyana Francesa y las Antillas del Caribe. Se ha sugerido que la introducción prehispánica

del chile habanero en el Caribe se debió a migraciones indígenas de agricultores y alfareros procedentes de Sudamérica, pertenecientes a grupos arahuacos (originarios de Puerto Rico) que viajaron por las Antillas Menores hasta llegar a Puerto Rico, La Española (República Dominicana y Haití), Jamaica y Cuba, entre los años 250 d.C. y 1,000 d.C.⁽¹⁾

Algunos estudios con ADN señalan que en Puerto Rico y República Dominicana las migraciones precolombinas de indígenas procedentes del Amazonas corresponde-

rían a las tribus de yanomamos y crajos, que aún hoy en día continúan habitando en las regiones del Amazonas y del Orinoco.⁽²⁾

La llegada del chile habanero a Yucatán

¿Cómo y cuándo hizo su aparición el chile habanero en Yucatán y por qué le dieron este nombre? Es difícil responder estas preguntas debido a la falta de registros arqueológicos o fuentes escritas.

La llegada del *C. chinense* a la Península de Yucatán antes de la conquista europea es poco probable;⁽³⁾ sin embargo, investigaciones recientes reportan evidencia del contacto precolombino vía marítima, entre los tainos (aborígenes de Puerto Rico) y los mayas del periodo clásico.

Otra teoría de la incursión temprana del chile habanero a Yucatán señala que pudo haber sido por vía terrestre a través de nexos comerciales, pues a la llegada de Colón a las Antillas, en 1492, los tainos –descendientes de los arahuacos– ya consumían ají (chile), según lo señala dicho personaje en las notas de su primer viaje a América.⁽⁴⁾

En el siglo XVI, Diego de Landa reporta el consumo del chile entre los mayas:

...Que también tuestan el maíz, lo muelen y deslíen en agua, que es muy

fresca bebida, echándole un poco de pimienta de indias (chile) o cacao. Por la mañana toman la bebida caliente con pimienta (chile), como está dicho, y entre día, las otras (bebidas) frías, y a la noche los guisados; y que si no hay carne hacen sus salsas de la pimienta (chile) y legumbres.

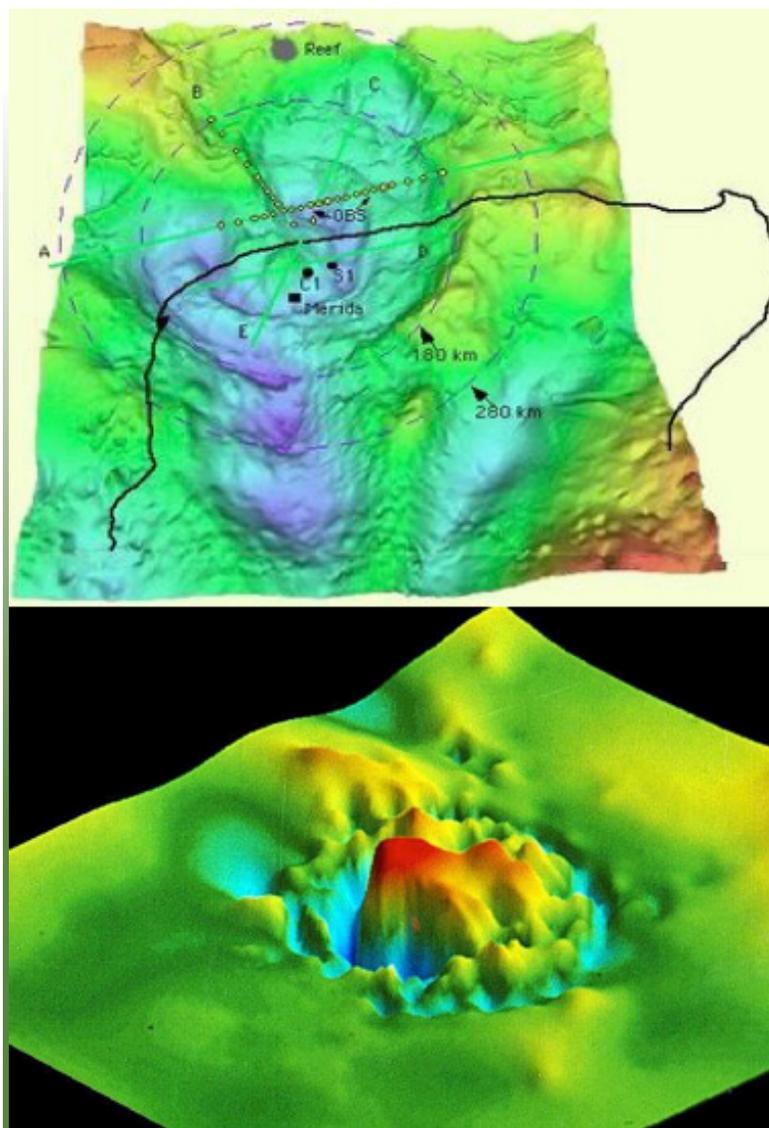
Si bien el testimonio no especifica de qué variedad de chile se trata, deja claro su consumo tradicional. Pero a falta de una evidencia tangible sobre la introducción prehispánica del chile habanero a la Península de Yucatán, se ha planteado otra hipótesis que apoya su llegada posterior a la Conquista. Al respecto, se argumenta la prueba lingüística de que no existe un término en lengua maya para identificar el chile habanero como los hay para otros chiles de la zona, como el *xcat-ik*, *yaax-ik*, *chawa-ik*, *maax-ik* y otros. De aquí se desprende la creencia más extendida de que tanto el fruto como el nombre provengan de los comerciantes españoles que lo trajeron a la Península desde Cuba en épocas más recientes.⁽³⁾

Los ecotipos criollos del chile habanero

Independientemente de cuál haya sido la vía de entrada a la Península, es un hecho que el chile habanero encontró en Yucatán ciertas condiciones especiales que le permitieron adaptarse y diversificarse en un entorno muy diferente al de su origen. Estas condiciones son producto de una serie de factores climáticos (altas tem-

peraturas, escasa precipitación pluvial) y edafológicos (suelo con poca materia orgánica, formado por las deposiciones marinas acumuladas a lo largo de 65 millones de años en el cráter formado luego del impacto de un meteoro en el actual municipio de Chicxulub, Yucatán).

Figura 1
**Representación del área de impacto
 del meteoro en la Península de Yucatán**



Las imágenes fueron desarrolladas con base en estudios (a) gravimétricos terrestres y (b) de campo magnético (<http://www.icdp-online.de/html/sites/chicxulub/news/news.html>.)

Debido a lo anterior, en la Península de Yucatán existe un gran número de ecotipos originados por la diversificación de las especies introducidas (*chinense*) y las nativas (*annuum*),⁽¹⁰⁾ y que actualmente se conocen como criollos. Sin embargo, se

desconoce el número existente de ecotipos como tal. Latournerie *et al.* (2001) realizaron una colecta de 102 poblaciones de chiles criollos en Yaxcabá, Yucatán, que resultó en la identificación de siete variedades pertenecientes a la especie *annuum*

(chile dulce, *yaax ic*, *xcat'ic*, pico paloma, *cha'hua*, *sucurre* y *maax*), y una en la especie *chinense* (habanero). Actualmente se encuentran disponibles comercialmente algunas variedades de chile habanero que

fueron seleccionadas por alguna característica deseable, principalmente resistencia a plagas, tamaño de fruto, picor, color, etcétera.

Anatomía del fruto del chile habanero

El fruto del chile habanero es una baya hueca en forma de trompo, poco carnosa, con dos y hasta ocho hojas modificadas, que constituyen el aparato reproductor femenino de la flor y se denominan carpelos.

El fruto es muy picante y aromático, su color antes de alcanzar la madurez generalmente es verde; sin embargo, cuando madura puede presentar variantes de color amarillo, naranja, rojo, morado o café. Las paredes que dividen el interior del fruto son incompletas y en el extremo inferior se unen para formar unas estructuras membranosas que comúnmente se denominan venas, las cuales se insertan en la

placenta, la cual es de color blanco amarillento y de apariencia esponjosa.

La placenta es el lugar donde se sintetizan los capsaicinoides (son los alcaloides responsables del sabor picante de todo chile), principalmente la capsaicina y la dihidrocapsaicina.

Los capsaicinoides en frutos maduros solo se sintetizan en las células de la superficie de la placenta, los cuales se especializan como glándulas que segregan estos compuestos, depositándolos en las semillas y paredes de la capa más interna de la pared frutal llamada endocarpio.

Figura 2

Diversidad genética del chile habanero



Se muestran algunas de las variedades más representativas del chile habanero cultivado en la Península de Yucatán.

El cultivo del chile habanero en Yucatán

En este estado, la siembra puede efectuarse en cualquier temporada del año con el riego adecuado; pero la temporada de lluvias (junio-septiembre) reviste especial importancia, pues las temperaturas, humedad y luminosidad favorecen mayores rendimientos. Sin embargo, este sistema de siembra de temporal está sujeto a la presencia de plagas y enfermedades que, sin un adecuado control, pudieran ocasionar pérdidas en la producción.

Las semillas de chile habanero no se siembran directamente en el suelo. Los agricultores tradicionales aún germinan sus semillas en sitios especiales llamados almácigos que pueden estar al nivel del suelo o elevadas del mismo (conocidos como canché) y protegidos con casa-sombras, los cuales ofrecen condiciones muy favorables de suelo, luz y agua para posibilitar un buen crecimiento de los brotes, para obtener las llamadas plántulas, que se trasplantan al sitio de cultivo. Actualmente, los almácigos en suelo están siendo sustituidos por charolas de poliestireno que permiten un mejor control fitosanitario de las plántulas.

El terreno adecuado para la siembra es un sitio no susceptible a inundaciones; en caso de contener vegetación alta y abundante ésta será cortada y quemada. Por otro lado, si el terreno es de uso continuo, en vez de quemar es conveniente aplicar herbicidas desecantes, y si se trata de suelos mecanizados es necesario hacer un surco de 20 a 25 cm de profundidad para permitir el desalojo de agua.

En Yucatán predominan los cultivos en superficies pequeñas y pedregosas denominadas mecates, que son unidades de superficie de 400 m² (20 x 20 m), en los cuales, con apoyo oficial, algunos productores han cultivado superficies de varias hectáreas en suelos pedregosos y, actualmente, se empieza a promover el cultivo en estructuras protegidas.

La superficie de cultivo de chile habanero en el estado oscila entre las 250 y 400 hectáreas (SIAP, 2010-2012) y los rendimientos varían entre ocho y doce toneladas por hectárea (ton/ha), en suelos pedregosos al norte del estado, y de 10 a 15 ton/ha en suelos mecanizados al sur.

Usos culinarios tradicionales del chile habanero

El consumo del chile habanero está muy arraigado entre los habitantes de la Península de Yucatán; se ha constituido en ingrediente de numerosos platillos y recetas que le han dado fama nacional e internacional a la comida yucateca.

La manera más simple de consumirlo es fresco, pero también se prepara asado, macerado o picado en pequeños trozos aderezado con sal y limón, listo para agregarlo a distintos platillos como la cochini-

ta pibil, el lechón al horno, los papadzules, el puchero, el frijol con puerco, el relleno negro, el queso relleno, el escabeche de Valladolid y los tacos, entre otros guisos.

Y aunque no hay un término maya para el chile habanero, existe uno para la salsa que se prepara con tomate, cebolla, cilantro, chile habanero y jugo de naranja agria o limón: *Xni-pec*, que se traduce como "nariz mojada de perro", sugiriendo que la salsa es tan picante que provoca el flujo nasal.⁽³⁾

Usos industriales del chile habanero en Yucatán

Este fruto ocupa un lugar principal entre los productos agrícolas de Yucatán. Tradicionalmente, se vende fresco para consumo directo o como una materia prima para preparar salsas picantes, pero también existen diferentes empresas en el mercado que se encargan de procesarlo y distribuirlo tanto en el país como en el extranjero, en forma de chile seco entero, en polvo, para producir pasta, y chile seco en hojuelas o en conserva, entre otras presentaciones. Sin embargo, el incremento en la demanda del chile habanero y sus derivados, así como la oferta insuficiente por parte de los productores, debido principalmente a la incidencia de enfermedades virales, evidencian la ne-

cesidad de crear iniciativas para modernizar el cultivo y de apoyar la investigación científica que mejore la producción.

En este sentido, existen diferentes instituciones en el estado en las cuales se realizan estudios sobre:

- Caracterización de germoplasma
- Morfología de los frutos del chile habanero
- Plagas y enfermedades, especialmente de origen viral
- Nutrición y sistemas de producción
- Cultivo y conservación *in vitro* de germoplasma
- Estudios bioquímicos y moleculares

Un cultivo en constante transición

En contraste con su origen incierto, el futuro del chile habanero de Yucatán es prometedor, aunque en sus inicios tal vez fuera considerado un cultivo excéntrico; no obstante, con el tiempo se convirtió en algo indiscutiblemente unido a la cultura y la identidad regionales; de tal modo, que en la actualidad ha adquirido un valor agregado gracias al aprovechamiento que se hace de la capsaicina como componente de diversos productos alimenticios, industriales y terapéuticos.

La agroindustria del chile habanero tiene una oportunidad única para posicionarse estratégicamente en el mercado demandante de capsaicina tanto nacional como internacional (Estados Unidos, España, Inglaterra y especialmente Japón).

Esta demanda de chile habanero en fresco y de sus derivados industriales ha propiciado cambios importantes en la superficie cultivada, la tecnología del cultivo, en

el mejoramiento genético, la organización y apoyo a los productores, en los volúmenes, tiempos y calidades que exige el sector industrial, entre otras cosas.

Un hecho que sin duda contribuirá trascendentalmente a consolidar la comercialización del producto es la obtención de la denominación de origen del chile habanero de Yucatán otorgada en 2010 (DOF, 4/06/2010) siendo este un reconocimiento oficial de las características distintivas de calidad del fruto producido en esa zona como la pungencia (nivel de picor), el aroma, el sabor y la vida de anaquel que permiten diferenciarlo de los chiles habaneros producidos en otras regiones para efectos de mercado.

Por otro lado, las instituciones regionales de investigación juegan actualmente un papel decisivo en esta dinámica mediante la generación de conocimientos y metodologías que favorezcan la productividad

y el aprovechamiento integral de este cultivo, así como en la formación de recursos humanos especializados en los diferentes eslabones productivos. Cabe destacar que recientemente se llevó a cabo un estudio estratégico interinstitucional del chile habanero, el cual permitió, entre otros as-

pectos, definir las prioridades actuales de investigación y transferencia de tecnología para esta cadena productiva, así como plantear las necesidades futuras de conocimiento y tecnología a mediano y largo plazos, con base en una prospectiva de las tendencias del mercado.

Referencias bibliográficas

- (1) Andrews J. *Peppers: The domesticated Capsicums*. 1995. University of Texas Press. Austin, Texas.
- (2) Martínez J.C. 2002. "El uso del ADN mitocondrial para descubrir las migraciones precolombinas al Caribe: Resultados para Puerto Rico y expectativas para la República Dominicana". *Journal of Caribbean Amerindian History and Anthropology*. <http://www.kacike.org/MartinezEspanol.pdf>
- (3) Long-Solís J. 2004. "La ruta del chile habanero". *Cuadernos de Nutrición* (27): 77-81.
- (4) Andrews J. 1999. *The Pepper Trail. History and Recipes from Around the World*. University of North Texas Press: Denton, TX.
- (5) Pickersgill B. *et al.* 1979. "Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*". *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press. Dorchester, Dorset, UK.
- (6) De Landa D. (Fray). *Relación de las cosas de Yucatán*. Miguel Rivera Dorado Ed. (Crónicas de América). Dastin, Madrid, España.
- (7) Long Solís J. 1998. *Capsicum y cultura: la historia del chilli*. Fondo de Cultura Económica. Ciudad de México.
- (8) Bosland P. y Votaba E. 1999. *Peppers: Vegetable and spice capsicums*. CABI Publishing.
- (9) Terán S. *et al.* 1998. *Las plantas de la milpa entre los mayas*. Tun Ben Kin: Yucatán, México.
- (10) Pozo C.O., Montes H.S., Redondo E. 1991. "Chile (*Capsicum* spp.)" In: Ortega R., Palomino G., Castillo F., González V., Livera M. eds. *Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México*. Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C., México, pp. 217-238.
- (11) Latournerie Moreno L., Chávez Servia J.L., Pérez Pérez M., Castañón Nájera G., Rodríguez Herrera S.A., Arias Reyes L.M. y Ramírez Vallejo P. 2002. "Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán". *Rev.Fitotec.Mex.* Vol. 25(1):25-33.



La caracterización bioquímica y molecular del germoplasma de chile habanero de la Península de Yucatán para su mejoramiento genético: un proyecto estratégico

Capítulo 2

José Juan Zúñiga Aguilar*

*Autor responsable: zuniga@cicy.mx



Resumen

La Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY estableció desde el año 2002 un proyecto estratégico para la caracterización bioquímica, genética y molecular de las variedades criollas del chile habanero que se cultiva en la Península de Yucatán, como una iniciativa institucional para generar conocimientos científicos que permitieran coadyuvar al mejoramiento genético de esta especie. Como resultado de ello, el proyecto ha generado a la fecha importantes conocimientos científicos y agrobiotecnológicos sobre factores que afectan la productividad en el campo, el establecimiento e implementación de protocolos de cultivo de tejidos *in vitro*, y en aspectos fitosanitarios relacionados con enfermedades causadas por microorganismos. Un punto central en la evolución de estos estudios está constituido por la creación del banco de germoplasma más importante de las variedades criollas de chile habanero de la Península de Yucatán, conteniendo las accesiones más picantes del mundo. La actividad científica alrededor del cultivo de chile habanero ha permitido la formación de recursos humanos altamente capacitados, generando la masa crítica más importante en el ámbito nacional especializada en los estudios del chile habanero. A 10 años de su inicio, este proyecto representa por su nivel de consolidación un punto de apoyo fundamental en los esfuerzos regionales para constituir un sistema alimentario para el chile habanero. La implementación de esquemas productivos de calidad en los sistemas agroalimentarios constituye un área de oportunidad, que en el CICY se apoyará con el compromiso para desarrollar protocolos innovadores de investigación básica y de desarrollo tecnológico.

Palabras clave

Estudios bioquímicos y moleculares, bancos de germoplasma, fitomejoramiento, variedades criollas de chile habanero

Introducción

El cultivo del chile habanero es una actividad de especial relevancia para las sociedades de la Península de Yucatán, pues a pesar de que desde su introducción a la región su cultivo se desarrolló tradicionalmente en baja escala y con bajos o nulos niveles de tecnificación, las condiciones agroclimáticas de la Península convirtieron a esta región en el centro de diversificación genética más importante de esta especie, conduciendo al desarrollo, a través del conocimiento tradicional, de las múltiples variedades “criollas” con características organolépticas sobresalientes, entre las que destacan los niveles altos de pungencia y los sabores distintivamente propios.

La percepción de que los efectos del medio ambiente de la región constituyen la principal influencia en la manifestación de las cualidades agronómicas del chile habanero, condujeron a diversos sectores liderados por las asociaciones y comités de productores, a iniciar acciones para obtener la protección comercial del producto. Entre estas acciones están la obtención de la marca colectiva y la posterior solicitud al gobierno mexicano de la Denominación de Origen “Chile Habanero de Yucatán”, misma que en años recientes se modificó a “Chile Habanero de la Península de Yucatán”.

Estos hechos, así como el incremento que de manera paulatina y constante se dio en la demanda del producto, tanto en fresco como en sus diferentes niveles de procesamiento, constituyeron una presión externa para incrementar la producción. Sin embargo, la poca tecnificación y escasez de semillas de variedades criollas autóctonas condujeron desde entonces a la introducción masiva de semilla de variedades generadas en el exterior de la región, principalmente por compañías extranjeras que producen sus semillas en Estados Unidos o en el norte de la República Mexicana. Estos factores afectaron de manera negativa y progresiva, pero prácticamente inadvertida, a diversos ámbitos como el económico y el ecológico. En el primer caso, esta práctica ha conducido a la producción de frutos con calidad menor a la de las variedades locales, con menor pungencia y con sabor diferentes, lo cual puede tener repercusiones comerciales; en el segundo caso, la siembra masiva de variedades con diferente calidad e identidad genética constituyen un elemento de presión negativa que puede afectar la gran variabilidad genética local, erosionándola.

En ese difuso panorama de agresivas iniciativas de los sectores privados y de una incipiente apertura de oportunidades, en el año 2002, el colegio de profesores de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), aceptó la propuesta visionaria del Dr. José Armando Escamilla Bencomo[†], entonces director de la Unidad, para implementar un proyecto estratégico de largo aliento cuyo objetivo consistió en caracterizar bioquímica, genética y molecularmente el germoplasma del chile habanero de la Península de Yucatán.

Esta iniciativa constituyó en su momento un reto en sí misma, pues los investigadores de la Unidad debimos convencernos primero sobre la pertinencia de que esta propuesta pudiese tener el alcance estratégico requerido para concentrar las actividades de investigación de la UBBMP durante los siguientes años; adicionalmente, el director en turno de la Unidad debió realizar una eficiente labor de convencimiento para persuadir a las autoridades del Centro sobre la relevancia estratégica de este modelo de estudio. Esto último fue probablemente el mayor obstáculo que el proyecto tuvo que sobrepasar.

No obstante, una vez establecido y sobrepasados los inconvenientes, el proyecto, denominado “Caracterización Bioquímica y Molecular del Germoplasma de Chile Habanero de la Península de Yucatán para su Mejoramiento Genético”, tuvo como meta el aprovechamiento de los conocimientos y las herramientas científicas y tecnológicas que se desarrollarían a lo largo de ese período para aplicarlos al mejoramiento de las variedades criollas. Por diferentes razones, este proyecto se concibió desde dos aristas convergentes: en primera instancia, la creación de un banco de germoplasma constituido por muestras representativas de las variedades criollas cultivadas en los tres estados de la Península de Yucatán, así como por las donaciones de productores y de colecciones generadas por otras instituciones; en la segunda instancia, la realización de protocolos experimentales para la caracterización bioquímica y molecular de estos materiales, con el fin de generar conocimientos científicos útiles para el mejoramiento.

Inicialmente, con el fin de eficientar recursos logísticos e intelectuales, se decidió establecer colaboraciones con las instituciones regionales que tradicionalmente habían desarrollado estudios con el chile habanero y que por lo tanto tenían un nivel de consolidación mayor. No obstante, los diversos intentos para establecer convenios de colaboración con las instituciones de la región no rindieron los frutos deseados, por lo que la UBBMP desarrolló el proyecto estratégico del chile habanero prácticamente de manera aislada.

Áreas de investigación

La organización de las diferentes actividades de investigación de este proyecto se basó en la estructura de las líneas de investigación establecidas en la UBBMP en ese entonces:

Estrés biótico. Esta línea agrupó los proyectos dedicados a la identificación y aislamiento de variedades de chile habanero resistentes o tolerantes a enfermedades causadas por microorganismos, como el marchitamiento por *Phytophthora*, a la

identificación de microorganismos patógenos del chile habanero, a la identificación y aislamiento de péptidos o proteínas naturales del chile habanero con actividad antimicrobiana, a la identificación de nuevos virus asociados con el cultivo, a la determinación de tratamientos físicos para inactivar los virus transmitidos por semilla, al establecimiento de tratamientos biorracionales para conferir resistencia al chile y a la elucidación de los mecanismos moleculares que regulan el establecimiento de la resistencia ad-

quirida, así como a la identificación y aislamiento de genes de resistencia y de genes de interés agroeconómico.

Estrés abiótico y nutrición

mineral. Los proyectos agrupados en esta línea fueron aquellos relacionados con la evaluación de los efectos del medio ambiente no biótico sobre el metabolismo celular y los procesos de diferenciación. Algunos temas específicos se relacionan con el estudio de la regulación bioquímica y molecular de la absorción de nitrógeno y de las modificaciones en la arquitectura radicular ocasionada por la presencia de diferentes formas químicas del nutriente, de la identificación y clonación de nuevos canales de potasio, de los estudios de la influencia del régimen hídrico en la acumulación de capsaicina y del efecto de contaminantes como el aluminio en la fisiología de las plántulas.

Metabolismo secundario e

ingeniería metabólica. Esta línea diseña y utiliza modelos *in vitro* para el estudio del metabolismo nitrogenado y de la síntesis de metabolitos secundarios, así como para entender la influencia de diferentes

señales hormonales en la producción de metabolitos, empleando para ello suspensiones celulares de chile habanero. El estudio de las enzimas de las rutas metabólicas de la síntesis de capsaicina y el de las enzimas que metabolizan al nitrógeno en las placentas de los frutos se encuentran también en esta línea de investigación.

Morfogénesis y regulación

génica. Esta línea incluye proyectos relacionados con la generación y caracterización del banco de germoplasma de las variedades criollas del chile habanero, así como con el establecimiento de protocolos para la propagación *in vitro*, que incluyen estrategias de morfogénesis, embriogénesis somática y la generación de suspensiones celulares. De particular interés es el tema del banco de germoplasma, pues constituye el pivote unificador para el desarrollo del proyecto estratégico, permitiendo al mismo tiempo poseer como modelo de estudio a la mayor riqueza genética de la especie *Capsicum chinense* Jacq., y poder aplicar los conocimientos, las metodologías y tecnologías para el mejoramiento genético de estas variedades.

Aportes del proyecto

Conocimiento científico

Los resultados científicos de los proyectos participantes en el programa estratégico del chile habanero del CICY se presentan en detalle en los capítulos siguientes. Baste decir aquí que con base en su amplitud y en la variedad de áreas de estudio, los resultados del proyecto estratégico representan en su conjunto un aporte invaluable para el conocimiento científico universal, además de constituir herramientas robustas puestas a disposición de los grupos de investigación, de los fitomejoradores y los biotecnólogos que lo soliciten.

Formación de recursos humanos

En relación con el aporte en la formación de recursos humanos especializados en el tema del chile habanero, a través de este proyecto la UBBMP ha contribuido a la formación profesional de un importante número de alumnos de diversos grados, de diferentes regiones del país e inclusive del extranjero, quienes desarrollaron diversas actividades académicas teniendo al tema del chile habanero como tema de estudio. Estas actividades han ido desde el servicio social, residencias profesionales y tesis de Licenciatura, hasta la realización de estudios de Maestría

y Doctorado, estos últimos grados impartidos en el CICY.

La población estudiantil histórica que se ha formado en los laboratorios de la UBBMP está compuesta por alumnos procedentes de instituciones tanto de la República Mexicana como del extranjero. Así, ha habido estudiantes procedentes de la Universidad Nacional Autónoma de México, de la Universidad Autónoma de Yucatán, del Instituto Tecnológico Superior del Sur del estado de Yucatán, del Instituto Tecnológico de Mérida, del Instituto Tecnológico de Calkiní, del Instituto Tecnológico Superior de los Ríos en Tabasco,

del Instituto Tecnológico de Zacatepec en Morelos, del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez en Chiapas. Muchos de ellos se han graduado de los niveles de licenciatura, de Maestría en Ciencias y otros han obtenido el grado de Doctorado en Ciencias. Hay investigadores que han realizado sus estancias posdoctorales.

Adicionalmente, egresados de este programa se encuentran realizando investigaciones con el chile habanero como investigadores independientes, adscritos a diversas instituciones locales, nacionales y en el extranjero.

Impactos en indicadores sociales

Los resultados de las diferentes actividades de investigación generadas en o derivadas del proyecto estratégico del chile habanero, presentan un alto potencial de impacto en diversas áreas como la ecológica, la social, la comercial, la industrial, la tecnológica y desde luego la científica.

Impacto ecológico. Éste es uno de los más evidentes y directos indicadores mejorados por los resultados del proyecto. La generación de variedades de chile habanero con características agronómicas sobresalientes a partir de la variabilidad genética de las variedades criollas representa un elemento fundamental para el rescate de las variedades criollas. Adicionalmente, la producción y distribución masiva de semilla de ocho de estas variedades, las cuales actualmente se encuentran registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales de la Sagarpa, permitirá reducir el uso de variedades de procedencia externas con menor calidad, minimizando y eventualmente eliminando el riesgo de erosión genética por el uso de monocultivos.

Impacto social. Debido a que aún en estos tiempos se continúa sembrando chile habanero en pequeñas parcelas y en mecate, de manera paralela a la siembra de chile habanero es una actividad.

Impacto comercial e industrial. La semilla es la base de la cadena productiva del sistema producto chile habanero, con la producción y distribución de semilla de las variedades mejoradas se otorgará.

Impacto tecnológico. En los aspectos agrobiotecnológicos, la implementación de diversos sistemas de cultivo de tejidos *in vitro* han constituido herramientas muy valiosas tanto para propagación de materiales élite como para la realización de diversos estudios como el metabolismo nitrogenado, la percepción celular del medio ambiente y la regulación de la síntesis de metabolitos secundarios, como la capsaicina. Sus aplicaciones en aspectos fitosanitarios han permitido la identificación de microorganismos causantes de enfermedades y la generación de variedades

resistentes, tanto por métodos convencionales como biotecnológicos, además de permitir el aislamiento de gens de defensa y la identificación de los mecanismos moleculares que regulan la resistencia contra las enfermedades.

De manera relevante, los desarrollos científicos y tecnológicos apuntalan ahora al sistema alimentario del chile habanero mediante la aportación, producción de calidad, liderazgo en proyectos de largo alcance y de largo aliento.

La Unidad Productora de Semillas

La Unidad Productora de Semillas (UPS) retoma la producción de chile habanero como estandarte, pero poseerá la versatilidad para producir semillas de otras variedades de importancia agronómica.

Esta UPS estará constituida por una **Subunidad de Producción**, donde se ubican invernaderos hidropónicos con diferentes niveles de tecnificación, que van desde aquellos en donde la fertirrigación es controlada por computadora, hasta los invernaderos sencillos con aislamiento de tipo fitosanitario convencional. Los invernaderos hidropónicos están diseñados especialmente para la evaluación del efecto de diferentes parámetros de producción sobre las cualidades agronómicas del producto, incluyendo como ejemplo la cantidad de agua y la calidad de los nutrimentos; mientras que los invernaderos tipo casa-sombra se destinarán para las etapas de producción masiva de las semillas de interés (Figura 1A).

La UPS contará también con una **Subunidad de Beneficio**, con dos áreas: a) el **Área de Extracción y Beneficio**, en don-

de se desarrollarán los procedimientos de extracción, lavado, secado y empaclado de las semillas bajo las condiciones de calidad indicadas en la Norma Oficial Mexicana del chile habanero y, b) el **Área de Certificación**. El Área de Extracción y Beneficio poseerá un equipamiento específico para chile habanero que podrá fácilmente adaptarse a la producción de semillas de otras variedades agrícolas de interés (Figura 1B, Figura 2, Figura 3).

En la Subunidad de Beneficio se localiza el Laboratorio de Fisiología de Semillas, en donde se evaluarán parámetros de calidad de las semillas, como el vigor, la viabilidad y los porcentajes de germinación, así como los niveles de inocuidad química e identidad genética. Para ello contará con equipamiento adecuado para la determinación de los niveles de pesticidas contaminantes, la concentración de capsaicina o la determinación de la huella genética asistida por marcadores moleculares.

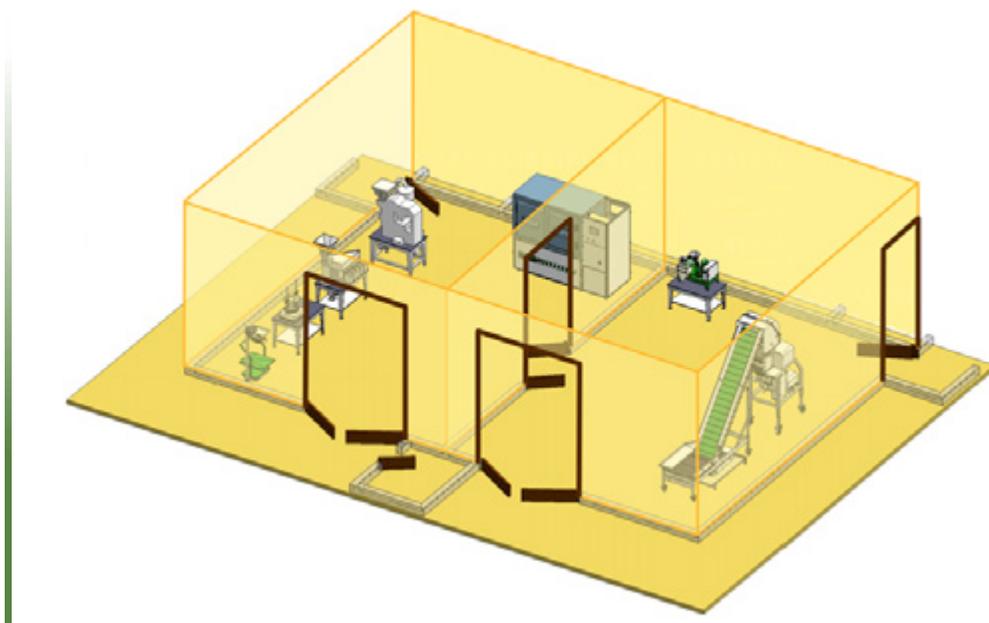
En una iniciativa que contribuirá al fortalecimiento de las capacidades analíticas en el sureste de México, el CICY en conjunto con

Figura 1 (A, B)
Vista panorámica de la Unidad Productora de Semillas del CICY



La Unidad Productora de Semillas, que se ubica en el Parque Científico y Tecnológico del SIIDETAY, está constituida por tres subunidades, la Subunidad de Producción (A), la Subunidad de Beneficio (B) y el Laboratorio de Fisiología de Semillas (C). Se pretende que este laboratorio se convierta en el Laboratorio de Certificación de Semillas, con la autorización del SNICS. Cortesía de Expo Construcción®.

Figura 2
Detalles del Área de Procesamiento y Beneficio



En esta área se recibirán los frutos frescos de chile habanero y después de un proceso desarrollado con estrictos controles de calidad se empaquetará la semilla certificada. Cortesía de Seed Processing Holland®.

el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) de la Sagarpa planifican que el Laboratorio de Fisiología de Semillas se convierta en el corto plazo en un Laboratorio de Certificación de Semillas que, trabajando para el SNICS, pueda realizar las labores de certificación en esta

parte de México, aportando al modelo de certificación de semillas de nuestro país la posibilidad de incorporar tecnologías de vanguardia para mejorar los servicios analíticos de identificación de semillas y la determinación de sus cualidades fisiológicas.

Áreas de oportunidad

Los aportes de la UBBMP en los campos de la investigación científica y agrobiotecnológica se encuentran plasmados como publicaciones en revistas internacionales indizadas y han impactado de forma cuantitativa y cualitativa en la formación de recursos humanos especializados en esta área. Por su nivel de consolidación este proyecto constituye un punto de apoyo fundamental en los esfuerzos regionales para la constitución de un sistema alimentario para el chile habanero. La implementación de esquemas productivos de calidad en los sistemas agroalimentarios constituye un área de oportunidad que el CICY apoyará mediante la generación de protocolos innovadores de investigación básica y de desarrollo tecnológico.

Dentro de las aportaciones de la UBBMP al fortalecimiento del sistema agroalimentario del chile habanero, debe incluirse su participación en el grupo que estableció las bases de los ensayos analíticos descritos en el proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-189-SCFI-2012, **“Chile habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum chinense* Jacq.)-Especificaciones y métodos de prueba”**, publicada en el *Diario Oficial de la Federación* el 31 de mayo de 2012. De la misma manera, el nivel de consolidación de este proyecto ha permitido a la UBBMP consolidarse como líder en el desarrollo de proyectos estratégicos de carácter regional, entre los que destacan el

proyecto **“Obtención de variedades más productivas y más tolerantes de chile habanero a partir de la diversidad genética de la especie en Yucatán”**, financiado por el Conacyt y el Gobierno de Yucatán en su convocatoria de Fondos Mixtos 2008-06, así como el proyecto **“Fortalecimiento de la cadena de valor del chile habanero mediante el establecimiento de su sistema alimentario”**, que cuenta con financiamiento del Conacyt y de fondos concurrentes del Gobierno de Yucatán y de productores privados, en la convocatoria FORDECYT 2011-01, y en el que participan instancias académicas, gubernamentales, de investigación y productivas de los estados de Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. Este último proyecto constituye un hito dentro de los esfuerzos nacionales para mejorar los estándares de calidad en las cadenas alimentarias, al proponer el establecimiento de los lineamientos de un sistema alimentario para el chile habanero, con base en buenas prácticas alimentarias y de producción para todos los eslabones de la cadena productiva del chile habanero. El éxito en la implementación de esta iniciativa podría permitir su replicación en cadenas alimentarias similares, lo cual debería traducirse en un cambio de paradigmas en la producción alimentaria nacional.







Sección II 

Los recursos genéticos



Caracterización de los recursos genéticos de *Capsicum chinense* Jacq. en la Península de Yucatán

Capítulo 3

José Jorge Gerardo Trujillo Aguirre*

*Autor responsable: jjgta55@prodigy.net.mx



Resumen

Estudios recientes señalan que el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) proviene de las tierras bajas de la cuenca amazónica en territorios que hoy ocupan el norte de Brasil, Guyanas, Venezuela y Colombia. Se desconoce la ruta y época de su ingreso a México y a la Península de Yucatán. Sin embargo, durante el siglo XIX pudo haber llegado a territorio nacional proveniente de las islas del Caribe. En la Península tienen arraigo las variedades de color naranja y rojo. En mucha menor escala, también se cultivan las variedades de color amarillo y chocolate. Entre 1970 y 1980, el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), hoy INIFAP, realizó investigaciones relacionadas con colecta, caracterización y selección de materiales criollos cultivados en la Península. De estos estudios se derivaron las variedades INIA y Uxmal. Posteriormente, en dicho instituto se continuó realizando colecta y caracterización de materiales criollos.

Palabras clave

Chile habanero, mejoramiento, origen, materiales criollos, Península de Yucatán

Introducción

Origen y dispersión prehispánica del chile habanero

El chile habanero proviene de las tierras bajas de la cuenca amazónica y de ahí se dispersó a Perú durante la época prehispánica. La distribución también se dirigió hacia la cuenca del Orinoco (ubicada actualmente en territorios de Colombia y Venezuela) hacia Guyana, Surinam, la Guyana Francesa y las Antillas del Caribe. Se ha sugerido que la introducción prehispánica del chile habanero en el Caribe se debió a migraciones indígenas de agricultores y alfareros procedentes de Sudamérica, pertenecientes a grupos arahuacos (originarios de Puerto Rico), quienes viajaron por las Antillas menores hasta llegar a Puerto Rico, La Española (República Dominicana y Haití), Jamaica y Cuba, entre los años 250 d.C. y 1000 d.C. Algunos estudios con ADN señalan que en Puerto Rico y República Dominicana las migraciones precolombinas de indígenas procedentes del Amazonas corresponderían a las tribus de yanomamos y crajos, que aún hoy en día continúan habitando en las regiones del Amazonas y del Orinoco.

Figura 1



El chile habanero (*Capsicum chinense*) no se originó en China sino probablemente en Sudamérica, y el chile manzano o perón (*Capsicum pubesens*), que se cree fue introducido en México de Sudamérica a principios de siglo, es originario de Mesoamérica.⁽¹⁾

El antecedente sobre los trabajos desarrollados en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) acerca de la investigación en chile habanero durante el periodo de 1975 a 1992, se basó solamente en un proceso de conservación de materiales obtenidos de colectas realizadas de 1975 a 1980, derivándose de éstas, por un proceso de selección, dos materiales denominados "Inia" y "Uxmal". Dichos trabajos de mejoramiento fueron llevados a cabo en colaboración con el coordinador nacional con sede en Tamaulipas en el campo experimental de las Huastecas, M.C. Octavio Pozo Campodonico. Los materiales Inia y Uxmal no lograron establecerse en manos del productor debido a las deficiencias en los procesos posteriores a la conservación y multiplicación de dichos materiales, así como el deficiente proceso de multiplicación de semillas mejoradas. Durante el periodo descrito solamente se realizaron procesos de producción y a la cosecha se obtenía semilla del material numerado como colecta, conservándose en periodos cada dos años.^(2,3,4,5,6)

Material criollo identificado como cultivares

Dada la costumbre ancestral de los productores de conservar sus semillas, diversas comunidades han logrado conservar cada vez más restringido el germoplasma acriollado de algunas variedades vegetales, entre ellas el chile habanero, el cual se identifica por su color. Aunque existen diferencias en la hoja y distribución arquitectónica de la planta, el productor solamente se enfoca en el color del fruto.

La tonalidad del fruto, dada la costumbre del consumo regional, ha sido cuando el color alcanza su máxima dureza en la etapa de inicio de madurez fisiológica reali-

zando la cosecha cuando aún es verde; siendo esta etapa la preferencia de consumo antes del cambio de tonalidad en el color del pericarpio.

De 1975 a 1990 los colores más conocidos entre productores y consumidores de los chiles picantes se encontraban en orden de producción: el chile habanero color "Naranja"; seguido por el chile color "Rojo", siendo demandado para la elaboración de la salsas rojas y cultivado a nivel de traspatio; el chile denominado "Cubano", característico por su fuerte olor aromático y el excesivo picor, siendo su color café achocolatado.

Figura 2



Hasta el inicio de los años 90 no se tenía referencia acerca de estudios que precisaran las características determinantes del picor.

Entre los chiles regionales, se consideraba los chiles denominados localmente: "cat-ix", "chahua", "dulce" y "max".

Historia sobre mejoramiento en chile habanero

En 1978 se llevaron a cabo secciones de trabajo con diversos talleres de la Sociedad Mexicana de Fitogenética (SOMEFI) para hacer un análisis sobre los recursos genéticos disponibles en México. No existen registros en el documento editado sobre chile habanero.⁽²⁾

En 1981 se editó el folleto técnico Núm. 1 SARH-INIA, 1981, *Habanero INIA y habanero Uxmal. Nuevas variedades de chile para la Península de Yucatán*. En dicho folleto se hace referencia al origen y procedimiento de selección, hasta la obtención de los cultivares mejorados, así como a la descripción de características de los cultivares.⁽⁵⁾

También en 1981 se editó el folleto técnico Núm. 17 SARH-INIA, por el M.C. Octavio Pozo Campodonico, Coordinador Nacional del Programa de Chile, en el cual se presenta la descripción de tipos y cultivares de chile (*Capsicum spp*) en México, donde hace referencia a la importancia del chile habanero entre los cultivares y tipos silvestres en la Península de Yucatán y se menciona acerca de su aceptación en otros mercados del país.⁽⁶⁾

Se hace una descripción del comportamiento del cultivo en la región; se señala la obtención de los cultivares Habanero "Uxmal" y Habanero "Inia", obtenidos como colectas individuales realizadas durante el año 1975 en plantaciones comerciales de cultivares nativos establecidos en Yucatán y Campeche. En ambos cultivares, aun cuando se describe el color de fruto maduro como predominantemente naranja, se hace mención específicamente a un fruto de pericarpio rojo.⁽⁵⁾

Figura 3



Durante 1984 se editó el documento: *Presente y pasado del chile en México*, en el cual se hacen las primeras citas sobre superficie sembrada, rendimiento y producción de chile habanero. También, se hace referencia a su procedencia de origen; cita además diferentes tipos diferenciados por el color: amarillos, blancos o rojos, predominando el color naranja y señalando éste como el de mayor preferencia por el consumidor.⁽³⁾

El mismo documento hace referencia al cultivo de chile habanero, así como de las características propias de este cultivo respecto de su adaptación a las condiciones de clima y suelo de la Península de Yucatán. Se mencionan los cultivares mejorados y sus bondades de producción.

En el Cuadro 1 se concentran las características morfológicas de diferentes tipos de chiles identificados en la región, hasta

antes de 2000, aunque la importancia económica se enfoca solo al tipo de chile naranja, y solamente se produce chile rojo por productores para satisfacer la demanda de mercados muy localizados o para mercados nacionales específicos y para exportación.

Debido al crecimiento de la demanda del fruto en el ámbito nacional y para la exportación, se realizó la introducción de semillas producidas en otras regiones, pero no ha sido fácil identificar el germoplasma introducido en casos particulares para exportación y teniendo como consecuencia la dispersión del germoplasma introducido a través del acarreo del material maduro. Se lograron identificar algunas variedades introducidas, así como su procedencia y empresa distribuidora.^(4,5,6,7,8,9,10,11)



Referencias bibliográficas

- (1) Alpizar-Lara E., Trujillo-Aguirre J.J.G., Herrera-Rodríguez F.J. 2002. "Determinación de capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) colectados en Yucatan". 16th International Pepper Conference Congreso Internacional de Chile. Nov. 10-12-2002. Tampico, México, p. 43.
- (2) Cervantes Santana T. Editor. 1978. Análisis de los recursos genéticos disponibles a México. Sociedad Mexicana de Fitogenética (Somefi). 10 a 12 de mayo de 1978.
- (3) Laborde Cancino J.A. Compilador. 1984. *Presente y pasado del chile en México*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas 80 pp.
- (4) Max M., González y Paul W. 1991. *Bousland Diversity. Germoplasma de Capsicum en las Américas*. vol 7 núms. 1 y 2, pp. 57-59.
- (5) Piña Razo J. 1981. *Habanero INIA y habanero Uxmal. Nuevas variedades de chile para la Península de Yucatán*. SARH-INIA, Centro de Investigaciones Agrícolas de la Península de Yucatán. Campo Experimental de la Zona Henequenera. Mérida, Yucatán. México. Marzo de 1981.
- (6) Pozo Campodonico O. 1981. *Descripción de tipos y cultivares de chile (Capsicum spp.) en México*. SARH-INIA.
- (7) Trujillo-Aguirre J.J.G. 2001. "Descripción varietal del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán". *Chile habanero. Seminario. Memorias*. Campo Experimental Uxmal. CIRSE Inifap-Sagarpa pp. 10-16.
- (8) _____ 2001. "Diversidad genética del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán". *Chile Habanero. Seminario. Memorias*. Campo Experimental Uxmal. CIRSE Inifap-Sagarpa pp. 17-21.
- (9) Trujillo Aguirre J.J.G., Díaz Plaza R. 1994. Society for Tropical Horticulture Interamerican. "Obtención de cultivares de chile habanero con buenas características hortícolas y con tolerancia a la virosis transmitida por mosquita blanca". Campeche, Camp. 13 al 19 Nov. de 1994.
- (10) _____ 2002. "Genetic diversity of the habanero chile (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatan rescue of genetic diversity". 16th International Pepper Conference. Congreso Internacional de Chile. Nov. 10-12-2002. Tampico, México, p. 43.
- (11) Trujillo-Aguirre J.J.G. 2003. "Rescate, conservación, mejoramiento y caracterización del chile habanero criollo (*Capsicum chinense* Jacq.) en la Península de Yucatán". V Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos "Fitogen 2003". Estación experimental de Pastos y Forrajes. Sancti Spiritus, Cuba, pp. 11-13.

Cuadro 1
Caracterización de diferentes tipos de chiles
picantes colectados en Yucatán, 2004

PLANTA	RSUX rojo Mat. en Mejora	Beliceño Semilla comercial	Caribeño–Antillano Semilla comercial	
Ciclo de vida	Anual - Semiperenne	Anual - Semiperenne	Anual	
Hábito de crecimiento de la planta	Erecta	Erecta	Erecta	
Color del tallo	Verde	Verde	Verde	
Forma de la hoja	Lanceolada	Lanceolada	Deltoide	
Altura media	81.9 cm	82.1 cm	71.7 cm	
Días de la floración	63	63	65	
Rendimiento /planta	0.647 g	0.684 g	684.3 kr	
Número de frutos por planta	228.3	81.3	92.5	
Días a la fructificación	88	85	85	
FLOR				
Núm. de flores de axila	3 o más	3 o más	3 o más	
Color de la corola	Blanco	Blanco	Blanco	
Longitud de la corola	0.89 cm	0.88 cm	0.86 cm	
Color de las anteras	Morado	Morado	Morado	
Tamaño de flor	0.78 cm	0.78 cm	0.86 cm	
FRUTO				
Color del fruto en estado intermedio	Verde	Verde	Verde	
Color del fruto en estado maduro	Rojo	Rojo	Rojo	
Forma del fruto	Acampanulado	Acampanulado	Acampanulado	
Tipo de epidermis del fruto	Liso	Rugosa	Semirrugosa	
Forma del cuello de la base del fruto	Ausente	Ausente	Ausente	
Ancho del fruto	2.31 cm	2.49 cm	2.64 cm	
Largo del fruto	4.18 cm	3.74 cm	3.43 cm	
Peso del fruto	11.0 g	11.4 g	11.4 g	
Número de lóculos	3.3	4.1	3.4	
Tamaño de semilla	Intermedia	Intermedia	Intermedia	
Peso de 1000 semillas (g)	4.7 g	4.4 g	5.0 g	
Color de la semilla	Amarillo paja	Amarillo paja	Amarillo (paja)	
Diámetro de la semilla	3.0mm	3.3 mm	3.6 mm	
Superficie de la semilla	Lisa	Lisa	Lisa	
Número de semillas por fruto	Entre 20 y 50	20 y 50	20 y 50	

	Yellow Big Son Thecnisem seed	Cubano colecta	Yellow Thecnisem Seed	Habanero Naranja Criollo en mejora	Red Sabina Introducido Semilla comercial
	Anual	Anual	Anual	Anual	Anual - Semiperenne
	Erecta	Erecta	Erecta	Erecta	Erecta
	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
	Deltoide	Lanceolada	Deltoide	Lanceolada	Lanceolada
	80.3 cm	92.4 cm	69.7 cm	67.4	75.7 cm
	63	90 días	63	70	63
	1185.5	1.048 kg	1327.3 g	898.5 g	1,247 g
	85.4	171.6	111.3	132.4	228.3
	87	128	87	103	85
	3 o más	3 o más	3 o más	3 o más	3 o más
	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
	0.92 cm	0.87 cm	0.95 cm	0.81 cm	0.78 cm
	Morado	Morado	Morado	Morado	Morado
	0.92 cm	0.87cm	0.96 cm	0.8 cm	0.78 cm
	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
	Amarillo	Marrón	Amarillo- naranja	Naranja	Rojo
	Acampanulado	Acampanulado	Acampanulado	Acampanulado	Acampanulado
	Semirrugosa	Semirrugosa	Semirrugosa	Lisa	Liso
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	3 cm	2.1cm	3.0 cm	2.83 cm	2.12 cm
	4.2 cm	3.6 cm	3.81 cm	4.9 cm	3.43 cm
	17.45 g	8.6 g	15.5 g	8.4 cm	8.95 g
	2.8	2.8	2.8	3	2.9
	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Intermedia	Intermedia
	5.3 g	5.4 g	4.8 g	5.2 g	4.3 mm
	Amarillo paja	Amarillo (paja)	Amarillo paja	Amarillo (paja)	Amarillo paja
		4 mm	3.8 mm	3.5mm	3.mm
	Aspera	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
	20 y 50	20 y 50	20 y 50	20 y 50	Entre 20 y 50



Los recursos genéticos de *Capsicum chinense* Jacq. en la Península de Yucatán. Caracterización de variedades “criollas” de chile habanero

Capítulo 4

Nancy Santana Buzzy,* Adriana Canto Flick, Eduardo Balam Uc, Susana Avilés Viñas, Liliana Muñoz Ramírez, Laura Peña Yam, Jacobo Pérez Pastrana, Javier Mijangos, Adolfo Guzmán Antonio, María del Carmen Montalvo Peniche, Guadalupe Herrera Díaz, Daisy Pérez Brito, Raúl Tapia Tussell y Karime Zubieta Sánchez
*Autor responsable: nancy@cicy.mx



Resumen

La Península de Yucatán es considerada como centro de reserva genética de *Capsicum chinense* Jacq., por ser una de las regiones geográficas con mayor diversidad de la especie. Esta diversidad está representada por una amplia gama de colores y tonalidades, formas, tamaños, aromas, sabor y pungencia del fruto. En este capítulo se muestra cómo se estableció una amplia colección de chile habanero en el CICY, así como los avances sobre la caracterización de este germoplasma colectado en la región. Se exponen los diferentes “tipos” de chile habanero (naranja, rojo, amarillo, blanco y morado) que integran la diversidad, así como la contribución que cada uno de estos tipos hace a la diversidad de la especie en la Península de Yucatán. En este capítulo se muestran, además, los principales logros y avances alcanzados sobre el banco de germoplasma de chile habanero, así como las perspectivas de conservación y aprovechamiento de estos valiosos recursos genéticos que han sido colectados en la región.

Palabras clave

Mejoramiento genético, *Capsicum chinense* Jacq., variedades criollas

Introducción

El género *Capsicum* pertenece a la familia de las Solanáceas e incluye alrededor de 27 especies, aunque solo cinco de ellas han sido domesticadas y cultivadas: *C. annum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* Linné y *C. pubescens*. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área comprendida entre Bolivia y Perú, donde

se han encontrado semillas de formas ancestrales, que datan de más de 7,000 años, y desde donde, se especula, se diseminó al resto del continente americano (Pickersgill, 1988).⁽¹⁾

Debido a la gran diversidad de tipos de chiles encontrados, México es considerado el país con mayor diversidad genética del género *Capsicum*. El Chile es conocido desde la época prehispánica por los términos náhuatl: cococ, cocopatic y cocopalatic, y desde entonces fueron categorizados por su grado de pungencia, como picantes, muy picantes y picantísimos. Existe además, una gran diversidad de colores, formas y tamaños de los frutos (Pozo *et al.*, 1991). Yucatán es reconocido como centro de reserva genética de la especie *C. chinense* por la diversidad de colores, formas y pungencia de sus frutos.

Los recursos fitogenéticos son la base del mejoramiento genético de las plantas, tanto por métodos clásicos como por métodos biotecnológicos, o por la complementación de ambos métodos de mejora. En el Centro de Investigación Científica de Yucatán se conserva el germoplasma de chile habanero, representado por alrededor de 250 colectas de las que se ha podido caracterizar solo 25% de las accesiones conservadas. Esta colección es una de las más completas de la especie en el ámbito internacional.

Para la caracterización morfológica de las accesiones de chile habanero, hemos utilizado descriptores internacionales establecidos para el género *Capsicum* (IPGRI, 1991).⁽⁵⁾ Por otro lado, hemos venido evaluando la diversidad genética de chile habanero mediante marcadores moleculares (ISSR, microsatélites y RAPD) a partir del ADN. A partir de estos análisis se ha establecido la *huella genética* del chile habanero "criollo" de Yucatán. Esto permitirá no solo identificar variedades sino también proteger la identidad de las variedades criollas autóctonas de la Península de Yucatán, portadoras de atributos que la distinguen del chile habanero cultivado en cualquier otra parte del mundo. Estos estudios moleculares constituyen, además, un aspecto fundamental para la Denominación de Origen otorgada.

La caracterización y evaluación del germoplasma en todo su contexto, ha generado una amplia base de datos, plataforma sobre la que se desarrollan los trabajos de selección de materiales genéticos promisorios, tanto para su uso actual o directo, como para su incorporación como progenitores a programas de mejora genética, por poseer características que resultan de interés. Los primeros resultados obtenidos en este sentido fueron ocho variedades criollas de chile habanero, seleccionadas por sus características sobresalientes, particularmente por su elevada pungencia, su alta productividad y por la excelente calidad de sus frutos, las cuales fueron registradas en el Catálogo Nacional de Variedades vegetales (CNVV) del Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semilla (SNICS).

Avances en la caracterización del germoplasma de chile habanero conservado en el CICY

A partir del año 2002, comenzamos a coleccionar de manera sistemática y a lo largo de la Península de Yucatán todas aquellas variedades criollas o autóctonas que solo pueden ser encontradas en los cultivos de traspatio y pequeñas huertas familiares, en los que tradicionalmente conservan y utilizan su propia semilla para establecer sus plantíos (Figura 1).

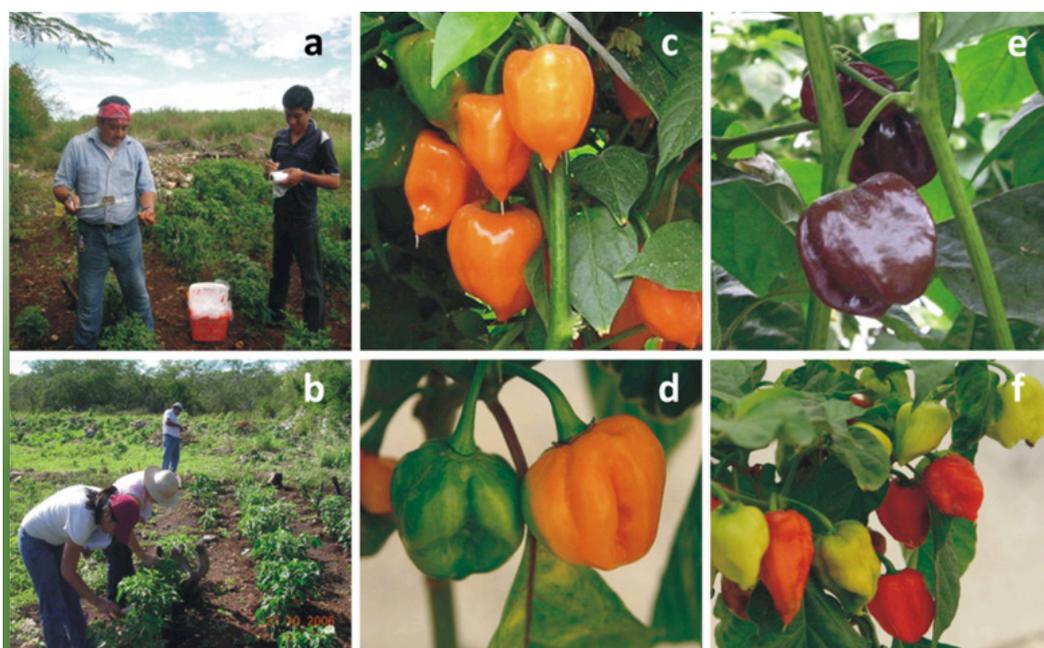
Actualmente, el número de entradas al banco de germoplasma es de alrededor de 250 accesiones, las cuales conservamos en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en forma de semilla, a baja temperatura (8-10 °C). En el banco las accesiones están clasificadas por la fecha de entrada al banco y de manera general en la clave de identificación de cada acce-

sión, la primera letra representa el color del fruto (N: Naranja, R: Rojo, A: Amarillo, B: Blanco y M: Morado) (Figura 2).

A la fecha, contamos además con un protocolo de conservación *in vitro* por crecimiento mínimo o lento (Figura 3).

La caracterización morfológica y agronómica que realizamos al banco de germoplasma de chile habanero está sustentada en descriptores internacionales establecidos para *Capsicum* (IPGRI, 1995).⁽³⁾ Estos descriptores son específicos para el género y permiten describir las características de la semilla, la planta, la floración y el fruto, y será más minuciosa y detallada en dependencia del propósito y los recursos con que se cuenta para esta laboriosa actividad. En nuestro

Figura 1
Colecta de variedades criollas de chile habanero en la Península de Yucatán



a-b: colecta en campo; c: variedad naranja; d: variedad amarilla; e: variedad morada; f: variedad roja.

Figura 2
Conservación de chile habanero



a-b: en forma de semilla a baja temperatura (8-10 °C); c: prueba de germinación *ex vitro*.

caso, al seleccionar los descriptores se tomó en cuenta, además, la heredabilidad de algunos caracteres (altura de la planta, color de la flor, color de fruto, etcétra), y la relación de algunos caracteres con el rendimiento y la productividad, particularmente el peso del fruto, número de frutos por planta, largo y ancho del fruto, entre otros.

La pungencia o picor, por ser un carácter distintivo de la especie, fue determinada por HPLC (High Performance Liquid Chromatographic), cuantificando por primera vez el contenido de capsaicinoides en placenta, pericarpio y en el fruto completo de chile habanero. Estos análisis permitieron conocer que en Yucatán se encuentra el chile habanero más picante conocido (NP1EG: 850,000-1,000000 SHU) (Figura 4) actualmente registrado con el nombre Mayan K'iiin en el CNVVV. A partir de estos análisis de pungencia, también pudimos conocer que la mayoría de los chiles criollos de esta región de México superan las 500,000 SHU (Canto Flick *et al.*, 2008),⁽¹⁾ lo que cambia drásticamente el criterio sobre la clasificación del chile habanero en la escala internacional de pungencia, ubicada entre los 250,000 y 300,000 SHU. Estos resultados apuntan al chile habanero

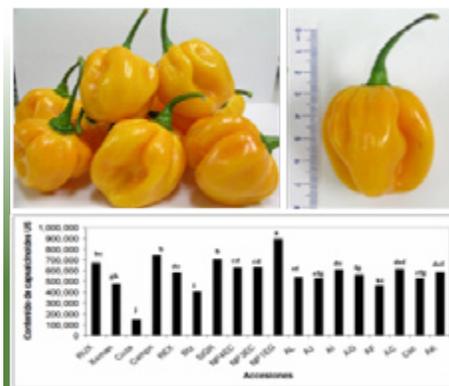
Figura 3
Conservación de chile habanero *in vitro*



a: plántulas *in vitro*; b-d: conservación *in vitro* por crecimiento mínimo o lento.

de la Península de Yucatán como la mejor fuente para la extracción de oleorresina (capsaicina) a escala industrial.

Figura 4
Frutos de la variedad Mayan K'iiin (850,000-1,000000 SHU)



Establecer la *identidad genética* de cada una de las variedades criollas que integran el germoplasma de chile habanero colectado en esta región ha sido una de las actividades más relevantes desde que fue concebido el proyecto. Así, dependiendo de los recursos que se han podido adquirir, hemos incorporado diferentes tipos de marcadores moleculares al análisis del ADN de chile habanero (ISSR, microsatélites y

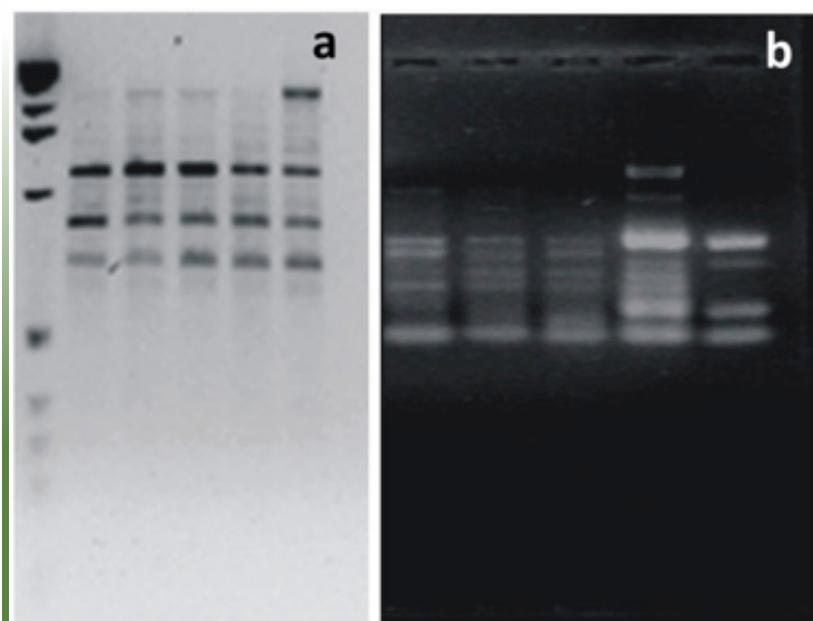
RAPD). Actualmente contamos con los patrones de ADN de los cinco tipos de chile habanero, los cuales representan la diversidad de la especie en la región, así como el de ocho variedades mejoradas (Figura 5).

Esto permitirá, no solo utilizar estos patrones de ADN para estudiar la diversidad genética entre-tipos e intra-tipos de chile habanero, sino también proteger legalmente la identidad de los chiles criollos de Yucatán, aspecto básico para la Denominación de Origen del chile habanero de la Península de Yucatán.

Hasta la fecha, tenemos caracterizado alrededor de 25% de las accesiones conservadas en el banco, debido a la gran demanda de recursos que requiere esta actividad (económica y humana). No obstante, nuestra colección no solo es una de las más amplias sino también una de las caracterizaciones más completas que se ha realizado a la especie

C. chinense, no solo en México sino en el mundo. Como producto de esta importante actividad contamos con una amplia base de datos del banco de germoplasma de chile habanero. Ésta constituye una valiosa herramienta para la selección de variedades de uso directo o para su incorporación a un programa de mejoramiento genético, como progenitores. De las accesiones caracterizadas, un grupo de 38 accesiones fueron consideradas materiales promisorios, de gran interés por su productividad, tolerancia y/o calidad de fruto. De este grupo, ocho variedades fueron preseleccionadas y sometidas a un proceso de selección masal. Éstas se distinguen por su elevado picor, su alta productividad y la calidad de sus frutos. Los criterios de selección que utilizamos fueron enfocados a que estas variedades pudieran cubrir los diferentes propósitos para los que chile habanero se puede producir: consumo fresco, para la industria y para el mercado, tanto nacional como para exportación.

Figura 5
Patrones de ADN de ocho variedades mejoradas de chile habanero



a: Polimorfismo con marcadores tipo RAPD; b: Polimorfismo con marcadores tipo SSR.

El color del fruto es otro de los caracteres que más contribuyen y permiten distinguir la diversidad de esta especie en la Península de Yucatán. Es, además, uno de los caracteres más heredables de chile habanero. Precisamente por la gran variedad de colores y tonos de sus frutos, también estamos interesados en estudiar los pigmentos que están presentes en los frutos de los diferentes “tipos” de chile habanero (naranja, rojo, amarillo, morado y blanco). De manera similar a los capsaicinoides, también es de nuestro interés en este proyecto determinar los pigmentos presentes en chile habanero, por ser de uso potencial como materia prima para diferentes industrias (alimentación, cosméticos, colorantes en general). Para ello determinamos los tipos y contenidos de pigmentos mediante la técnica de HPLC. Por otro lado, estamos trabajando en la identificación de genes relacionados con la síntesis de carotenoides, expresados diferencialmente en chile habanero (*Capsicum chinense*). Los carotenoides son tetraterpenos compuestos de 40 átomos de carbono, formalmente derivados del fitoeno (Sánchez *et al.*, 1999).⁽⁶⁾ Su relevancia a nivel biológico radica en que estos compuestos son los responsables de una gran variedad de colores en animales, plantas y microorganismos (Grotewold, 2006).⁽²⁾ Estamos comenzando trabajos relacionados con los pigmentos en esta especie, con la identificación del patrón de expresión de los genes ZDS, CCS, β -LCY y ϵ -LCY, los cuales participan en la síntesis de carotenoides en diferentes variedades de chile habanero. Hasta el momento, para los genes ZDS y CCS se logró amplificar una banda del tamaño esperado para su posterior clonación, secuenciación y análisis de expresión, mientras que para β -LCY y ϵ -LCY estamos estableciendo las condiciones para su amplificación.

La caracterización del germoplasma de chile habanero ha proporcionado la información precisa y requerida no solo para conocer y aprovechar la diversidad genética de la especie, sino también para iniciar un programa de mejoramiento altamente eficiente en este estratégico cultivo. Hoy por hoy contamos con una gran cantidad de información recopilada y debidamente corroborada durante la caracterización y la evaluación agronómica de las accesiones, a partir de la cual podremos diseñar híbridos y/o variedades en los que podremos combinar los caracteres más relevantes de progenitores previamente seleccionados. De esta manera será posible, a partir del germoplasma de chile habanero colectado en la Península de Yucatán, obtener nuevas variedades e híbridos, los cuales portarán los atributos que distinguen al chile habanero criollo pero que, además, como plus, se les incorporen otras características deseadas, ya sea relacionadas con la calidad del fruto, su productividad, con su adaptabilidad y/o su tolerancia a estrés, entre otros.

La posibilidad real de no solo distinguir sino también conocer cada una de las accesiones que integran el banco de germoplasma de chile habanero, ha permitido, en primer lugar, aprovechar la diversidad de la especie mediante los trabajos de selección de variedades criollas. Esta selección siempre estuvo dirigida a obtener materiales genéticos promisorios para los diferentes destinos o propósitos del “producto chile habanero”: consumo fresco, industria y exportación. En segundo lugar, constituye el paso previo para iniciar un programa de mejoramiento por cruza- mientos, para la obtención eficiente, de híbridos y variedades previamente diseñados. En esta etapa podremos combinar lo mejor de las variedades criollas que ya co-

nocemos, para obtener un chile habanero superior, con mayor calidad del fruto, más productivo, más picante y mejor adaptado, de todos los que han sido cultivados a la fecha en la región. Este programa garantizará la homogeneidad, la estabilidad y la identidad de todos los materiales genéticos que resulten seleccionados.

Desde esta perspectiva, nuestro programa está enfocado, por un lado, a situar al chile habanero de la Península de Yucatán dentro de un modelo similar al que

es aplicado en los países con mayor desarrollo en la agricultura, como es el caso de Holanda, país catalogado en este ámbito como el *Jardín de la Agricultura*, con una gran ventaja: nosotros poseemos el recurso genético, base fundamental del mejoramiento. Por otro lado, nos hemos propuesto formar recursos humanos de alto nivel, impregnados de esta visión y con las herramientas necesarias para aplicar el conocimiento adquirido en otras especies de importancia económica para el país.

Referencias bibliográficas

- (1) Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L.G., Balam-Uc E., Bello-Bello J.J., Lecona-Guzmán C.A., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas, Gómez-Uc E., López-Puc G. and Santana-Buzzy N. 2008. "Capsaicinoids Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest Known Cultivars". *HortSci* 43:1344-1349.
- (2) Grotewold E. 2006. "The genetics and biochemistry of floral pigments". *Annu. Rev. Plant. Biol.* 57: 761-80.
- (3) IPGRI, AVRDC y CATIE. 1995. Descriptores para *Capsicum* (*Capsicum* spp.). Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación Relativos a los Vegetales, Taipei, Taiwán y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- (4) Pickersgill B. 1988. *Genetic resources of Capsicum for tropical regions, in Tomato and Pepper Production in the Tropics*, Tainan, Taiwan.
- (5) Pozo O.S., Montes H., Redondo E. 1991. "Chile (*Capsicum* spp.)". En: *Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México*. Ortega R., Palomino G., Castillo F., González V. y Livera M. (eds). Soc Mex Citogen, México, pp. 217-238.
- (6) Sánchez A., Flores L., Langley E., Martín R., Maldonado G. y Sánchez S. 1991. "Carotenoides: estructura, función, biosíntesis, regulación y aplicaciones". *Rev. Latin. Microbiol.* 41:175-191.



Procedimientos para la certificación de semillas y el registro y obtención del título de obtentor de variedades vegetales

Capítulo 5

Guillermo Zetina Rosado*, José Juan Zúñiga Aguilar
***Autor responsable: zetinarosado@hotmail.com**



Introducción

En los últimos años, el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) ha tenido como uno de sus objetivos principales el producir semilla certificada de variedades de chile habanero que permitan a los productores de la Península contar con una simiente que garantice una buena germinación, plántulas vigorosas, libre de malezas, plagas y enfermedades, con tratamientos químicos amigables con el medio ambiente y asegurar el establecimiento de un cultivo sano, vigoroso, estable y certificado. Para ello, se debe verificar e inspeccionar las semillas para siembra, desde su origen, durante su proceso de producción en campo, el acondicionamiento y el beneficio, hasta su almacenamiento y comercialización conforme las estrictas normas de calidad para que las semillas conserven su alta calidad genética, fisiológica, física y fitosanitaria.

Para lograr esto, en primera instancia el CICY tuvo que ponerse en contacto con el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), organismo oficial del gobierno que es el único responsable de garantizar una semilla de alta calidad, por lo que se le hizo de su conocimiento que, como centro de investigación, tenía disponible nueve variedades de chile habanero, producto de los trabajos del grupo de la Dra. Nancy Santana, para inscribirlas en un programa de certificación de semillas, con lo que se dio inicio al proceso de certificación que consistió en el siguiente procedimiento:

- Inscribir los materiales en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales del SNICS, requisito indispensable para la inscripción de un programa de producción de semillas; esto significa que todas las variedades que se pretendan inscribir en un programa de certificación deberán estar inscritas en este Catálogo, las cuales son sometidas a la revisión y análisis de grupos técnicos de especialistas del SNICS, que examinan los elementos proporcionados conforme estándares internacionales, y emiten un dictamen de distinción, homogeneidad y estabilidad. Esto permite distinguir y caracterizar una población de plantas que constituyen una variedad y en este caso el CICY ya cumplió con el requisito y actualmente tiene registradas ocho variedades de chile habanero con sus respectivos números de registro.

- Registrarse en el formato oficial del SNICS denominado Aviso de Alta al Directorio de Productores, Obtentores y Comercializadores de Semilla, en el que se manifiesta el inicio de actividades, los generales del productor indicando si es distribuidor, comercializador, exportador, importador u obtentor, cultivos con los que opera frecuentemente, infraestructura instalada y la documentación oficial que lo acredita. Habiendo cumplido con estos requisitos, el SNICS proporciona una clave única e intransferible para identificar al productor en el ámbito nacional contando el CICY actualmente con esta clave. Lo anterior pudiendo consultarse por internet en la página del SNICS.
- Posteriormente a estos dos pasos iniciales, se solicita mediante escrito la inscripción en el programa para la producción de semilla certificada. debiéndose indicar:
 1. El nombre y el domicilio del promovente
 2. La ubicación del predio donde se sembrará la semilla
 3. El tipo de cultivo
 4. La variedad
 5. La categoría de semilla a sembrar
 6. La categoría de semilla a obtener
 7. La superficie que se sembrará
 8. El cultivo anterior
 9. La densidad de siembra
 10. La clave de inscripción en el formato de aviso de inicio de funcionamiento

Esta solicitud deberá acompañarse del comprobante de pago de inscripción que se puede realizar en cualquier banco de la localidad mediante la hoja de ayuda localizada en la página del SNICS, así también, con el comprobante de origen que en caso de ser categoría básica o registrada con la etiqueta de ésta es suficiente. Para la categoría original, como las variedades del chile habanero del CICY, se tiene que presentar la carta de identidad varietal por cada una de los materiales, debiéndose indicar el número de folio para cada una de ellas, así como la cantidad de semilla que se tiene resguardada.

Una vez aceptada la solicitud, se procede a la siembra y a darle un seguimiento estricto durante el desarrollo fenológico del cultivo con el apoyo de los descriptores varietales y reglas técnicas hasta la cosecha etapa en la cual se encuentran actualmente las ocho variedades de chile habanero del CICY para posteriormente, a través de muestreos a la semilla cosechada, hacerles los análisis de calidad como es el contenido de humedad, germinación, pureza física, y viabilidad malezas. Habiendo cumplido la semilla con los estándares de calidad, se procede al etiquetado de la misma y, por parte del productor, de acuerdo con el artículo 33 de la Ley Federal de Producción Certificación y Comercio de Semillas se coloca al envase una etiqueta a la vista que incluya los siguientes datos informativos: el nombre del cultivo, género y especie vegetal, denominación de la variedad vegetal, categoría de la semilla, porcentaje de germinación e impurezas de otra variedades y especies o materia inerte, en su caso el tratamiento químico que se haya aplicado debiendo estar teñida para advertir sobre su improcedencia para efectos de alimentación humana, nombre o razón social del productor o responsable de

la semilla y su domicilio, número de lote que permita dar seguimiento al origen y calidad de la misma, ya que para que cualquier semilla de origen nacional o extranjera pueda ser comercializada o puesta en circulación debe cumplir con estos requisitos pues el incumplimiento origina severas sanciones de infracción desde el punto de vista legal.

Obtención del título de obtentor

Con base en la Ley de Variedades Vegetales, el CICY tiene en proceso la obtención del Título de Obtentor de las nueve variedades de chile habanero cuyas características en pungencia y frutos las hace diferentes a cualquier otra variedad de la Península, razón por la cual se optó por su protección legal solicitando ante el SNICS su registro mediante el siguiente procedimiento:

Solicitud del título de obtentor

El formato oficial en el cual se detallan los datos del solicitante, datos de la variedad como género y especie, el nombre común, la denominación propuesta de la variedad y si ésta se ha comercializado en México o en el extranjero, tipo de variedad, si es un híbrido de qué tipo o un clon, la genealogía de los progenitores, método geotécnico de obtención, el proceso a utilizar en la conservación de la identidad varietal y la comparación con variedades similares y marcar sus diferencias en cuanto a plántula, floración y frutos.

Informe técnico

Consiste en una descripción varietal detallada de aproximadamente 60 caracteres de la planta respecto de las características del tallo, tipo y forma de las hojas, nudos, entrenudos, floración tipo de fruto color del fruto peso y pungencia, considerando que la variedad vegetal propuesta debe tener cuatro aspectos muy importantes:

1. Distinción. Es decir, que la variedad sea diferente técnicamente de cualquier otra variedad, en uno o varios caracteres.

2. Homogénea. La variedad vegetal debe ser suficientemente uniforme en sus caracteres pertinentes.

3. Estable. Posterior a sus reproducciones sucesivas, sus caracteres pertinentes deben permanecer inalterables.

4. Novedad. Cuando la variedad no se haya enajenado más allá de un año anterior a la solicitud del Título de Obtentor en territorio nacional o de cuatro años en el extranjero.

Para completar la solicitud se debe cumplir con la entrega de la siguiente información:

Denominación propuesta. Ésta debe ser diferente a cualquier otra existente, de la misma especie o semejante en el país o en el extranjero.

Comprobante del pago de derechos. Éste se consulta en el portal de internet del SNICS, mismo que se actualiza dos veces al año.

Acreditamiento de la personalidad del solicitante. Ya sea persona física o moral.

Cabe indicar que toda esta información técnica la recibe el SNICS y mediante el Comité Calificador de Variedades Vegetales conformado por expertos en la materia son los responsables de verificar los requisitos señalados anteriormente, y de ser aprobados, antes de otorgar el título de obtentor, se proporciona al solicitante una carta de aceptación la cual, en el caso del CICY ya fue otorgada.

Derechos que otorga la Ley de Variedades Vegetales

Ser reconocido como obtentor de una variedad vegetal, siendo éste inalienable e imprescriptible, y aprovechar en forma exclusiva y de manera temporal una variedad vegetal y su material de propagación por quince años.

Este derecho tiene excepciones ya que no se requiere el consentimiento del obtentor cuando su variedad es utilizada para efectos de investigación para la obtención

de otras variedades y cuando es para consumo humano o animal.

Sin embargo, esta ley protege de manera especial la infraestructura, el tiempo, esfuerzo y trabajo de los investigadores, ya que se considera como un incentivo para la investigación, además de reconocer su voluntad de obtentores, su derecho moral y económico.



SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN

SERVICIO NACIONAL DE INSPECCIÓN Y
CERTIFICACIÓN DE SEMILLAS



SOLICITUD DE INSCRIPCIÓN EN EL CATÁLOGO NACIONAL DE VARIEDADES VEGETALES

INSTRUCCIONES: USE LETRA DE MOLDE. NO VÁLIDO SI PRESENTA TACHADURAS O ENMENDADURAS. ESPACIO SOMBRADO, RESERVADO PARA OFICINA DE REGISTRO. EN CASO NECESARIO, UTILIZAR HOJAS ADICIONALES PARA INFORMACIÓN COMPLETA.
Para la revisión de la solicitud invariablemente deberá presentar anexo el informe técnico (descripción varietal).

Recepción de la documentación FOLIO DE ENTRADA: FECHA: HORA: RECIBE:	Número de referencia <div style="background-color: #cccccc; height: 20px; width: 100%;"></div>
----------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------

1. Nombre o Razón social del Solicitante.		
2. Domicilio para oír y recibir notificaciones.		
<i>Calle</i>	<i>Número</i>	<i>Colonia</i>
<i>Ciudad</i>	<i>Estado</i>	<i>Código Postal</i>
3. Teléfono / Fax / Correo electrónico.		
4. Nombre(s) del personal autorizado para actuar como representante o gestor.		
5. Género y especie.		
6. Denominación de la Variedad.		
7. Tipo de Variedad.		7.1 Nivel de Endogamia (indicar).
a) Línea () L	g) Variedad sintética () VS	
b) Híbrido de cruce simple (A x B) () S	h) Variedad multilineal () VM	
c) Híbrido tres líneas (A x B) x D () T	i) Mestizo () M	
d) Híbrido doble (A x B) x (C x D) () D	j) Clon () C	
e) Híbrido intervarietal () HV	k) Otra (especifique)	
f) Variedad de polinización libre () VL		

8. Progenitores (conforme el esquema de fórmulas indicado en el apartado anterior).				
	PARENTAL A	PARENTAL B	PARENTAL C	PARENTAL D
a) Denominación				
b) Genealogía				
c) Obtentor				
9.1. Origen. Geográfico y genético; en su caso, indicar lugar donde se colectó, primera selección, ciclos de endogamia o de cruzamiento, evaluación, etc.				
9.2. Método genotécnico de obtención. (Descripción detallada y en orden cronológico).				
9.3. Proceso a utilizar en la conservación de la identidad varietal. (Recomendaciones imprescindibles para propagar, reproducir o multiplicar el material genético a través de generaciones sin que este presente cambios).				
10. Variedad similar y diferencias respecto a la candidata.				
<i>Característica (s); conforme guía técnica específica</i>		<i>Variedad a inscribir</i>		<i>Variedad similar</i>
11. Lugar donde se realizó la caracterización y condiciones generales (indicar si se realizó bajo condiciones controladas).				
<i>Localidad</i>	<i>Ciudad</i>	<i>Estado</i>	<i>País</i>	
<i>Temperatura media</i>	<i>Clima</i>	<i>Duración de la evaluación</i>		
11.1 Variedades utilizadas como referencias en la comparación				
a)	b)	c)		
12. Otros datos relevantes.				

DECLARO QUE LOS DATOS QUE SE PROPORCIONAN SON CORRECTOS Y CORRESPONDEN A LA VARIEDAD QUE SE INDICA, Y ME COMPROMETO A FACILITAR, A PETICIÓN DE LA SECRETARÍA, LA INFORMACIÓN, MATERIAL VEGETAL O LAS VERIFICACIONES QUE SEAN REQUERIDAS POR LA MISMA.

México, D.F. a _____ de _____ de _____.

Firma _____

C. _____

NOMBRE DE SOLICITANTE



AVISO DE ALTA AL DIRECTORIO DE PRODUCTORES, OBTENTORES Y COMERCIALIZADORES DE SEMILLAS PARA SIEMBRA																										
														SNICS A.1 Instrucciones al reverso												
1.- Inicio de actividades como:																										
Almacenador	()	Beneficiador	()	Comercializador	()																					
Distribuidor	()	Exportador	()	Importador	()																					
Obtentor	()	Productor	()																							
2.- Para integrar el Directorio de Productores, Obtentores y Comercializadores de Semillas ante la SAGARPA, proporcione la siguiente información:																										
Nombre: (Apellido paterno, apellido materno y nombre(s), denominación o razón social)																										
RFC o CURP _____																										
Domicilio: _____																										
Calle			Número			Colonia			C.P.																	
Municipio			Entidad			Teléfono(s)			Fax			Correo electrónico														
3.- En caso de contar con infraestructura de almacenaje y/o beneficio indicar el domicilio del mismo. (En caso necesario agregue información en hoja anexa)																										
Calle			Número			Colonia			C.P.																	
Municipio			Entidad			Teléfono(s)			Fax			Correo electrónico														
4.- Semillas de los cultivos con los que opera frecuentemente: (ton, pzas.)																										
Cultivo(s)																										
Cantidad																										
Categoría	Nac.	Imp.	Nac.	Imp.	Nac.	Imp.	Nac.	Imp.	Nac.	Imp.	Nac.	Imp.	Nac.	Imp.												
														Nac. Nacional; Imp. Importación												
5.- Almacén (anexar datos técnicos de infraestructura y capacidad instalada) Capacidad de almacenaje _____ ton/año.																										
6.- Planta de beneficio (anexar datos técnicos de infraestructura y capacidad instalada) Capacidad de beneficio _____ ton/hora																										
7.- Nombre completo y firma de mi(s) representante(s) legal(es), en su caso.																										
Nombre							Firma																			
Declaro que los datos que proporciono son correctos, y me comprometo a facilitar, a petición de la SAGARPA, la información que verifique lo antes expuesto y que es de mi conocimiento el contenido de la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas y la Ley Federal de Variedades Vegetales y sus Reglamentos.																										
Atentamente							<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center; padding: 5px;">PARA USO EXCLUSIVO DEL SNICS</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="width: 60%; padding: 5px;">Clave de Aviso</td> <td style="width: 40%;"></td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 5px;">SELO OFICIAL</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 5px;">Autoriza</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="border-top: 1px solid black; height: 20px;"></td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center; padding: 5px;">Nombre y firma del Personal Autorizado del SNICS</td> </tr> </tbody> </table>								PARA USO EXCLUSIVO DEL SNICS		Clave de Aviso		SELO OFICIAL		Autoriza				Nombre y firma del Personal Autorizado del SNICS	
PARA USO EXCLUSIVO DEL SNICS																										
Clave de Aviso																										
SELO OFICIAL																										
Autoriza																										
Nombre y firma del Personal Autorizado del SNICS																										
Nombre y Firma																										
Lugar y Fecha: _____																										
Para cualquier aclaración, duda y/o comentario con respecto a este trámite, sírvase llamar al Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía (SACTEL) a los teléfonos 1454 2000 en el D.F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01 800 112 0584 ó desde E.E. U.U. y Canadá al 1800 475 2393.																										



Consideraciones generales para su llenado
<ol style="list-style-type: none"> Llenado a máquina o a mano con letra de molde. (El documento debe de ser claro, legible, sin tachaduras y enmendaduras) Utilizar tinta negra preferentemente. El formato de Aviso de Inicio de Funcionamiento debe presentarse en original y copia. Anexar los documentos de soporte según la actividad, según el caso.
Definiciones
<ol style="list-style-type: none"> Almacenador: Persona física o moral que cuenta con infraestructura necesaria para el resguardo o almacenaje de semilla. Beneficiador: Persona física o moral que cuenta con la infraestructura necesaria para realizar el beneficio de la semilla. Comercializador: Persona física o moral encargada de la venta directa de semilla al agricultor. Distribuidor: Persona física o moral dedicada a la comercialización de semillas que funge como intermediario, entre la empresa productora y el comercializador. Exportador: Persona física o moral que se encarga directamente de la comercialización o intercambio de semilla origen México hacia el exterior. Importador: Persona física o moral que se encarga directamente de la introducción de semilla de origen extranjero al territorio nacional. Obtentor: Persona física o moral que mediante un proceso de mejoramiento haya obtenido y desarrollado una variedad vegetal de cualquier género y especie, y tenga actividades en la producción, certificación y comercio de semillas. Productor: Persona física o moral encargada de la reproducción y/o multiplicación de la semilla y material de propagación.
Anexos
<ol style="list-style-type: none"> Persona física: presentar copia fotostática de identificación oficial vigente. Persona moral: presentar copia fotostática del Acta Constitutiva. En caso de distribuidor presentar documentación que lo acredite como distribuidor de la(s) marca(s) con la(s) que opera. En caso de comercializador se puede presentar copia fotostática del número de registro ante la Cámara de Comercio u otra dependencia de Gobierno Federal. En caso de almacenadores o beneficiadores, se puede presentar croquis de ubicación de instalaciones, capacidad instalada. En caso de Obtentor presentar el Título de Derechos de Obtentor de variedades vegetales o en su caso el registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. Representante Legal presentar copia fotostática de identificación oficial vigente, y en su caso carta poder.
Fundamento Jurídico-Administrativo y de Datos Personales
<ul style="list-style-type: none"> Art. 5 frac. VIII de la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas (15 junio 2007). Art. 53 frac. XI del Reglamento Interior SAGARPA (19 julio 2012). Art. 15 de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo (4 agosto 1994) Última reforma publicada DOF 09 abril 2012. Art. 4, 5 y 10 del Reglamento de la Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas (02 septiembre 2011). Art. 120 frac. I y II de la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública (04 mayo 2015)
Responsable del trámite para consultas
Dirección de Certificación de Semillas del SNICS. Guillermo Pérez Valenzuela, 127, Del Carmen, Coyoacán, 04100, Ciudad de México. Tel. 01 (55) 4196 0535 Correo electrónico: fernando.vieto@sagarpa.gob.mx
Atención al público
<ul style="list-style-type: none"> En cualquiera de las Unidades Operativas del SNICS en las Delegaciones Estatales de la SAGARPA o en la Oficina Central del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). El horario de atención al público es de 9:00 a 15:00 hrs. en días hábiles.
Quejas y sugerencias
<ul style="list-style-type: none"> Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (Oficina Central). Tel. 01 (55) 4196 0535 Sistema de Atención Telefónica a la Ciudadanía (SACTEL) a los teléfonos 1454 2000 en el D. F. y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario al 01 800 112 0584 ó desde E.E. U.U. y Canadá al 1800 475 2383.
Registro Federal de Trámites Empresariales Número
SNICS-00-001
Observaciones
<ul style="list-style-type: none"> El trámite no requiere de resolución dado que tiene la naturaleza de un aviso. Trámite sin costo.

SNICS-00-001



**SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA,
DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN**

**SERVICIO NACIONAL DE INSPECCIÓN Y
CERTIFICACIÓN DE SEMILLAS**



SOLICITUD DE TÍTULO DE OBTENTOR

INSTRUCCIONES: USE LETRA DE MOLDE. NO VÁLIDO SI PRESENTA TACHADURAS O ENMENDADURAS. ESPACIO SOMBREADO RESERVADO PARA OFICINA DE REGISTRO. EN CASO NECESARIO, UTILIZAR HOJAS ADICIONALES PARA INFORMACIÓN COMPLETA. NO DEJAR ESPACIOS EN BLANCO. EN SU CASO, ESCRIBIR "NO APLICA" (EXCEPTO EN CONCEPTOS SEÑALADOS CON *). PRESENTAR ORIGINAL Y COPIA DE TODA LA DOCUMENTACIÓN.

Recepción de la documentación
FECHA:
HORA:

Número de referencia

I. DATOS DEL SOLICITANTE		
1. * Nombre o Razón social del obtentor (en caso de ser más de uno, indicar participación que le corresponda en el aprovechamiento y explotación de la variedad)		
2. * Nacionalidad		
3. * Domicilio en territorio nacional para oír y recibir notificaciones		
Calle	Número	Colonia
Ciudad	Estado	Código Postal
4. Teléfono / Fax		
5. Nombre del representante legal (en su caso)		
6. * Nombre (s) del fitomejorador. En caso de ser más de uno, indicar participación que le corresponda en el aprovechamiento y explotación de la variedad.		
<i>Nombre</i>		<i>Participación (%)</i>
7. Nombre de beneficiario (s) designados por el solicitante. En caso de ser más de uno, indicar participación.		
<i>Nombre</i>		<i>Participación (%)</i>

II. DATOS DE LA VARIEDAD				
8. * Género y especie		8.1 Nombre común		
9. * Denominación propuesta de la variedad				
10. * Se ha comercializado en México o en el extranjero				
Sí ()		NO ()		
En caso afirmativo:				
En México ()		En el extranjero ()		
Desde (fecha):		Desde (fecha):		
		País:		
		Denominación:		
11. * Reivindicación derecho de prioridad				
Sí ()		NO ()		
• En caso afirmativo:				
País (es):				
Fecha de presentación en el otro país:				
ANEXAR SOLICITUD O TÍTULO, Y COMPROBANTE DE PAGO DE DERECHOS				
12. * Tipo de variedad		12.1 Nivel de endogamia		
a)	Línea	() L	S ₀	() 0
b)	Híbrido de cruce simple (A x B)	() S	S ₁	() 1
c)	Híbrido tres líneas (A x B) x D	() T	S ₂	() 2
d)	Híbrido doble (A x B) x (C x D)	() D	S ₃	() 3
e)	Híbrido intervarietal	() HV	S ₄	() 4
f)	Variedad de polinización libre	() VL	S ₅	() 5
g)	Variedad sintética	() VS	S ₆	() 6
h)	Variedad multilínea	() VM	S ₇	() 7
i)	Mestizo	() M	S ₈	() 8
j)	Clon	() C	S ₉	() 9
k)	Otra (indicar fórmula) _____	() O	>S ₉	() 10
13. * Progenitores (conforme el esquema de fórmulas indicado en el apartado anterior).				
	PARENTAL A	PARENTAL B	PARENTAL C	PARENTAL D
a) Denominación				
b) Genealogía				
c) Obtentor				
d) Línea registrada	SÍ () NO ()	SÍ () NO ()	SÍ () NO ()	SÍ () NO ()
e) Forma parte de variedad ya registrada	SÍ () NO ()	SÍ () NO ()	SÍ () NO ()	SÍ () NO ()
En caso afirmativo indique denominación de variedad				

14.* Información sobre el origen, método genotécnico de obtención, mantenimiento y multiplicación

a) Origen

b) Método genotécnico de obtención

c) Proceso a utilizar en la conservación de la identidad varietal

15. * Variedades similares y diferencias respecto a estas variedades

Nombre de la Variedad

Característica

Diferencias

16.* Caracterización de la variedad (indicar si se realizó bajo condiciones controladas)

16.1 Lugar donde se realizó la evaluación y condiciones generales

Localidad

Ciudad

Estado

País

Temperatura media

Clima

Duración de la evaluación

16.2 Variedades utilizadas como referencias en la comparación

a)

b)

c)

17. Información adicional

a) Respuesta a plagas

b) Condiciones especiales para el examen de la variedad

18.* Indicar si se trata de material transgénico (conforme definición Ley Federal de Sanidad Vegetal)

SÍ () NO ()
 En caso afirmativo, ¿cuenta con certificado fitosanitario correspondiente?

SÍ () NO ()

ANEXAR CERTIFICADO O PERMISO FITOSANITARIO

19. Otros datos relevantes

III. DOCUMENTACIÓN COMPLEMENTARIA

- a) Comprobante del pago de derechos ()
- b) Personalidad del representante (instrumento legal) ()
- c) Informe técnico (descripción varietal) ()
- d) Material de propagación ()
- e) Derecho de prioridad (solicitud o título) ()
- f) Certificado fitosanitario ()
- g) Pagos adicionales ()
 Especificar
- h) Otros ()
 Especificar

Recibe: _____

Cargo: _____

Rúbrica: _____

Para la revisión de la solicitud invariablemente deberá presentar anexo el informe técnico y el comprobante de pago correspondiente.

DECLARO, BAJO PROTESTA DE DECIR VERDAD, QUE LOS DATOS QUE SE PROPORCIONAN SON CORRECTOS Y CORRESPONDEN A LA VARIEDAD QUE SE INDICA, Y ME COMPROMETO A FACILITAR, A PETICIÓN DE LA SECRETARÍA, LA INFORMACIÓN, MATERIAL VEGETAL O LAS VERIFICACIONES QUE SEAN REQUERIDAS POR LA MISMA.

México, D.F. a ____ de _____ de ____.

Firma _____

C. _____

NOMBRE DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE LEGAL

INFORMES
 Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS)
 Av. Presidente Juárez Núm. 13
 54000 Tlalnepanitla, Estado de México
 Tels: +52 (55) 3622 0667; 3622-0668; 3622-0669; 3622-0670
 Web site: <http://snics.sagarpa.gob.mx>



A close-up photograph of several vibrant green basil leaves. The leaves are serrated at the edges and have a prominent network of veins. The background is a soft, out-of-focus green, suggesting a healthy plant in a natural setting.

Sección III 

La interacción con el medio ambiente



Mejoramiento genético de chile habanero: selección y registro de variedades mejoradas

Capítulo 6

**Nancy Santana Buzzy,* Adriana Canto Flick, Eduardo Balam Uc,
Susana Avilés Viñas, Guillermo Zetina Rosado,
María del C. Montalvo Peniche, Raúl Valle Gough, Jericó Bello Bello,
Carlos Lecona Guzmán, Daniela Solís Marroquín, Eunice Gómez Uc,
Liliana Muñoz Ramírez, Laura Peña Yam,
Jacobó Pérez Pastrana y Adolfo Guzmán Antonio**
*Autor responsable: nancy@cicy.mx



Resumen

Desde el año 2002, en el CICY se viene desarrollando un programa de mejoramiento genético en chile habanero a partir de la diversidad de la especie en la región. Como punto de partida, se estableció un banco de germoplasma donde se conservan alrededor de 200 accesiones de la especie. A partir de estos recursos genéticos se han venido seleccionando y evaluando materiales genéticos sobresalientes. Actualmente se cuenta con nueve variedades de chile habanero registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) del SNICS. Estas variedades fueron seleccionadas no solo por ser genuinas portadoras de los atributos que distinguen al chile habanero de la Península de Yucatán (sabor, aroma y picor) del cultivado en cualquier otra parte del mundo, sino también por la forma del fruto, su tamaño, por su color, por el peso de fruto, por su productividad y su adaptabilidad a las condiciones del ambiente.

Palabras clave

Banco de germoplasma, selección masal, variedades mejoradas

Introducción

El chile habanero ha sido domesticado en la Península de Yucatán y está fuertemente arraigado a la dieta regional de sus pobladores, consumiéndose tanto fresco como en salsas. Todo ello le confiere a este cultivo un alto valor social, cultural y económico no solo en esta región sino en todo México. Actualmente, el chile habanero es uno de los productos con mayor demanda en los mercados nacional e

internacional. Los elevados contenidos de capsaicina le confieren al cultivo un valor agregado exclusivo a sus frutos. Probablemente la combinación de suelo, clima y humedad en esta región del sureste de México imprimen al chile habanero criollo, características (picor, aroma y sabor) que lo distinguen del chile habanero cultivado en cualquier otra región del mundo. Estos atributos lo han hecho acreedor de la **Denominación de Origen** que recientemente le fue otorgada al chile habanero de la Península de Yucatán. Lamentablemente, muchas de las variedades criollas portadoras de los atributos que las hacen tan codiciadas en el mercado han ido desapareciendo como consecuencia de la introducción de variedades foráneas, las cuales no cubren las expectativas del consumidor, particularmente en cuanto a su aroma, pungencia y sabor. En este contexto, desde hace algunos años venimos trabajando con el fin de establecer las bases científico-metodológicas para el mejoramiento genético del chile habanero.

La mayoría de las variedades de plantas de uso agrícola han sido obtenidas sobre la base de la selección. Este método ha sido ampliamente utilizado desde tiempos muy remotos, lográndose mejoras importantes en muchas especies cultivadas. La elección de la metodología a emplear depende principalmente de los objetivos perseguidos y del sistema de reproducción de la especie. Si bien la mayoría de las especies del género *Capsicum* son consideradas autógamas,⁽¹⁾ se han reportado porcentajes de alogamia que varían entre 7% y 91%. En el caso de chile habanero, aunque es reconocida como una especie autógama, bajo determinadas condiciones puede comportarse como alógama facultativa, pudiendo ocurrir hasta 40% de polinización cruzada. Este comportamiento de la especie debe ser tomado en cuenta tanto en la estrategia de mejoramiento como en la de producción de semilla que se utilice para el cultivo. En *Capsicum*, como en otras especies hortícolas, la obtención de variedades se ha realizado generalmente a través de la selección de fenotipos promisorios dentro de las poblaciones, o bien siguiendo los esquemas de la mejora genética clásica, es decir, hibridación seguida de la selección. Dentro de los métodos más empleados se encuentran: la selección masal, la genealógica y las retrocruzas. El método que utilizamos para nuestro esquema de mejora fue el de **selección masal**. Este método consiste en seleccionar dentro de la población un número de plantas que estará determinado por la presión de selección que apliquemos en cada ciclo. Las plantas seleccionadas deberán tener o acercarse mucho a las características **ideotipo** buscado. Las semillas de estas plantas son cosechadas para establecer la parcela del siguiente ciclo de selección, al que solo pasan las plantas que conservan el **ideotipo** deseado. Por tanto, la **selección masal** es fundamentalmente fenotípica, ya que seleccionamos un conjunto de individuos con el mismo fenotipo y se descartó la variación existente en el material de partida mediante el empleo de los **criterios de selección** determinados al inicio del proceso de selección.

Considerando que Yucatán es centro de diversidad genética de Chile habanero (*C. chinense* Jacq.), y que además existe la necesidad de contar con variedades mejoradas que conserven los atributos que distinguen al chile habanero de la Península, hace alrededor de 10 años en el CICY iniciamos un programa de mejoramiento a partir de la colecta, caracterización y evaluación del germoplasma de la especie.

Resultados

Selección de variedades criollas mejoradas de chile habanero

Como antecedente al trabajo de selección de las variedades criollas de chile habanero, es importante mencionar que durante los primeros años de este proyecto establecimos, a través de sistemáticas colectas en la región, una amplia colección de variedades criollas o autóctonas de la especie. Estas muestras, entradas o accesiones, las hemos venido caracterizando y evaluando a lo largo de estos años. Para este trabajo utilizamos como material genético de partida la diversidad colectada durante los años 2001 y 2002. El establecimiento de semilleros que garanticen la calidad de las plántulas a lo largo del trabajo de selección es una de las actividades más importantes en el mejoramiento (Figura 1).

Figura 1
Establecimiento y desarrollo de los semilleros de las accesiones de chile habanero



La identificación de fenotipos promisorios o candidatos potenciales para la obtención de variedades criollas mejoradas se establecieron a cielo abierto y bajo condiciones de invernadero, las 58 accesiones que existían en el banco en ese momento se sometieron a una caracterización preliminar. Esta colección estaba integrada por chiles de diferentes colores, formas y tamaños de fruto (Figura 2).

Figura 2
Identificación de fenotipos promisorios dentro de la colección de chile habanero conservada-Verano 2002-2004



De esta caracterización resultaron preseleccionados 38 fenotipos criollos los cuales fueron caracterizados en la Primavera-Verano 2002-2003. Para ello se utilizaron descriptores cualitativos y cuantitativos establecidos para el género *Capsicum*,⁽²⁾ (Figura 3).

Por ser la pungencia un carácter distintivo de la especie, fueron determinados los contenidos de capsaicinoides en un grupo de accesiones de la colección, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Figura 4). Extractos obtenidos de frutos completos provenientes de diversas accesiones del Banco de germoplasma de chile habanero del CICY, fueron analizados por cromatografía HPLC para determinar el contenido de capsaicinoides totales, expresados en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido fresco. Las accesiones evaluadas aparecen con el código de identificación con el que fueron registradas al momento de su ingreso al Banco de germoplasma.

Toda la información recopilada, como resultado de la caracterización morfológica, es fundamental para identificar y seleccionar

Figura 3
Descriptorios utilizados para la caracterización de 38 accesiones de chile habanero conservadas en el banco germoplasma del CICY

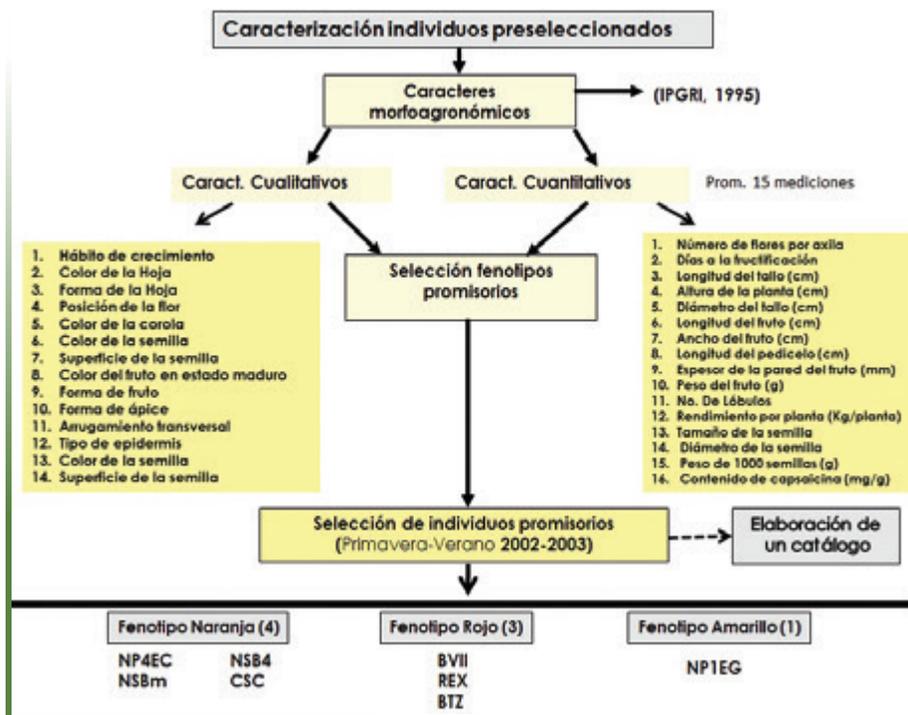
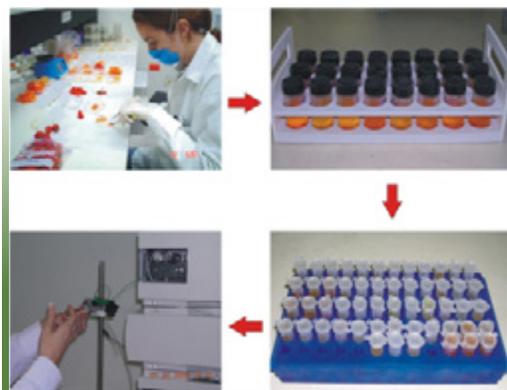


Figura 4
Determinación del contenido de capsaicinoides de las accesiones de chile habanero, en fruto completo, placenta y pericarpio



aquellos materiales genéticos que resultan promisorios (Figura 5). En este trabajo preliminar, a partir de 38 accesiones, ocho

fenotipos resultaron sobresalientes por presentar características del fruto de particular interés. Con el fin de uniformar, homogenizar y estabilizar las características del fruto en los fenotipos de interés, diseñamos una estrategia de selección masal (Figura 6), con cinco ciclos de selección, iniciando el proceso con una presión de selección de 20% y concluyendo con una presión de 2%.

En el **primer ciclo de selección** se estableció un lote de 500 plantas, cultivadas a cielo abierto, para cada uno de los ocho fenotipos promisorios. Este primer ciclo de selección se realizó durante la campaña agrícola Otoño-Invierno 2003-2004, en el municipio de Chicxulub Pueblo y fueron seleccionadas 100 plantas por cada fenotipo (20% de presión de selección), siguiendo el **criterio de selección** establecido para cada ideotipo deseado.

Figura 5
Toma de datos de la planta, las flores y los frutos, de las accesiones estudiadas



Figura 6
Esquema de selección de las variedades sobresalientes de chile habanero



En el **segundo ciclo de selección** se establecieron lotes similares (500 plantas por cada fenotipo), a cielo abierto, en el municipio de Ixil Yucatán, durante el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2004-2005. La presión de selección aplicada en este ciclo fue de 15% (75 plantas seleccionadas) en cada fenotipo. Después del segundo ciclo de selección los lotes fueron de 250 plantas

por cada fenotipo, mientras que la presión de selección se fue incrementando gradualmente. Los ciclos de selección subsiguientes (tercero, cuarto y quinto ciclos) fueron realizados bajo condiciones de invernadero en Chicxulub Pueblo. El tercer ciclo se realizó durante la Primavera-Verano 2006, el cuarto ciclo en Otoño-Invierno 2006-2007. El quinto ciclo y último, fue realizado en la Primavera-Verano 2008. La presión de selección aplicada en estos tres ciclos fue del 10, 5 y 2%, respectivamente.

En el **último ciclo** (quinto) fueron seleccionadas solo cinco plantas por fenotipo, las cuales mantenían de manera homogénea y estable las características correspondientes a cada uno de los **ideotipos** deseados (según criterios de selección). En cada **ciclo de selección**, los frutos de cada planta fueron cosechados y envasados individualmente en bolsas de papel previamente rotuladas, cuidando que no se produzcan mezclas o confusiones (Figura 7).

Figura 7
Colecta de los frutos de cada planta de las variedades seleccionadas y colocados en bolsas de forma individual. Las semillas de cada planta también se mantuvieron independientes



Las bolsas son trasladadas al laboratorio donde continúa la toma de datos (peso, largo, ancho, color, número de lóculos, en-

tre otros) de los frutos. De manera similar, las semillas de cada planta seleccionada fueron conservadas individualmente (por planta) (Figura 8).

Sin embargo, al momento de tomar la semilla para la siembra, por cada fenotipo se utilizó una mezcla de las semillas provenientes de cada una de las plantas seleccionadas en el ciclo inmediatamente anterior, cuidando utilizar la misma cantidad de semilla de cada una de las plantas seleccionadas. Este procedimiento fue aplicado de manera similar para cada uno de los fenotipos seleccionados.

Figura 8
Toma de datos de frutos en el laboratorio: peso, largo, ancho, número de lóculos. Envasado en bolsa individual la semilla de cada accesión para su conservación



En el ciclo agrícola Otoño-Invierno 2008-2009, las ocho variedades fueron validadas en invernaderos tradicionales, en Chichulub Pueblo. Bajo estas condiciones las plantas de chile habanero mostraron su mayor potencial productivo, obteniéndose para ocho variedades un promedio de 4.5 kg/planta. En estas condiciones las plantas pudieron producir durante todo el año (Figura 9).

Figura 9
Validación de las variedades seleccionadas en invernaderos tradicionales, en Chichulub Pueblo (2008 y 2009)



Durante el ciclo Primavera-Verano 2009 (abril-octubre), las ocho variedades fueron montadas en los invernaderos de Maya Vegetales, filial de la empresa La Anita, Condimentos y Salsas S.A. de C.V., donde además de ser validadas para invernaderos de alta tecnología, las variedades fueron inspeccionadas por funcionarios del SNICS para su registro en el CNVV (Figura 10).

Figura 10
Validación de las ocho variedades de chile habanero seleccionadas en invernaderos de Alta Tecnología de la Empresa Maya Vegetales durante 2009



Como resultado de esta etapa, fue obtenido el Registro de las ocho variedades de chile habanero en el CNVV del SNICS, así como la **semilla original** de cada una de las variedades seleccionadas (Figura 11).

Figura 11
Producción de semilla original de las ocho variedades de chile habanero seleccionadas



Aunque la pungencia no fue utilizada como "criterio de selección" por ser este un carácter altamente influenciado por

el ambiente, los resultados obtenidos a lo largo del proceso de evaluación del germoplasma y en los trabajos de selección, evidencian que el chile habanero cultivado en la Península de Yucatán es más pungente que el que se cultiva en cualquier otra parte del mundo, oscilando la mayoría de las accesiones estudiadas entre las 400,000 y las 600,000 SHU (datos no mostrados). NP1EG (Mayan K'iiin) resultó la variedad más pungente con 850 a 1,000 000 SHU de todos los chiles pertenecientes a la especie *C. chinense*, hasta la fecha.⁽³⁾

En las Figuras 12 y 13 se muestran las fichas técnicas con las características más sobresalientes de cada una de las variedades seleccionadas y registradas en 2010, en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) del Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS).

Figura 12
Ficha técnica de variedades rojas y una amarilla de chile habanero que se encuentran registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) del SNICS (Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas)

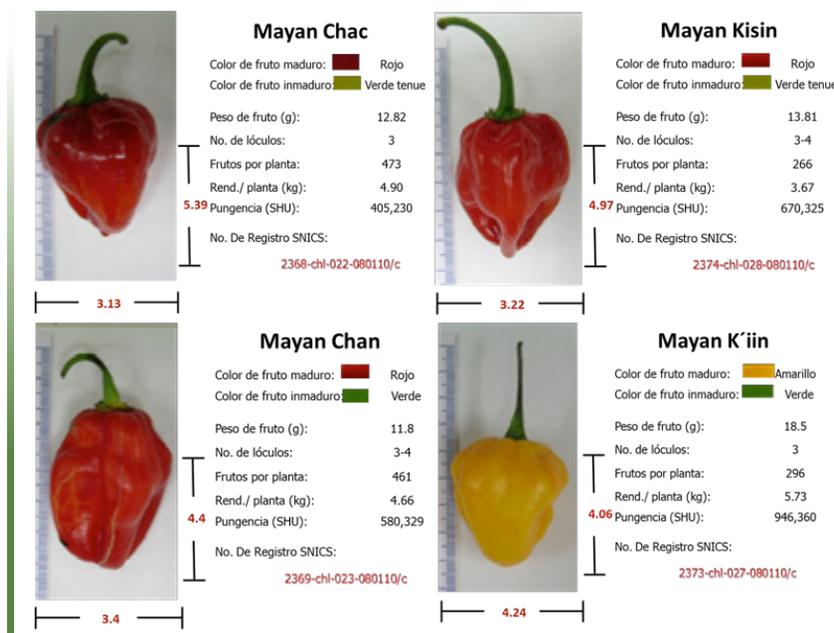
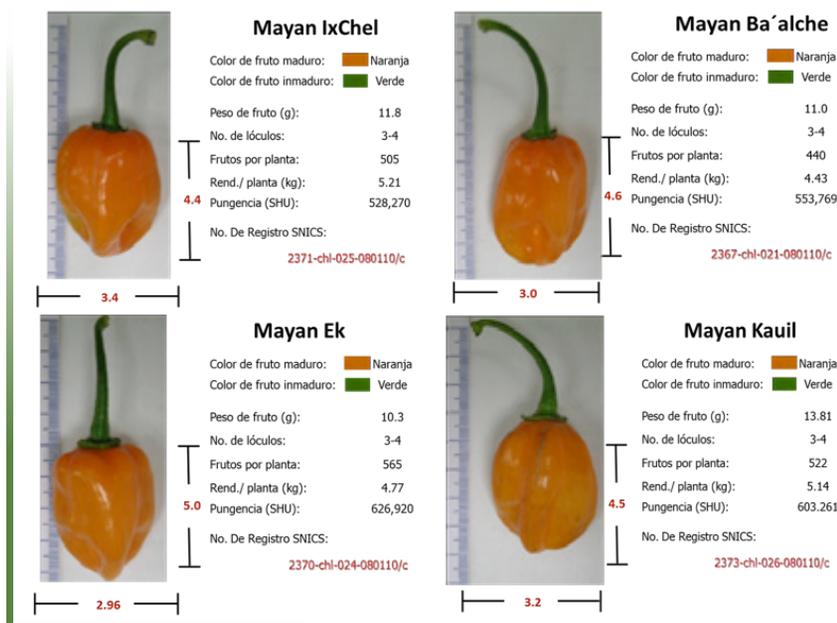


Figura 13

Ficha técnica de variedades de color naranja de chile habanero que se encuentran registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) del SNICS (Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas)



Avances y perspectivas del mejoramiento genético de chile habanero

El mejoramiento genético es el arte y la ciencia de incrementar el rendimiento, la productividad, la tolerancia a agentes abióticos y bióticos adversos, la calidad y/o el rango de adaptación, de las especies vegetales domesticadas. Chile habanero, a pesar de contar con todos los requisitos para contar con un programa de mejoramiento eficiente, ha carecido hasta recientemente de ello. Es indudablemente un cultivo de gran importancia económica, cultural y social para la región, y es además, Yucatán, centro de reserva genética de la especie. Sin embargo, contradictoriamente no existían variedades mejoradas obtenidas a partir de la diversidad genética existente y bajo las condiciones de clima y suelo de la región. El trabajo que hemos desarrollado durante casi una década en el CICY ha per-

mitido poner a disposición de los productores, la sociedad, la industria y el mercado, variedades mejoradas de chile habanero, las cuales conservan aquellos atributos que distingue al chile habanero de la Península (aroma, sabor, pungencia), y que son superiores por otras características por las que fueron seleccionadas (morfológicas y/o agronómicas), lo que las hacen diferentes y sobresalientes, dentro de la gran diversidad de la especie en la región. Por otro lado, por primera vez se ha aplicado una estrategia similar a la de los países de mayor desarrollo en la agricultura: seleccionar variedades para los diferentes "propósitos de producción": consumo fresco, industria y exportación. Así, podemos mencionar que *Mayan Ba'alche* y *Mayan Ek* son variedades de fruto naranja y muy picante. Por

su color y forma, son excelentes candidatas para el mercado en fresco y la exportación. La variedad *Mayan K'iin*, de fruto grande y de color amarillo-anaranjado es altamente productiva; su mayor interés podría ubicarse en las industrias alimenticia y farmacológica, por su elevado contenido de capsaicinoides. *Mayan Kisin*, *Mayan Chac* y *Myan Chac*, por ser variedades de fruto rojo, muy picante, pueden ser materia prima para la producción de salsas, pastas y colorante.

Este trabajo establece las bases fundamentales para implementar programas eficientes de mejoramiento genético para este

importante cultivo. Disponer del germoplasma de la especie, del cual un número importante de las variedades criollas que lo integran han sido caracterizadas morfológica, agronómica y molecularmente, permite contar con una amplia base de información a partir de la cual es posible seleccionar, de manera precisa, los progenitores "ideales" para diseñar híbridos y nuevas variedades que respondan a las expectativas y a las exigencias del productor, del consumidor y de la industria.

Agradecimientos

Estos resultados han sido posibles gracias al apoyo de diferentes fondos (Fondos Mixtos-Yucatán Yuc-2008-CO6-105699, SINAREFI-Sagarpa, Fundación Produce-Yucatán, Conacyt ciencia básica 2008, 100496) y la invaluable participación de muchos estudiantes de diferentes niveles, quienes se han integrado al proyecto de manera entusiasta y responsable.

Referencias bibliográficas

- (1) Tanskley S.D. 1984. "High rates of crosspollination in chile pepper". *HortSci* 19:580-582.
- (2) IPGRI, AVRDC Y CATIE. 1995. *Descriptores para Capsicum (Capsicum spp.)*. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia; Centro Asiático para el Desarrollo y la Investigación Relativos a los Vegetales, Taipei, Taiwán, y Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- (3) Canto-Flick A., Balam Uc E., Bello Bello J.J., Lecona Guzmán C., Solís Marroquín D., Avilés Viñas S., Gómez Uc E., López Puc G., Iglesias Andreu L.G. and Santana Buzzy N. 2008. "Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest known cultivars". *HortSci* 43:1344-1349.



El efecto de ácido salicílico en la bioproductividad de *Capsicum chinense* Jacq.

Capítulo 7

Rodolfo Martín Mex, Ángel Nexticapán Garcey, Adrián Baak Polanco,
Jorge Ariel May Pat, Juliet Barroso Castro, Raymundo López Gutiérrez,
Silvia Vergara Yoisura y Alfonso Larqué Saavedra*

*Autor responsable: larque@cicy.mx



Resumen

Desde 2002 se realizaron ensayos con la finalidad de evaluar el efecto de aspersiones foliares de Ácido Salicílico (AS) en la bioproductividad de chile habanero en parcelas comerciales establecidas en condiciones de campo y en invernadero, en los estados Yucatán y Campeche de la República Mexicana. Los tratamientos consistieron en aplicaciones foliares de diferentes concentraciones de AS (10^{-6} a 10^{-10} M AS) en etapa de plántula. Los resultados obtenidos muestran que hubo incrementos significativos por el efecto del AS en la precocidad de floración, tamaño de raíces, altura de planta, rendimiento y calidad de frutos en comparación con los testigos, por lo que se propone transferir la tecnología al productor.

Palabras clave

Chile habanero, ácido salicílico, raíces, floración, rendimiento

Introducción

El chile habanero (*Capsicum chinense*) ha cobrado en épocas recientes gran importancia en la Península de Yucatán por el impacto que tiene en la economía campesina y porque se ha empezado a industrializar el producto, con el objeto de consolidar una agroindustria que impacte la economía regional. La solicitud de que este producto tenga "la denominación de origen", es muestra clara del interés social en esta especie vegetal.

Con el citado antecedente y con base en diferentes estudios realizados por más de 30 años de investigación por el grupo de trabajo de la presente comunicación, en los que se tiene evidencias de que el Ácido Salicílico (AS) incrementa la productividad de plantas de importancia hortícola, se planteó el presente estudio para evaluar el efecto de este compuesto en chile habanero.

Dentro de las contribuciones publicadas desde 1978 por el grupo de trabajo citado, resaltan los relacionados con su efecto en el enraizamiento⁽¹⁾ y en el cierre estomático.^(2,3) Estos trabajos que se iniciaron a nivel de laboratorio han sido transferidos al desarrollo de investigación aplicada, que ha permitido estimar el potencial de este regulador del crecimiento.

La investigación aplicada para cotejar el efecto del AS en sistemas agrícolas comerciales ha demostrado que aplicaciones de AS a plantas intactas afectan positivamente la bioproductividad,⁽⁴⁾ el crecimiento radical,^(6,7,8) el incremento de biomasa^(6,9) y que induce precocidad de la floración.^(10,11) De manera paralela se han desarrollado otros estudios como el conocer que favorece la embriogénesis somática en cultivo de tejidos.⁽⁵⁾

El presente estudio también se enmarca en la tendencia internacional de la sustentabilidad de los sistemas de producción agrícola ya que se deben proponer modelos de lograr una producción sostenida sin degradar los recursos naturales. En este contexto cabe señalar que el AS es un producto natural cuya aplicación se considera que no contamina el medio. Con base en lo anterior, el objetivo general del presente trabajo fue evaluar en condiciones de producción establecidas en campo e invernadero, el efecto del Ácido Salicílico (AS) en parámetros de crecimiento, producción y calidad del chile habanero.

Metodología

Desde 2002 se han establecido experimentos en condiciones de campo, en suelos pedregosos en Chicxulub Pueblo y Conkal, y en condiciones de suelos mecanizados en Tizimín Yucatán y en Calkiní Campeche. De igual forma, también se establecieron experimentos en condiciones de invernadero en Chicxulub Pueblo.

Dichos experimentos fueron establecidos en parcelas de productores, utilizando sus propias variedades de chile y las tecnologías comerciales probadas, que no se describen en el presente escrito, pero que se pueden consultar en las tesis y publicaciones correspondientes.

Tratamientos establecidos para evaluar el efecto del AS

I. Efecto de AS en plántulas de chile habanero

Para la evaluación del efecto de salicilatos en plántulas de chile habanero se asperjó el AS (10^{-6} a 10^{-10} M) por la mañana, a los 9 y 13 días después de la emergencia. Las soluciones de ácido salicílico (Merck) utilizadas en el presente estudio fueron preparadas siguiendo la metodología ya definida.⁽⁶⁾

II. Efecto en rendimiento en plantaciones comerciales de chile habanero en campo e invernadero

Para la evaluación de rendimiento se utilizaron plántulas de chile habanero de 15 días de edad, a las que se le asperjó AS. Los tratamientos fueron concentraciones de 10^{-6} a 10^{-10} M AS, que se aplicaron en tres ocasiones a todo el follaje de la planta has-

ta punto de goteo con una aspersora manual; la hora de aplicación fue entre las 7:00 y las 8:00 horas, las aspersiones se realizaron a los 15, 22 y 29 días de edad, tiempo en el cual las plántulas se encuentran en charolas en el vivero (Figura 1).

Figura 1
Aspersión de AS en plántulas de 15 días de edad en vivero



Diseño experimental

Para la evaluación del efecto del AS en desarrollo de las plántulas se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 24 repeticiones por tratamiento. En la evaluación del efecto del AS en el rendimiento de chile habanero en condiciones de campo e invernadero, se utilizó en un diseño experimental de bloques al azar con ocho repeticiones por tratamiento y como unidad experimental 12 plantas (Figura 2).

Figura 2
Diseño experimental de bloques al azar en campo



Análisis de datos. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza y cuando se detectaron diferencias estadísticas se realizó la comparación de medias por el método Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS.⁽¹²⁾

Variables evaluadas. Con el fin de analizar los mecanismos de respuesta del chile habanero a las aspersiones foliares del ácido salicílico, se determinó evaluar algunos cambios en la fenología: raíces y área foliar en plántulas, altura de planta, días a floración y el rendimiento total de frutos.

Resultados

I. Efecto de ácido salicílico en plántulas de chile habanero

Tanto la altura como área foliar de las plántulas se incrementaron por el efecto del AS (Figura 3). El tratamiento en el que se aplicó 10^{-6} M de AS incrementó la altura en 19.4% en comparación con el control, esto es, de 107 mm del control a 128 mm del tratado.

Figura 3
Efecto de AS en plántulas de chile habanero



Las plantas tratadas con ácido salicílico presentaron una mayor área foliar, siendo el mejor tratamiento 10^{-6} M que presentó un incremento de hasta del 69.1% en comparación con el control (Cuadro 1).

Cuadro 1

Efecto de diferentes concentraciones de ácido salicílico en el crecimiento aéreo de plántulas de chile habanero, 34 días después de la emergencia

Tratamientos	Altura (cm)	Area Foliar (cm ²)
Testigo	10.7±0.3b	20.1±1.6a
10^{-10} M AS	11.1±0.1ab	27.3±1.3b
10^{-8} M AS	12.8±0.3b	31.9±1.6c
10^{-6} M AS	12.8±0.3b	34.1±1.7c

En el Cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos del efecto del AS en la longitud y peso seco de la raíz en comparación con el tratamiento control.

Con la concentración de 10^{-8} M el incremento en la longitud de raíz fue de 35.7% en comparación con el control, mientras que la concentración de 10^{-6} M el incremento fue equivalente a 29.4%. El peso seco de la raíz también fue incrementado por el efecto del AS. Las aspersiones de AS a una concentración de 10^{-8} M afectan significativamente el peso de la raíz en 84.3% en comparación con el control.

Cuadro 2

Respuesta de la raíz de plántulas de chile habanero 34 días después de la emergencia, al efecto de diferentes concentraciones de ácido salicílico

Tratamientos	Longitud de la Raíz (mm)	Peso seco Raíz (g)
Testigo	71.3±0.2c	0.070±0.0c
10^{-10} M AS	78.3±0.1b	0.115±0.0b
10^{-8} M AS	96.7±0.3a	0.129±0.0a
10^{-6} M AS	92.2±0.3a	0.108±0.0b

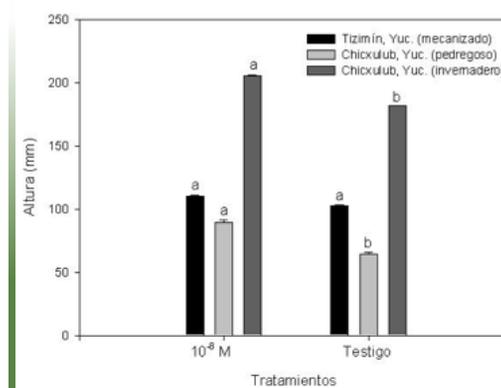
II. Efecto en rendimiento en plantaciones comerciales de chile habanero en campo e invernadero

1. Efecto de ácido salicílico en la altura de la planta

Respecto de la altura de planta, la mayor altura se obtuvo en la siembra de invernadero, seguida por la de suelo mecanizado y, por último, en suelo pedregoso (Figura 4).

En todas las condiciones de cultivo, el AS incrementó la altura, presentando diferencias significativas en suelo pedregoso con un incremento de 38.5% con respecto del testigo y de un 13.6% de incremento en las plantas crecidas en invernadero.

Figura 4
Efecto del ácido salicílico en la altura de plantas



2. Efecto de ácido salicílico en precocidad de floración

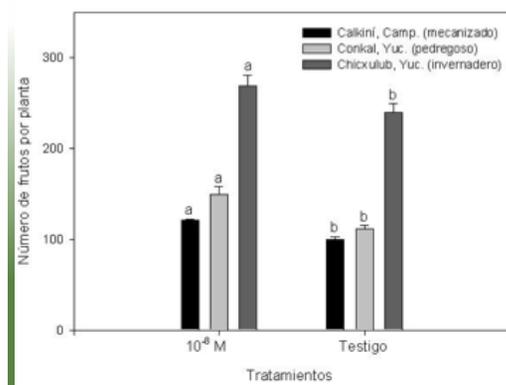
En los diferentes ensayos establecidos en suelo pedregoso, mecanizado e invernadero, se observó una precocidad de floración de 3 a 5 días con los tratamientos de AS con respecto del testigo, en las diferentes épocas de cultivo, sin embargo, éstas no resultaron ser significativas.

3.Efecto de ácido salicílico en el número de frutos por planta

En cuanto al número de frutos por planta, se observaron diferencias en la producción de éstos, dependiendo de la condición de cultivo. De tal manera que la mayor producción de frutos en invernadero fue superior a 100% con respecto de la producción de frutos de plantas establecidas en campo abierto (Figura 5).

En todas las condiciones de cultivo, el AS incrementó el número de frutos con respecto del testigo establecido en cada una de estas condiciones de cultivo; observándose incrementos de 21% en suelo mecanizado, 33% en suelo pedregoso y 12% en invernadero.

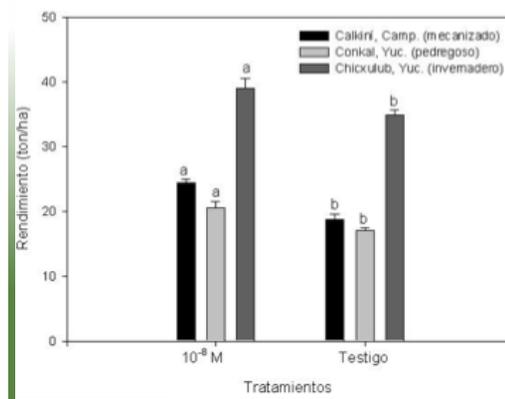
Figura 5
Efecto del ácido salicílico en el número de frutos por planta de chile habanero



4.Efecto de ácido salicílico en el rendimiento por hectárea

El AS incrementó el rendimiento en 30.5% (24.4 ton/ha) en suelo mecanizado, 19.8% (20.5 ton/ha) en suelo pedregoso y 12% (38.9 ton/ha) en invernadero, en comparación con sus testigos comerciales cuyos rendimientos fueron de 18.72, 17.1 y 34.8 ton/ha, respectivamente (Figura 6).

Figura 6
Efecto del ácido salicílico en el rendimiento por hectárea de chile habanero



5.Efecto de ácido salicílico en postcosecha **Pérdida de peso.** En la Figura 7 se muestran los resultados que indican que de los tratamientos de AS, la concentración de 10⁻⁶ M perdió el 17.6% de su peso, el tratamiento de 10⁻⁸ M disminuyó en 18.9%, mientras que el testigo perdió 21.7% de su peso.

Consistencia del fruto. La distancia inicial penetrada por la aguja en la pared del fruto en todos los tratamientos fue de 2 mm; después de 18 días de almacenamiento los datos obtenidos indican que los tratamientos de 10⁻⁶ y 10⁻⁸ M de AS mantuvieron una mejor consistencia al registrar valores de penetración de 12.3 y 13.3 mm respectivamente, estos valores fueron inferiores a los registrados por el testigo cuya distancia de penetración del fruto fue de 15.7 mm (Figura 8).

Figura 7

Efecto del ácido salicílico en la pérdida de peso de frutos de chile habanero almacenados a 20 ± 1 °C

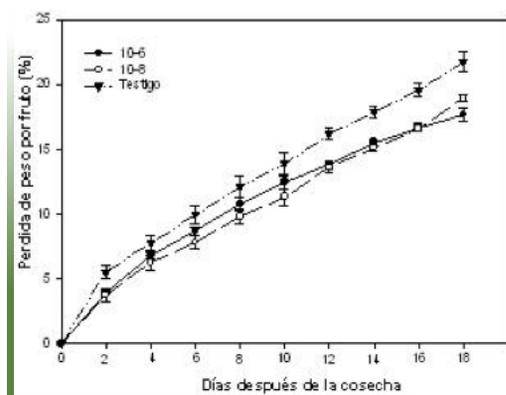
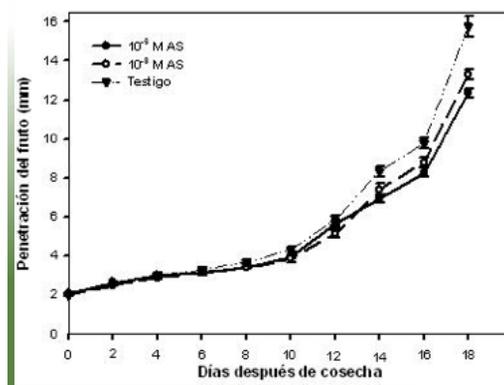


Figura 8

Efecto del ácido salicílico en la consistencia de frutos de chile habanero almacenados a 20 ± 1 °C



Discusión

Los resultados que se presentan del efecto del AS en chile habanero, permiten confirmar que este regulador del crecimiento tiene impacto en incrementar la bioproduktividad del chile habanero afectado por su efecto de incrementar el tamaño del sistema radical de las plantas.⁽⁶⁾ Este efecto en la raíz trae por consecuencia que el AS afecte positivamente el desarrollo

del dosel de estas mismas plantas, datos que coinciden con lo recientemente publicado por Yildirim y Dursun (2009)⁽¹³⁾ con plantas adultas de tomate. Estos autores utilizaron concentraciones de 0.50 mM de AS y reportaron también que se favorece el incremento del área foliar y también el diámetro del tallo.

Conclusiones

1. Se validó el efecto positivo del AS en la bioproduktividad del chile habanero, lo que permite proponer que esta tecnología se aplique para aumentar la producción comercial en la Península de Yucatán ya que potencialmente se podrá incrementar el rendimiento de entre 12% y hasta 30%.

2. El costo de esta tecnología es muy bajo, ya que las aplicaciones del producto se realizan en su totalidad en la etapa de

plántula en invernadero antes de ser trasplantada en campo.

3. El ácido salicílico es un producto que no afecta al medio ambiente ni la salud del personal que lo aplique.

Agradecimientos

Proyecto Uso de compuestos tipo aspirina como una alternativa para incrementar la productividad de hortalizas en el Estado de Campeche. Clave CAMP-2005-C01-042. Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Campeche. 2005.

Proyecto Incremento de la productividad de chile habanero por compuestos tipo aspirina. Clave YUC-2004-C03-024. Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Yucatán. 2005.

Proyecto Efecto del ácido salicílico en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Clave 3304. Fundación Produce Yucatán, A.C. 2004.

Proyecto Efectos hormonales del dimetil sulfóxido (DMSO) en vegetales. Clave 33647-B Conacyt. 2000.

Referencias bibliográficas

- (1) Basu R.N., Bose T.K., Roy B.N. and Mukhopadhyay A. 1989. "Auxin Synergist in rooting of cuttings". *Physiol. Plant* 22: 649-652.
- (2) Larqué-Saavedra A. 1978. "The antitranspirant effect of acetylsalicylic acid on *Phaseolus vulgaris*". *Physiol. Plant* 43:126-128.
- (3) Larqué-Saavedra A. 1979. "Stomata closure in response to acetylsalicylic acid treatment". *Z. Pflanzphysiol.* 93(4):371-375.
- (4) Larqué-Saavedra A., Martín-Mex R. 2007. "Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants". In: S. Hayat and A. Ahmad (eds.) *Salicylic Acid: A Plant Hormone*, Springer, Dordrecht The Netherlands. pp. 15-23.
- (5) Quiroz-Figueroa F., Méndel-Zeel M., Larqué-Saavedra A., Loyola Vargas V.M. 2001. "Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture". *Plant Cell Rep* 20: 679-684.
- (6) Gutiérrez-Coronado M., Trejo L.C., Larqué-Saavedra A. 1998. "Effect of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean". *Plant Physiol and Biochem.* 36: (8) 563-565.
- (7) Echeverría-Machado I., Escobedo, Gracia-Medrano R.M., Larqué-Saavedra A. 2007. "Responses of transformed *Catharanthus roseus* roots to femtomolar concentrations of salicylic acid". *Plant Physiol and Biochem.* 45: 501-507.
- (8) Larqué-Saavedra A., Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., Vergara-Yoisura S., Gutiérrez-Rendón M. 2010. "Efecto del ácido salicílico en el crecimiento de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)" *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16(3): 183-187.
- (9) San Miguel R., Gutiérrez M., Larqué-Saavedra A. 2003. *Salicylic acid increases the biomass accumulation of Pinus patula*. *Southern Journal of Applied Forestry* 27: 52-54.
- (10) Martín-Mex R., Villanueva-Couoh E., Herrera-Campos T., Larqué-Saavedra A. 2005. "Positive effects of salicylates on the flowering of african violet". *Scientia Horticulturae*, 103: 499-502.

- ⁽¹¹⁾ Martín-Mex R., Vergara-Yoisura S., Nexticapan-Garcéz A., Larqué-Saavedra A. 2010. "Application of low concentrations of salicylic acid increases the number of flowers in *Petunia hybrida*". *Agrociencia* 44(7):773-778.
- ⁽¹²⁾ SAS Statistical Analysis System Institute. 2004. SAS Proceeding Guide, Version 8.1. SAS Institute. Cary, NC. USA.
- ⁽¹³⁾ Yildirim E., Dursun A. 2009. "Effect of foliar salicylic acid applications on plant growth and yield of tomato under greenhouse conditions". Pp. 395-400. In: Tüzel Y. et al. (eds.) *Proc. IS on Prot. Cult. Mild Winter Climate. Acta Horticulturae* 807 pp.
- ⁽¹⁴⁾ López-Gutiérrez R. 2003. Reguladores del crecimiento XVIII: El efecto del ácido salicílico en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario de Tizimín Yucatán. SEP/SEIT.
- ⁽¹⁵⁾ May-Pat J. 2005. Reguladores de crecimiento XXVII: Efecto del ácido salicílico en la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en invernadero. Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, Edo. de México.
- ⁽¹⁶⁾ Barroso-Castro J. 2006. Reguladores de crecimiento XXVI: Crecimiento de la raíz en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) por el efecto de salicilatos. Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2 de Conkal, Yucatán.
- ⁽¹⁷⁾ Baak-Polanco A.E. 2007. Reguladores de crecimiento XXV: Efecto del ácido salicílico en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en suelos pedregosos de Yucatán. Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2 de Conkal, Yucatán.





Las principales plagas en chile habanero y su manejo en la Península de Yucatán

Capítulo 8

Rodolfo Martín Mex,* Ángel Nexticapan Garcez
Daisy Pérez Brito y Alfonso Larqué Saavedra
*Autor responsable: rodolfo@cicy.mx



Resumen

En la Península de Yucatán el cultivo del chile habanero es una de las especies de hortalizas de mayor importancia económica y social, ya que constituye una importante fuente de ingresos de los productores y sirve como materia prima de diferentes industrias. Sin embargo, las plagas han ocasionado fuertes pérdidas de capital para los productores. La exagerada aplicación de insecticidas contra estas plagas ocasiona serios problemas en el ecosistema como: residuos en las cosechas, resistencia en los insectos a los insecticidas, reducción de la fauna benéfica e incremento de la contaminación ambiental, además de elevar los costos de producción. Por tal motivo, el presente capítulo tiene como finalidad orientar a los productores en el conocimiento de aspectos básicos como morfología y biología de especies de insectos o ácaros plaga, lo que es indispensable para la implementación del manejo integrado de plagas (MIP).

Palabras clave

Capsicum chinense, plagas, manejo integrado de plagas

Introducción

Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo importante en la Península de Yucatán. En campo abierto el rendimiento promedio es de 15 t·ha⁻¹ y en invernadero de 7 kg·m⁻², sin embargo, la producción es disminuida por el daño de diversas plagas, que constituyen una limitante severa para el cultivo, ya sea por la afectación en sus diferentes estados de desarrollo, por daño directo a la planta o por ser vectores de virus.

De acuerdo con nuestra experiencia y por los monitoreos y registro de plagas en chile habanero en condiciones de campo abierto e invernadero, las plagas más frecuentes en el mismo son: mosquita blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*), picudo

del chile (*Anthonomus eugenii*), ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*) y en menor frecuencia minador de la hoja (*Liriomyza sp.*), gusano soldado de franjas amarillas (*Spodoptera ornithogalli*) y gusano del fruto (*Heliothis zea*).^(1,2)

Por la problemática de plagas presente en el cultivo de chile habanero, se hace necesario establecer un programa de manejo integrado de plagas. Por ello en el presente capítulo se mencionan aspectos de biología y hábitos de las plagas, así como el monitoreo y opciones para el manejo cultural, biológico, biorracional y químico de plagas, haciendo énfasis en los diferentes modos de acción de insecticidas.

Plagas

1. Mosca blanca del tabaco (*Bemisia tabaci*) y mosca blanca de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*)

Biología. Los adultos de *B. tabaci* y de *T. vaporariorum* miden alrededor de 1 mm de largo. Las dos especies son difíciles de distinguir en el campo, pero difieren ligeramente ya que las alas de *Bemisia* están dispuestas en forma de tejado y ligeramente separadas, esta característica hace posible que su cuerpo, que es de color amarillo, sea más evidente, mientras que los adultos de *Trialeurodes* presentan las alas en forma de triángulo. Respecto del ciclo biológico *Bemisia* presenta un ciclo de vida de 18 días a 30 °C y *Trialeurodes* de 26 días a la misma temperatura.

Hábitos y daños. Tanto adultos como ninfas, generalmente se encuentran en el área abaxial (envés) de las hojas y ocasionan daños directos como amarillamientos y debilitamiento de las plantas. Los daños indirectos son la presencia de fumagina (un hongo, *Meliola sp.*) que se desarrolla en las excretas ricas en azúcares. También se ha observado que sirve de transporte al ácaro blanco, que se sujeta a las patas de *Bemisia*. Sin embargo, el principal daño de la mosca blanca radica en que es el vector de varios virus. Estas especies son vectores de más de

treinta enfermedades virales, entre las que destacan el virus chino del tomate (CdTV), virus del enrollamiento de la hoja de la calabaza (SqlCV), virus del amarillamiento de la hoja enrollada del tomate (TYLCV), virus huasteco del chile (PHV), virus rizado amarillo del chile (VRACH), entre otros.⁽³⁾

Monitoreo. Para adultos se basa en el uso de trampas amarillas con pegamento y para los estados inmaduros se monitorea en el envés de las hojas de la parte media y baja de las plantas para buscar la presencia de ninfas; los huevecillos se localizan en grupos principalmente en el envés de hojas jóvenes. De acuerdo con la presencia y cantidad, se decide la estrategia de control a seguir.

Figura 1

Daños de virosis en chile habanero



2. Picudo del chile (*Anthonomus eugenii*)

Biología. Los adultos son de color marrón rojizo a negro, miden alrededor de 3 mm, con la característica de una probóscide (pico) curva. Los huevos eclosionan en 3 o 4 días, las larvas tienen forma de "C", son de color blanco y ápodas. El estadio larval dura de 6-12 días y luego se transforman en pupas. La longevidad de los adultos es de tres meses, las hembras ponen alrededor de 340 huevos en un período de más de un mes, con una tasa de oviposición promedio de seis por día.

Figura 2
Adulto de picudo del chile



Hábitos y daños. Por lo general, el adulto llega a los campos nuevos de chile cuando se inicia la floración, atraído por sustancias volátiles que son producidas por las flores; se alimenta de follaje, botones tiernos y yemas terminales, provocando su caída. La oviposición se realiza en botones desarrollados, flores y frutos tiernos. Los frutos dañados se distinguen por la coloración amarillenta de la base del pedúnculo (cáliz), además de que la mayoría de ellos se caen debido a que la larva se alimenta de la pulpa y de las semillas en formación. Los adultos salen de los frutos haciendo una

perforación circular del tamaño de su cuerpo. Con temperaturas cálidas (alrededor de 28 a 30 °C), la totalidad del ciclo de vida se completa en tres semanas.^(3,4)

Figura 3
Daños de picudo en frutos de chile habanero



Monitoreo. Antes de la floración se pueden utilizar trampas amarillas con feromonas de agregación y atrayente alimenticio, para detectar la presencia de adultos. El umbral de acción es de un picudo adulto por cada 100 botones florales revisados.

3. Ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*)

Biología. El adulto mide de 0,2-0,3 mm; es de forma ovalada, de color blanquecino a amarillo-verde translúcido. Los machos miden la mitad del tamaño de las hembras y presentan el cuarto par de patas más desarrolladas y transformadas en pinzas, que les sirve para sujetar y transportar a la pupa hembra y, posteriormente, esperar a que emerja el adulto, tras lo cual se produce el apareamiento. Los huevecillos son elípticos, incoloros, transparentes y con el corión cubierto con unas 30 proyecciones de color blanquecino. Son puestos por se-

parado en el envés de las hojas apicales, en las hendiduras de los frutos pequeños y las flores. La fase larvaria se alimenta por 2-3 días y se desarrolla en una fase de reposo ninfal. El ciclo de vida solo requiere de 4 a 5 días en condiciones de 25 °C y alta humedad relativa.^(3,5)

Hábitos y daños. Pueden dispersarse sujetos a las tibias y tarsos de las patas de *Bemisia tabaco*; el daño es causado por la secreción de auxinas o toxinas al alimentarse y pueden producir graves daños en follaje y frutos. Los síntomas foliares incluyen distorsión, bronceado, rizado, secado de las hojas y acortamiento de entrenudos. Estos síntomas pueden ser fácilmente confundidos con una enfermedad viral, deficiencia de micronutrientes o daño de herbicida. Los frutos pueden ser deformados, agrietados (“cracking”) o acorchados. Los daños permanecen durante semanas después de que los ácaros se han controlado, lo que dificulta la detección de las poblaciones reales de la plaga, y puede ocasionar errores en la toma de decisiones para su control. Si el daño es severo, las plantas no emiten nuevos rebrotes y su recuperación es muy lenta, incluso después de que las poblaciones de ácaros hayan disminuido por la aplicación de acaricidas.

Figura 4
Daños de ácaro blanco
en brotes de chile habanero



Monitoreo. Comienza desde el desarrollo de la plántula en vivero y se mantiene durante el ciclo de cultivo. El envés de las hojas jóvenes deben ser examinadas con una lupa 20X, o las hojas deben ser colectadas y examinadas con un microscopio de disección. Sin embargo, en muchas ocasiones pasan inadvertidos y se detectan cuando el daño es irreversible.

4. Minador de la hoja (*Liriomyza* sp.)

Biología. Los adultos son pequeñas moscas de alrededor de 2 mm de longitud, de cuerpo color negro en la parte superior y amarillo en la cabeza, los lados y debajo del tórax. La superficie superior del tórax de los adultos de *L. sativae* es negra brillante, mientras que la de *L. trifolii* es mate. Las larvas de ambas especies son de color amarillo y viven dentro de las hojas.⁽⁶⁾

Hábitos y daños. Las hembras adultas insertan los huevecillos individualmente en la superficie superior de las hojas jóvenes. Al eclosionar las larvas se alimentan de las hojas, formando una mina. Las larvas maduras salen a través de una abertura de salida al final de las minas y caen al suelo, donde se forma la pupa que tiene forma de barril de color naranja-café. Al pasar nueve días emergen los adultos. La hembra utiliza su ovipositor para hacer agujeros más grandes y alimentarse del exudado del contenido de las células. Los daños económicos son causados por las minas ya que las galerías abundantes pueden reducir la fotosíntesis y provocar la desecación y caída de las hojas, lo que puede dar lugar a quemaduras de los frutos por el sol. Las galerías también pueden servir como puntos de entrada para enfermedades bacterianas y fungosas.

Figura 5
Adulto de minador de la hoja



Monitoreo. Los adultos son atraídos por el color amarillo, y comercialmente hay disponibles trampas amarillas con pegamento, que se pueden utilizar para monitorear cambios de densidad de poblaciones de adultos de minador. Las trampas pueden ser colocadas de la mitad hacia abajo de las plantas y deben ser revisadas dos veces por semana. En el muestreo directo se cuenta el número de larvas vivas en toda la planta. El número de larvas muertas puede ser utilizado para estimar la eficacia de los tratamientos insecticidas o el éxito del control biológico.

5. Gusano soldado de franjas amarillas (*Spodoptera ornithogalli*)

Biología. El desarrollo larvario requiere aproximadamente de dos a tres semanas, dependiendo de la temperatura. Los huevecillos son depositados en masas, cubier-

Manejo de plagas

La base del éxito en el manejo de plagas en una plantación comercial es el monitoreo, que permite determinar la existencia de las principales plagas, permite conocer su distribución, su biología, ecología e impacto económico en las áreas destinadas a

tas de escamas del cuerpo de la palomilla. El color de la larva varía de gris a negro. La larva tiene una raya amarillo-naranja a lo largo de cada lado y un par de rayas negras; se observan manchas triangulares en la parte posterior de la mayoría de los segmentos. La palomilla tiene las alas anteriores oscuras con blanco y marcas de color marrón y blanco detrás de las alas.^(7,8) En invernaderos de Yucatán y Campeche se han encontrado múltiples generaciones.

Figura 6
Adulto del gusano soldado de franjas amarillas



Hábitos y daños. Las larvas eclosionan a partir de la masa de huevos y comienzan a alimentarse de las hojas antes de pasar a los frutos.

Monitoreo. Frecuentemente se monitorea de una o dos veces por semana, para detectar la presencia de masas de huevecillos o larvas pequeñas. Se recomienda revisar 20 plantas por cada hectárea.

la producción de chile habanero. Este punto es determinante para implementar estrategias de manejo integrado (control cultural, biológico, biorracional o químico) para regular las poblaciones de las plagas, a niveles que no causen daños económicos al cultivo.^(9,10)

Control cultural

Algunas recomendaciones importantes para el manejo fitosanitario consiste en la limpieza alrededor y dentro del cultivo, de arvenses, consideradas como reservorio de plagas como mosca blanca, ácaro blanco, picudo y virus. También se recomienda usar plántulas sanas producidas en invernaderos protegidos.

Control biológico

De manera comercial, se pueden encontrar entomopatógenos que son agentes de control biológico, destacando los hongos y las bacterias. Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado *Beauveria bassiana* (Naturalis, Bea-Sin, Spectrum Bea B), *Metarhizium anisopliae* (Meta-Sin, Spectrum Meta A), *Paecilomyces fimosoroseus* (Pae-Sin, Spectrum Pae F), recomendadas para el control de mosca blanca, pulgones y picudo del chile. La especie *Paecilomyces lilasinus* (Pae-Sin, Spectrum Pae L, Nemaroot, Biostat) se recomienda para el control de nematodos. Es importante comentar que en campo la utilización de parasitoides, depredadores y entomopatógenos contra insectos vectores de virus no es viable, ya que los enemigos naturales requieren la presencia de los insectos fitófagos para alimentarse y en estos casos el umbral de estos insectos vectores es cero. Tomando en cuenta lo anterior, antes de generar el uso de cualquier agente de control biológico, se deben de hacer estudios para demostrar su eficiencia.

Control biorracional

Para el manejo de las plagas que se presentan en el chile habanero se recomienda realizar aplicaciones de extractos de plantas, jabones agrícolas y aceites, ya que son una alternativa efectiva cuando el riesgo fitosanitario es manejable. Las ventajas que presentan son el poco efecto negativo sobre la fauna benéfica, la reducida o nula selección de resistencia a insecticidas y el costo económico bajo. Este

manejo es muy importante, ya que se pueden realizar aplicaciones frecuentes a intervalos de 4-5 días. Además, el aceite es efectivo para evitar la transmisión de virus por áfidos.

- **Extractos de plantas.** Estos productos normalmente actúan como alomonas de acción repelente y la mayoría se formulan como: extractos de ajo, ejemplo de estos productos comerciales son: Ajick (2-3 L/ha), Bralic (1.5-3 L/ha), Garlic Barrier (0.75-1 L/ha); derivados de tricarbóxilos vegetales Bio-Die (1-1.5 L/100 L de agua); y con base de extractos de semilla de nim se tienen PHC Neem (5-10 mL/L de agua) y Neemix (0.5-1.5 L/ha).
- **Jabones agrícolas.** Solo actúan por contacto directo con las plagas; los jabones más comunes son las sales potásicas de ácidos grasos. Los ácidos grasos alteran la estructura y la permeabilidad de las membranas celulares de los insectos y el insecto muere rápidamente. No hay actividad residual insecticida una vez que la aplicación por aspersion se haya secado. En el mercado se tienen Ultralux (1 L/300 L de agua), Impide (2 L/200 L de agua) y Green Soap (0.5 L/200 L de agua).

Aceites. Además de actuar directamente contra insectos vectores, también reducen significativamente la diseminación de virus no persistentes transmitidos por pulgones, al quedar adheridos en su estilete. Se encuentran registrados para el control de plagas EPA 90 (extracto de semilla de soya) (1-3 L/ha), Proganic Oil (extracto de semilla de cártamo, girasol y soya) (L/ha). Es importante mencionar que el éxito en el control de plagas de los insecticidas biorracionales depende de la cobertura de aplicación que se logre con los mismos. Estos productos deben de cubrir completamente el follaje y dar prioridad al envés de la hoja, lo cual se

logra con equipo de alta presión, que proporcione mayor penetración y cobertura de la aspersión.^(11,12)

Control químico

Para el uso de insecticidas químicos resulta importante implementar un programa en el que se roten los productos disponibles, para preservar y prolongar su efectividad, así como su uso continuado. Para lograrlo es importante que los productores y técnicos comprendan el modo de acción (MoA) de los productos utilizados. El MoA se refiere a la suma de interacciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas, o a las respuestas resultantes de la acción tóxica de los productos utilizados para controlar las plagas. Dicho de otra manera, el MoA es la forma en que un producto afecta de manera negativa los procesos metabólicos y/o fisiológicos de un ácaro o insecto plaga hasta causar su muerte. Lamentablemente, dicho modo de acción no siempre es conocido o comprendido, y puede haber más de un tipo de acción asociado a un mismo producto, por lo tanto es importante conocer el MoA, para poder diseñar de manera efectiva los programas de rotación, de manera que incluyan insecticidas con distinto modo de acción, no subgrupos químicos diferentes. De los ingredientes activos registrados ante el USDA, para su uso en Chile y que tienen menor impacto en la fauna benéfica (parasitoides y depredadores) y abejas, se encuentran los **inhibidores selectivos o bloqueadores de la alimentación**. De este grupo son: Plenum 50 GS (pymetrozine) y el Beleaf (flonicamid), que trabajan afectando el comportamiento de pulgones y mosca blanca,⁽¹³⁾ que se alimentan de los tejidos del floema, obstruyendo o bloqueando la regulación neural de la absorción del agua en las partes bucales.

Los reguladores de crecimiento de insectos (IGR) son utilizados principalmente para

matar estadios inmaduros o jóvenes. Por ejemplo los **análogos o simuladores de las hormonas juveniles** como el Knack (pyriproxyfen), que afecta el desarrollo de la mosca blanca y los trips, ocasionando que permanezcan jóvenes o inmaduros, impidiendo completar su ciclo de vida. Los **inhibidores de la síntesis de la quitina** como el Applaud (buprofezin), afectan las enzimas que estimulan la formación de la quitina durante el proceso de muda de la mosca blanca o el piojo harinoso. Otros insecticidas de diferente modo de acción son el Oberon (spiromesifen) y el Movento (spirotetramat), que actúan **inhibiendo la síntesis de lípidos**, en los estados inmaduros de mosca blanca; el primero, además, tiene efecto acaricida, y Movento tiene efecto sobre pulgones y puede reducir la fertilidad de las hembras de mosca blanca. El Coragen (rynaxypyr) es un insecticida cuyo modo de acción consiste en **modular el receptor Rianodin**; afecta ninfas de mosca blanca y larvas de minador de la hoja. El grupo de los neonicotinoides comprende cinco insecticidas sistémicos con registro USDA, para usar en Chile: Actara 25 WG (thiametoxam), Confidor (imidacloprid), Rescate (acetamiprid), Clutch (clothianidin) y Venom (dinotefuran), los cuales actúan como **antagonistas de los receptores de la nicotina-acetilcolina** de los insectos; estos receptores forman parte del sistema nervioso central. Debido a que todos los nicotinoides tienen el modo de acción similar, es importante evitar usarlos en sucesión, ya que esto incrementará la “presión de selección” sobre la población del insecto que se requiere controlar, y potencialmente estimulará el desarrollo de resistencia al insecticida. Se recomienda utilizar dos o más insecticidas con MoA diferente, antes o después de haber usado un producto con base nicotinoide. El uso de insecticidas que actúan como **inhibidores de la acetilcolinesterasa** (organofosforados y carbamatos) y los **moduladores de los canales de sodio**

(piretroides), se recomiendan solo en caso necesario, debido a que son insecticidas con un amplio espectro de acción y altamente tóxicos a la fauna benéfica y abejas. En todos los casos es importante utilizar las dosis

recomendadas, así como utilizar equipo de protección (mascarillas, lentes y overol) al momento de realizar las aplicaciones de insecticidas, para evitar intoxicaciones.

Discusión

Una de las principales limitantes en la producción de chile habanero en campo abierto e invernadero son las plagas, destacando la mosca blanca como la más importante por ser vector de virus y porque puede ocasionar pérdidas hasta de 100% si se presenta en etapas tempranas del cultivo. Le sigue en importancia el picudo del chile, que puede ocasionar pérdidas en el rendimiento de hasta 50%.

Es vital, considerando lo anterior, contar con un programa de monitoreo de plagas, independientemente de la superficie de la plantación, ya que el monitoreo constituye una herramienta importante para la toma de decisiones en el manejo de las

mismas. El conocimiento de los hábitos de cada una de las plagas es necesario para tomar la decisión de que estrategia aplicar y en qué momento.

Para el establecimiento de una estrategia de manejo adecuada es importante garantizar no sólo la erradicación o control de la plaga que afecta al chile, sino también otros aspectos como son: evitar que se desarrolle resistencia por parte de la plaga, la menor contaminación del ambiente y la mayor inocuidad posible para los frutos que se van a cosechar.

Conclusiones

En la producción de chile habanero en campo abierto e invernadero se requiere desarrollar un plan de manejo fitosanitario

integrado que considere los aspectos agronómicos, biológicos, culturales, químicos, ambientales y legales.

Agradecimientos

Proyecto "Uso de compuestos tipo aspirina como una alternativa para incrementar la productividad de hortalizas en el estado de Campeche". Clave CAMP-2005-C01-042. Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Campeche. 2005.

Proyecto "Incremento de la productividad de chile habanero por compuestos tipo aspirina". Clave YUC-2004-C03-024. Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Yucatán. 2005.

Proyecto "Efecto del ácido salicílico en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Clave 3304. Fundación Produce Yucatán, A.C. 2004.

Referencias bibliográficas

- (1) Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A. y Larqué-Saavedra A. 2009. "Manejo de plagas en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en campo abierto en Campeche, México". Sexta Convención Mundial del Chile. Mérida, Yucatán. pp. 128-133.
- (2) _____ 2009. "Manejo integrado de plagas en chile habanero en Yucatán México". *De Riego*. Año. 7, Núm. 46, octubre-noviembre. pp. 6-9.
- (3) _____ 2011. "Las tres principales plagas del chile habanero". *De Riego*. Año 10, Núm. 59, diciembre-enero, pp. 56-61.
- (4) _____ 2008. "El picudo del chile, lo que se necesita saber acerca de su biología y control". *Uuyu T'aan* (Fundación Produce Yucatán), Año. 4 Núm. 1. pp. 3-5.
- (5) Palevsky E., Soroker V., Weintraub P., Mansour F., Abu-Moach F. and Gerson U. 2001. "How specific is the phoretic relationship between broadmite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Acari: Tarsonemidae), and its insect vectors". *Exp Appl Acarol*. 25:217-224.
- (6) Capinera J.L. 2001. Vegetable leafminer, *Liriomyza sativae* Blanchard (Insecta: Diptera: Agromyzidae) UF/IFAS Pub. EENY-255. <http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/leaf/vegetableleafminer.htm>.
- (7) Heppner J.B. 1998. *Spodoptera armyworms in Florida* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Dept. Agric. Cons. Serv., Div. Plant Industry, Entomol. Circ. 390.
- (8) Capinera J.L. 2005. Yellowstriped armyworm, *Spodoptera ornithogalli* (Guenee) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) UF/IFAS Pub. EENY-216. http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/leaf/yellowstriped_armyworm.htm
- (9) Boucher T.J., Ashley R.A. 2004. *Northeast Pepper Integrated Pest Management (IPM) Manual*. University of Connecticut. NE IPM Special Project No. 529054.
- (10) Weintraub P.G. 2007. "Integrated control of pests in tropical and subtropical sweet pepper production". *Pest Manag Sci*. 63:753-760.
- (11) Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., Canché-Kuyoc J.C., Cocom-Uc S., Itzincab-Sánchez R.M. y Larqué-Saavedra A. 2008. "Manejo integrado de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) Y picudo (*Anthonomus eugenii* Cano) en chile habanero en Tizimín, Yucatán". V Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca. Fundación Produce Yucatán A.C. Mérida, Yucatán. 5 pp. (versión electrónica).
- (12) Gastelum L.R. y Rodríguez C. 1999. "Empleo de aceites y jabones como alternativas biorracionales para el control de plagas". En: *Memoria del curso de control alternativo de insectos plagas*. Colegio de Postgraduados-Fundación Mexicana para la Educación Ambiental A.C. pp. 79-88
- (13) Martín-Mex R. y Larqué-Saavedra A. 2009. "Mosca blanca: Control químico. Desafío" (Fundación Produce Yucatán). Año. 1, Núm. 6. Mayo-junio. pp. 34-35.



Desarrollo del sistema radical de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante las fases iniciales postrasplante

Capítulo 9

Adolfo Guzmán-Antonio, Teresita de Jesús Celis-Arámburo,
Mildred Carrillo-Pech, Fátima Medina-Lara,
Manuel Martínez-Estévez e Ileana Echevarría-Machado*
*Autor responsable: ileana@cicy.mx



Resumen

El chile habanero, un cultivo de gran importancia comercial en Yucatán, requiere de trasplante para una producción exitosa. Nosotros estudiamos el crecimiento y desarrollo del sistema radical de chile habanero durante los primeros 46 días postrasplante y las tasas de crecimiento fueron comparadas con las de la parte aérea de la planta. Se identificaron tres estados básicos: de 0 a 7 días postrasplante, caracterizado por un crecimiento lento en ambas partes, pero mayor en el sistema radical; de 7 a 28 días postrasplante, con un crecimiento acelerado inicial del sistema radical y, posteriormente, un crecimiento rápido en la parte aérea; de 28 a 46 días postrasplante, con un crecimiento menor del sistema radical y un crecimiento aéreo intensificado. Estos ajustes en el desarrollo del sistema radical (plasticidad morfológica) permiten a la planta una mejor adaptación en las primeras etapas después del trasplante.

Palabras clave

Trasplante, crecimiento radical

Introducción

Generalmente, las plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) que se obtienen a partir de la germinación de la semilla y el posterior crecimiento en invernadero son utilizadas por los productores para el trasplante en el campo, en lugar de la siembra directa de la semilla en el suelo. Este proceso es común para las especies hortícolas, pero la etapa de trasplante está acompañada por altos niveles de estrés para la planta. En la Península de Yucatán, el chile habanero crece en suelos muy heterogéneos, frecuentemente rocosos, caracterizados por una baja fertilidad, donde el nitrógeno y el potasio son los nutrientes más limitantes.⁽¹⁾ Bajo estas condiciones se requiere un sistema radical permanentemente activo, donde las raíces jóvenes deben desarrollarse continuamente para explotar eficientemente los suelos pobres y mantener un adecuado desarrollo de la planta.

La naturaleza de las raíces presentes en las plántulas tiene que ser considerada antes de que sea discutido el efecto de diferentes factores (tipo de suelo, temperatura del suelo, nutrición, etc.) sobre el proceso de trasplante. Si las raíces con diferentes respuestas morfológicas y/o fisiológicas al ambiente son consideradas como un único tipo o no son diferenciadas, será imposible extraer una conclusión válida en estas investigaciones.^(2,3)

A pesar de que el chile habanero es un recurso económico significativo para la región, no se han llevado a cabo estudios sobre el crecimiento y desarrollo del sistema radical de esta especie, particularmente después del proceso del trasplante. Sin embargo, se han publicado algunas investigaciones sobre el desarrollo de la parte aérea y del sistema radical de plantas de *Capsicum*, especialmente para diferentes cultivares de *Capsicum annum*.^(4,5,6,7)

Se requiere una mayor comprensión de la arquitectura y desarrollo de la raíz para lograr tener un trasplante exitoso, con menores tasas de mortalidad postrasplante e incremento en los rendimientos. El objetivo del presente estudio fue identificar los cambios en el desarrollo radical de plantas de chile habanero creciendo bajo condiciones de invernadero y correlacionar estos cambios con el desarrollo de la parte aérea de la planta.

Resultados

1. Desarrollo postrasplante

En este estudio se utilizaron plántulas de chile habanero (cv. naranja) de aproximadamente 30-40 días post-germinación (18-20 cm de altura y aproximadamente cinco pares de hojas). Los productores de chile habanero de Yucatán utilizan comúnmente plántulas de esta edad, debido a que las tasas de sobrevivencia de las mismas son más altas. Las plántulas se trasplantaron a cajas de 60 x 45 x 10 cm. La mezcla de suelo que se utilizó fue 2:1 K'an kab:peat moss. Las concentraciones (g/kg) de los nutrientes minerales en el suelo fueron: K, 0.0043; Ca, 0.28; Mg, 0.0140; Na, 0.0337 y P, 2.20×10^{-5} . Las plántulas crecieron en condiciones de invernadero (Centro de Investigación Científica de Yucatán), con riego diario a lo largo de todo el experimento y no se les aplicó algún régimen de fertilizante para prevenir cual-

quier alteración en el crecimiento normal de la raíz. Las evaluaciones de crecimiento se realizaron hasta los 46 días después del trasplante (DDT); sin embargo, cinco plántulas fueron analizadas hasta los 150 DDT, para documentar el número de flores y frutos formados por planta.

El trasplante no causó efectos adversos significativos (abscisión de hojas o muerte) sobre las plántulas. El desarrollo de la parte aérea fue homogéneo entre las plántulas a través del período de evaluación. Las plantas comenzaron a florear a los 28 DDT y presentaron de tres a cinco frutos incipientes a los 46 DDT.

La floración fue abundante (183 ± 39 flores por planta), pero el cuajado del fruto fue bajo, presentando una tasa de aborto floral de aproximadamente un $90 \pm 3\%$.

Desarrollo del sistema radical y de la parte aérea

El crecimiento de la planta fue monitoreado semanalmente hasta los 14 DDT y quincenalmente hasta los 46 DDT. Estas frecuencias fueron seleccionadas para documentar mejor los cambios en el crecimiento de las plantas de chile habanero durante las etapas iniciales de desarrollo de las plantas después del trasplante.

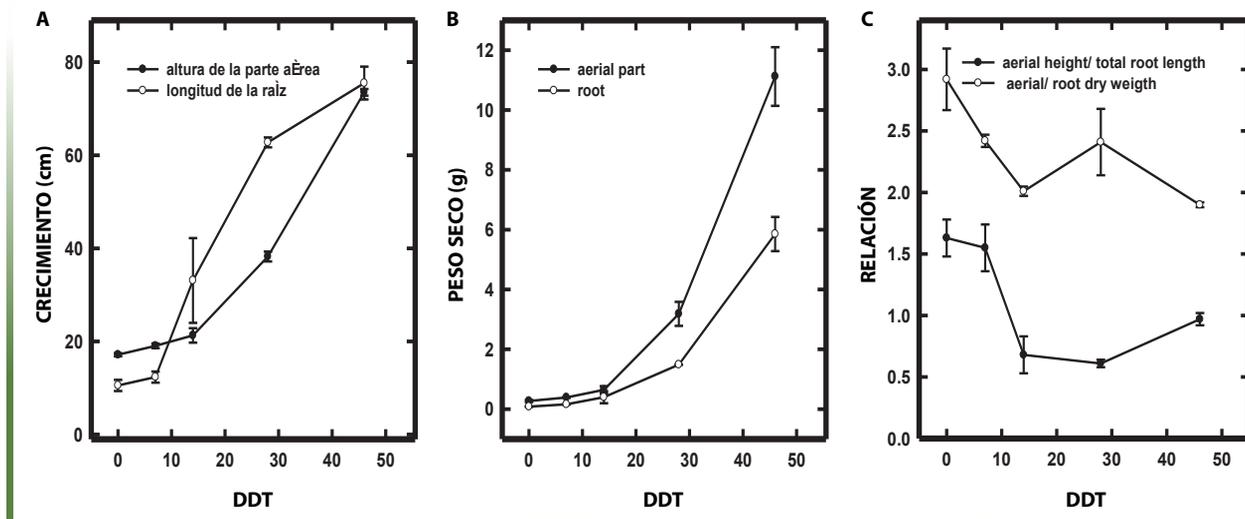
No se observaron cambios drásticos en el crecimiento de la parte aérea o del sistema radical durante los primeros siete días post-trasplante (Figura 1A). Después de este día, la longitud del sistema radical incrementó rápidamente, mientras que la altura de la planta permaneció relativamente invariable (Figura 1A). Tanto la parte aérea como el sistema radical crecieron notablemente después de los 14 DDT, observándose un incremento significativo en la altura y el peso seco aéreo (Figuras 1A y B) y un crecimiento

similarmente rápido en el sistema radical hasta los 28 DDT (Figura 1A). A las 46 DDT, el sistema radical había incrementado su longitud siete veces y su peso seco 60 veces, comparado con los parámetros que presentó al momento del trasplante, mientras que la parte aérea aumentó cuatro y 39 en altura y peso seco, respectivamente.

El crecimiento, expresado como las relaciones altura de la parte aérea:longitud del sistema radical y pesos secos aéreo:radical indican claramente que el crecimiento de la raíz fue mayor al de la parte aérea hasta los 14 DDT (Figura 1C); ambas relaciones disminuyeron hasta este día. Al día 28, la relación altura:longitud fue similar a la del día 14, incrementando posteriormente al día 46. En contraste, el crecimiento de la parte aérea basado en la relación de peso seco aumentó hasta el día 28, disminuyendo ligeramente a los 46 DDT (Figura 1C).

Figura 1

Dinámica de crecimiento de plántulas de chile habanero creciendo bajo condiciones de invernadero, a los 0, 7, 28 y 46 días después del trasplante (DDT). (A) Altura total de la parte aérea y longitud total del sistema radical; (B) pesos secos de la parte aérea y de la radical, y (C) cambios en las tasas altura de la parte aérea:longitud del sistema radical y de pesos secos aéreo:radical. Los valores representan el promedio de cinco réplicas (una planta por réplica) y las barras verticales indican el error estándar de la media



Estos resultados indican que durante los primeros 14 DDT ocurre un crecimiento radical profundo, el cual continúa hasta los 28 DDT; sin embargo, al llegar a los 14 DDT comienza un crecimiento acelerado de la parte aérea de la planta. Los datos sugieren que a los 14 DDT comienza una competencia por fotosintatos entre el sistema radical y la parte aérea, pero al día 46 DDT se podrían estar canalizando más recursos para procesos vitales en la parte aérea (floración y fructificación).

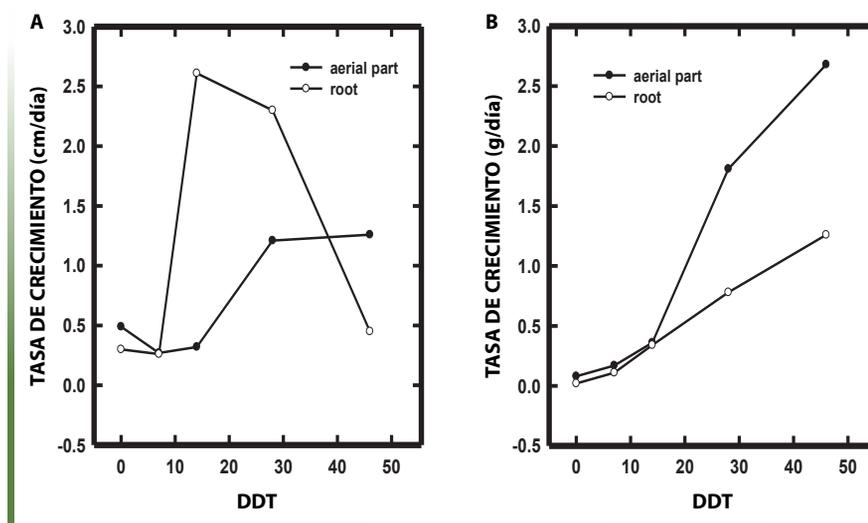
Cuando se cuantificó por longitud (cm/día), el crecimiento en el sistema radical fue menor comparado con el que se presentó en la parte aérea en los primeros 7 DDT, mientras que fue extremadamente alto entre los 7 y 14 DDT (Figura 2A), con una tasa máxima de 2.5 cm/día. La tasa de

crecimiento del sistema radical disminuyó a partir de entonces, alcanzando los valores más bajos (0.5 cm/día) a los 46 DDT. En contraste, la tasa de crecimiento de la parte aérea fue mínima hasta los 14 DDT (~0.5 cm/día) e incrementó entonces continuamente hasta alcanzar un máximo de más de 1.0 cm/día a los 46 DDT.

Cuando se expresó en términos de peso (g/día), la tasa de crecimiento no fue significativamente diferente entre el sistema radical y la parte aérea hasta los 14 DDT (Figura 2B). Sin embargo, después de este tiempo el crecimiento de la parte aérea se intensificó notablemente hasta un máximo de más de 2.5 g/día a los 46 DDT, tiempo en el que el crecimiento del sistema radical fue menor (~1.0 g/día) (Figura 2B).

Figura 2

Cambios en las tasas de crecimiento de la parte aérea y radical a los 0, 7, 28 y 46 días después del trasplante (DDT) basado en (A) la altura y la longitud (cm/día) y en (B) pesos secos (g/día)



Arquitectura del sistema radical

El número y la longitud total de raíces laterales secundarias mostraron cambios durante el período de estudio. El número

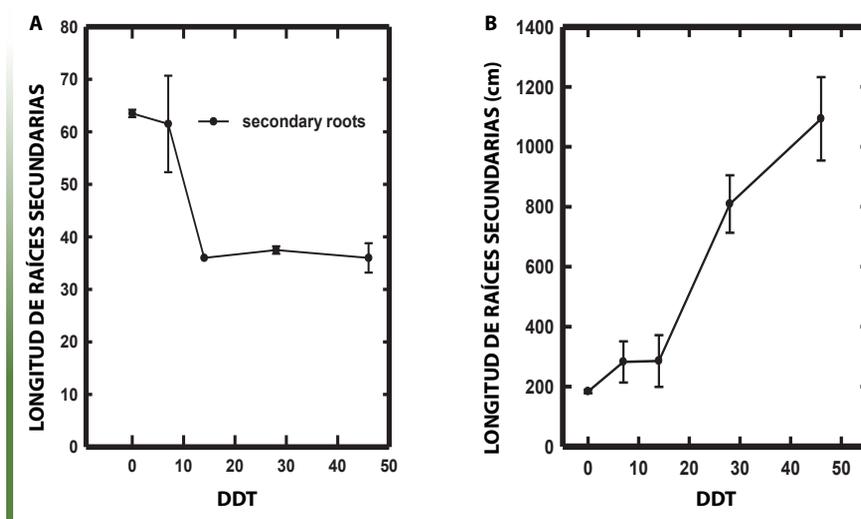
disminuyó significativamente hasta los 14 DDT y entonces permaneció constante hasta los 46 DDT; esto es, no se formaron nuevas raíces laterales de segundo orden

a partir de los 14 DDT (Figura 3A). Sin embargo, la longitud de estas raíces aumentó regularmente hasta los 46 DDT y este incremento fue particularmente intenso entre los 14 y 28 DDT (Figura 3B). Además,

el diámetro de las raíces secundarias aumentó a lo largo del período de estudio, especialmente desde los 28 a los 46 DDT (datos no mostrados).

Figura 3

Cambios en la formación y el crecimiento de raíces secundarias de las plántulas de chile habanero creciendo en condiciones de invernadero a los 0, 7, 28 y 46 días después del trasplante (DDT). (A) Número total de raíces laterales secundarias; (B) crecimiento de raíces laterales secundarias basado en la longitud total. Los valores representan el promedio de cinco réplicas (una planta por réplica) y las barras verticales indican el error estándar de la media



En el presente estudio, la raíz primaria de las plántulas de chile habanero cesó de crecer después del trasplante, resultando en una morfología del sistema radical similar a la reportada para *C. annuum* por Steer y Pearson:⁽⁸⁾ largas ramificaciones laterales en lugar de una gran raíz primaria. Este comportamiento no ha sido previamente reportado para chile habanero.

La formación de raíces finas (terciarias y de mayor orden) aumentó durante los primeros 14 DDT y entonces se intensificó a una tasa similar hasta los 28 DDT. Entre los 28 y los 46 DDT, la formación de raíces terciarias

continuó a una tasa constante y la formación de raíces de más de tercer orden se aceleró notablemente (Figura 4A). En conjunto, por cada raíz lateral se formaron aproximadamente 60 raíces laterales de tercer orden y 115 raíces laterales de más de tercer orden, al día 46 DDT.

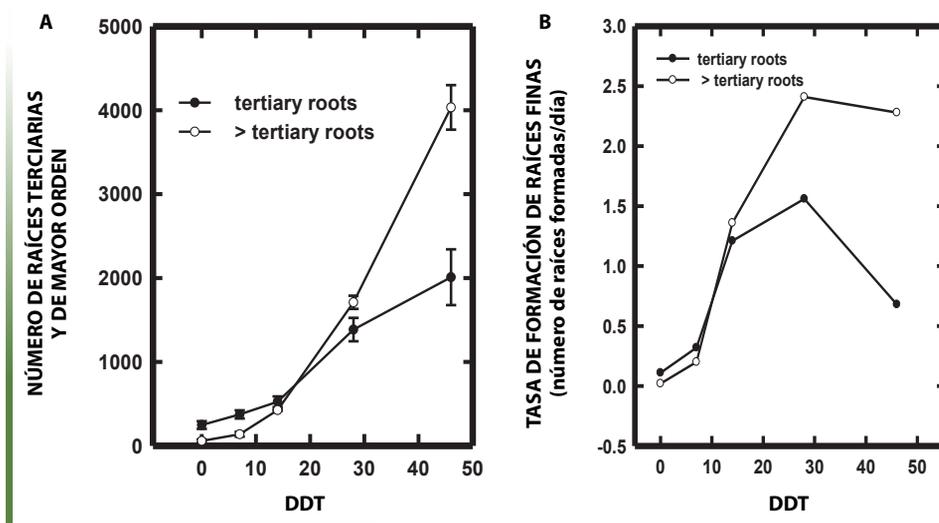
La tasa de formación de raíces finas, basada sobre el número de raíces finas formadas por día aumentó hasta los 28 DDT, cuando la formación de raíces terciarias alcanzó un máximo de 1.5 raíces/día y las de mayor de tercer orden de 2.5 raíces/día (Figura 4B). Desde los 28 a los 46 DDT, la tasa de forma-

ción de raíces terciarias disminuyó a menos de 0.5 raíces/día, mientras que las de orden mayor a las terciarias disminuyeron única-

mente a 2.0 raíces/día. No se observó una reducción significativa en el crecimiento de las raíces finas a lo largo de este estudio.

Figura 4

Número de raíces finas (terciarias y de mayor orden) (A) y tasa de formación de las mismas (B) después del trasplante. En A, los valores representan el promedio de cinco plantas y las barras verticales indican el error estándar de la media



Discusión

El aborto floral que se observó en este trabajo es un comportamiento que ha sido reportado anteriormente, tanto para *C. chinense*,⁽⁹⁾ como para *C. annuum*.^(10,11) Las plantas de chile habanero que crecen en las regiones subtropicales se enfrentan frecuentemente a altas temperaturas durante el cuajado de los frutos, lo cual provoca que estén expuestas a un estrés por calor a temperaturas que excedan pocos grados de las óptimas reportadas para el cultivo (temperaturas medias diarias entre 25-27 °C).⁽¹²⁾ Nuestro experimento se desarrolló entre los meses de marzo-julio, donde la temperatura promedio fluctuó entre los 26 y 30 °C, con máximas hasta

de 39.4 °C en el mes de abril, por lo que es claro que esto ocurrió, en nuestro caso, particularmente durante el período de floración-fructificación.

En chile habanero, el sistema radical podría tener un papel importante en la traslocación y partición de los fotosintatos a escala de planta completa, un fenómeno reportado para otras solanáceas como *C. annuum*^(8,13) y tomate.⁽¹⁴⁾ La traslocación de fotosintatos desde las hojas hacia otros órganos de la planta en *C. annuum* (cv. California Wonder) es más rápida inicialmente a partir de las hojas más jóvenes, donde la fotosíntesis neta es mayor.⁽⁸⁾

La planta madura trasloca carbono desde las hojas hacia las raíces y los frutos. Marcelis y col.⁽¹⁰⁾ reportaron que existe una competencia entre estos dos órganos por fotoasimilatos en *C. annuum* (cv. Mazurka). González-Real y col.⁽¹³⁾ reportaron que *C. annuum* (cv. Cornado) invierte una gran cantidad de materia seca en el crecimiento del sistema radical, pero es capaz de ajustar esta inversión durante la fructificación, al traslocar la mayoría de los nuevos asimilados al fruto en crecimiento.

Después del trasplante, las raíces laterales se elongaron, lo cual es una ventaja para las plantas durante el establecimiento postrasplante y también bajo condiciones de deficiencia de agua.⁽¹⁴⁾ Esta elongación adelanta la capacidad para producir más raíces laterales; por ello, el número de raíces secundarias fue reducido a la mitad. El estrés que ocurre en la etapa de trasplante puede inducir el crecimiento de las raíces secundarias más desarrolladas y eliminar aquellas menos desarrolladas. Las raíces secundarias más desarrolladas son más eficientes en la absorción de nutrientes que las menos desarrolladas y es más costosa para la planta soportar el crecimiento y desarrollo de nuevas raíces secundarias. Además, la muerte de aquellas raíces secundarias incipientes podría liberar nutrientes vitales para el crecimiento de las otras raíces laterales.⁽¹⁶⁾

Las plasticidades morfológica y fisiológica son el resultado directo de cambios basados en las interacciones entre el genotipo y el ambiente. La longitud radical es un parámetro morfológico que describe mejor la capacidad de las raíces para explorar el suelo. Las plantas pueden producir raíces más largas, ya sea al incrementar la traslocación de biomasa hacia la raíz o aumentando la fineza de la raíz y/o reduciendo la densidad del tejido radical.⁽¹⁷⁾ Los resultados obtenidos aquí

indican que bajo estas condiciones el chile habanero opta por esta segunda estrategia de plasticidad (reducción en la densidad de raíces laterales) para adaptarse al estrés inicial del trasplante. Sin embargo, ya que este experimento fue conducido sin fertilizantes, la adición de éstos durante los estados iniciales (antes de los 14 DDT) podría reducir la pérdida de las raíces secundarias, además de incrementar la longitud radical, como ha sido reportado en otras especies.⁽²⁾

La intensa formación de raíces terciarias y de mayor orden hasta los 46 DDT podría ocurrir para apoyar los procesos de floración y fructificación, los cuales requieren grandes cantidades de energía. Bajo estas condiciones se necesita un sistema radical muy eficiente en cuanto al costo, y la producción de raíces finas requiere un consumo relativamente bajo de fotosintatos. Además de esto, estas raíces pueden absorber nutrientes muy eficientemente, permiten la explotación de grandes volúmenes de suelo y tienden a tener una conductividad hidráulica mayor, aumentando de este modo la eficiencia en el transporte de nutriente.⁽¹⁸⁾

El sistema radical es la parte de la planta que responde a la mayoría de los estreses ambientales a los que ésta se encuentra expuesta. Este sistema está comprendido de órdenes o clases de raíces que difieren genética en el desarrollo y funcionalmente. El estudiar los órdenes radicales en el chile habanero nos permitirá tener en cuenta la contribución de cada uno a una respuesta particular.

La estructura de raíz pivotante es fuertemente dependiente del genotipo, mientras que las laterales, las cuales se encuentran involucradas en la adquisición de nutrientes, son más sensibles a las condiciones ambientales.^(2,3) Además, diferentes tipos de raíces tienen diferentes niveles de

tolerancia. Chile habanero produce una gran cantidad de raíces de tercer orden, las cuales se han reportado como más tolerantes a metales pesados⁽¹⁹⁾ y a estrés salino,⁽²⁰⁾ además de incrementar la capacidad de la planta para la toma de nitrato y agua.^(2,21,22)

Los resultados presentados aquí muestran que las plantas de chile habanero experimentan cambios significativos en el crecimiento durante los primeros estadios después del trasplante. Estos cambios pueden ser agrupados en tres etapas mayores:

A. 0-7 DDT: lento crecimiento en ambas partes, aérea y radical, probablemente debido al estrés ocasionado por el trasplante. El crecimiento radical no es rápido, pero es mayor que el de la parte aérea, indicado por una reducción en la relación de los pesos secos aéreo y radical (Figura 1C) y, una disminución en la tasa de crecimiento aéreo (cm/día) en comparación a la tasa de crecimiento del sistema radical (Figura 2A).

B. 7-28 DDT: un crecimiento acelerado del sistema radical mientras que el de la parte aérea permanece relativamente bajo, lo cual es mostrado por la alta tasa de crecimiento radical (cm/día) (Figura 2A), la máxima tasa de elongación de raíces laterales (Figura 3B) y una máxima tasa de formación de raíces finas (Figura 4B). El crecimiento de la parte aérea incrementa entre los 14 y 28 DDT (Figuras 1A y B, Figuras 2A y B) pero no sobrepasa al del sistema radical. A los 28 días la planta comienza la floración.

C. 28-46 DDT: un crecimiento acelerado en términos de la altura y el peso seco aéreo (Figuras 1A y B) y de la longitud del sistema radical (Figura 1A), mientras que la formación de raíces secundarias disminuyó (Figura 3A) y la de raíces finas incrementó (Figura 4). A los 46 DDT las plantas se encontraban en una floración activa y se inició la fructificación.

Tanto la etapa A como la B son óptimas para influir en la producción de una gran masa radical, a través de la aplicación de fertilizantes y/o reguladores del crecimiento. La mayoría de los fotosintetatos producidos en las hojas durante estas etapas son consumidos por la raíz para soportar los procesos de construcción en esta zona. Si se mejora el crecimiento radical en estas etapas se podría afectar positivamente el subsecuente desarrollo y productividad de la planta.

El poseer un sistema radical bien desarrollado antes de que se inicie la formación de frutos es vital. En muchos cultivos la mayoría de los nutrientes, particularmente el nitrógeno, que son consumidos durante la formación y el desarrollo del fruto, son absorbidos antes de que se inicie este proceso y son retraslocados desde las raíces y las hojas hasta el fruto. Por ejemplo, en el trigo y el arroz el 60% y el 90% del nitrógeno en la panícula y en el grano, respectivamente, provienen de la removilización del nitrógeno almacenado en la raíz y los brotes antes de la antesis.^[23] Análisis como éstos no fueron hechos para chile habanero durante el proceso de formación del fruto; sin embargo, la tasa de crecimiento del sistema radical y la formación de raíces laterales disminuyeron cuando la planta entró en una floración intensa y el desarrollo del fruto (46 DDT). En otras palabras, la presencia de un sistema radical bien establecido antes de la formación del fruto con capacidad para una toma eficiente de nutrimentos podría indudablemente tener un impacto positivo sobre la producción y el desarrollo de la planta.

Conclusiones

El trasplante es una etapa crucial en la producción comercial de chile habanero, particularmente bajo estrés ambiental, el cual puede disminuir la tasa de establecimiento de las plantas a partir de plántulas. La producción de plantas vigorosas y altamente productivas con esta técnica depende grandemente del establecimiento inicial de un sistema radical robusto que pueda respaldar una tasa de crecimiento constante. Este trabajo es la primera documentación de los cambios en el desarrollo del sistema radical de chile habanero durante las primeras etapas después del trasplante. El desarrollo del sistema radical en

esta especie es más intenso hasta los 14 DDT; este es el período clave para el crecimiento radical, el cual podría ser necesario para el posterior crecimiento de la parte aérea, resultando en una mayor productividad. Este trabajo proporciona una caracterización inicial del sistema radical de chile habanero en las etapas tempranas después del trasplante. Se deben realizar investigaciones futuras enfocadas al efecto de parámetros tales como regímenes de fertilización y temperatura sobre el desarrollo radical y productividad, teniendo en cuenta que el crecimiento del sistema radical responde a factores ambientales.

Agradecimientos

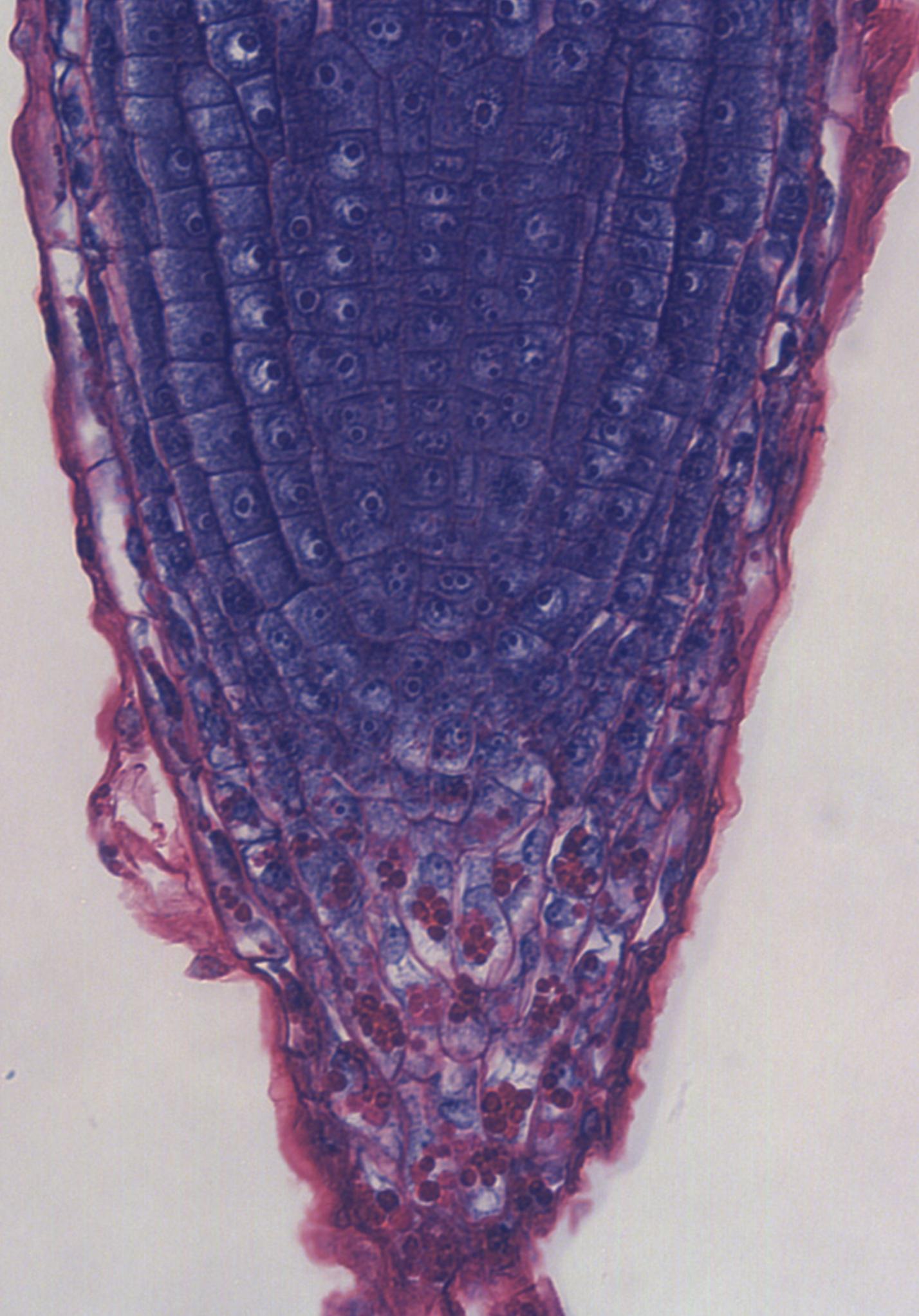
Esta investigación estuvo soportada por Conacyt (Proyecto Núm. 60258).

Referencias bibliográficas

- (1) Dzib-Echeverría R., Uribe-Valle G. 2009. "Soil fertility and the use of fertilizers in habanero pepper". Segunda Convención Mundial de Chile 2005. pp. 205-209.
- (2) Sorgona A., Abenavoli M.R., Gringeri P.G., Cacco G. 2007. "Comparing morphological plasticity of root orders in slow and fast growing citrus rootstocks supplied with different nitrate levels". *Ann Bot* 100: 1287-1296.
- (3) Zobel R.W. 2005. "Genetic and environmental aspects of roots and seedling stress". *HortScience* 30: 1189-1192.
- (4) González-Real M.M., Baille A., Liu H.Q. 2008. "Influence of fruit load on dry matter and N-distribution in sweet pepper plants". *Sci Hort* 117: 307-315.
- (5) Azofeifa A., Moreira M.A. 2004. "Análisis del crecimiento del chile jalapeño (*Capsicum annum* L. cv Hot), en Alajuela, Costa Rica". *Agron Costarricense* 28: 57-67.
- (6) Grazia J., Tottoni P., Chiesa A. 2002. "Pepper (*Capsicum annum* L.) transplant growth as affected by growing medium compression and cell size". *Agronomie* 22: 503-509.
- (7) Estrada-Luna A.A., Davies F.T.J., Egilla J.N. 2001. "Physiological changes and growth of micropropagated chile ancho pepper plantlets during acclimatization and post-acclimatation". *Plant Cell and Org Cult* 66: 17-24.

- (8) Steer B.T., Pearson C.J. 1976. "Photosynthate translocation in *Capsicum annum*". *Planta* 128: 155-162.
- (9) Medina-Lara F., Echevarría-Machado I., Pacheco-Arjona R., Ruiz-Lau N., Guzmán-Antonio A., Martínez-Estévez M. 2008. "Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 43: 1549-1554.
- (10) Marcelis L.F.M., Heuvelink E., Baan Hofman-Eijer L.R., Den Bakker J., Xue L.B. 2004. "Flower and fruit abortion in sweet pepper in relation to source and sink strength". *J Exp Bot* 55: 2261-2268.
- (11) Bakker J.C. 1989. "The effects of temperature on flowering, fruit set and fruit development of glasshouse sweet pepper (*Capsicum annum* L.)". *J Hort Sci* 64: 313-320.
- (12) Tun-Dzul J.C. 2001. Chile Habanero: características y tecnología de producción. Centro de Investigaciones Regionales del Sureste. Mochochá, Yucatán. 5-14.
- (13) González-Real M.M., Baille A., Liu H.Q. 2008. "Influence of fruit load on dry matter and N-distribution in sweet pepper plants". *Sci Hort* 117: 307-315.
- (14) Khan A.A., Sagar G.R. 1969. "Changing patterns of distribution of the products of photosynthesis in the tomato plant with respect to time and to the age of the leaf". *Ann Bot* 33: 763-769.
- (15) Leskovar D.I., Stoffella P.J. 1995. "Vegetable seedling root system: morphology, development, and importance". *HortScience* 30: 1153-1159.
- (16) Jones D.L., Darrah P.R. 1994. "Amino-acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere". *Plant Soil* 163: 1-12.
- (17) Ryser P. 1998. "Intra- and interspecific variation in root length, root turnover and the underlying parameters". In: Lambers H., Pooter H., Van Vuuren M.M.I., eds. *Inherent variation in plant growth: physiological mechanisms and ecological consequences*. Leiden: Backhuys Publishers, 441-465.
- (18) Rieger M., Litvin P. 1999. "Root system hydraulic conductivity in species with contrasting root anatomy". *J Exp Bot*. 50: 201-209.
- (19) Brekle A.W. 1991. "Growth under stress: Heavy metals", pp. 351-374. In: Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi (eds.) *Plant roots: The hidden half*. Marcel Dekker, New York.
- (20) Snapp S.S., Shennan C. 1992. "Effects of salinity on roots growth and death dynamics of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)". *New Phytol* 121: 71-79.
- (21) Peterson C.A., Enstone D.E. 1996. "Functions of passage cells in the endodermis and exodermis of roots". *Physiol. Plant* 97: 592-598.
- (22) Lazof D.B., Ruffy T.W., Redinbaugh M.G. 1992. "Localization of nitrate absorption and translocation within morphological regions of the corn root". *Plant Physiol* 100: 1251-1258.
- (23) Hirel B., Gouis J.L., Ney B., Gallais A. 2007. "The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches". *J Exp Bot* 58: 2369-2387.





Regulación celular en respuesta a ambientes fluctuantes de nitrógeno en el suelo: chile habanero como modelo de estudio

Capítulo 10

Ileana Echevarría-Machado,* Mildred Carrillo-Pech,
Teresita de Jesús Celis-Arámburo, Gladys Santiago-Antonio,
Ángel Virgilio Domínguez-May, Ernesto Palacios-Medel,
Ricardo Cuxim-Huchim, Marta Lizama-Gasca, Ernesto Adolfo Herrera-Chi,
Wendy Janet Tzec-Madero, Selene del Jesús Qui Naal,
Kenny Murillo Esquivel, Angélica Anais Serralta Interián,
Fátima Medina-Lara, Manuel Martínez-Estévez
*Autor responsable: ileana@cicy.mx



Resumen

El conocimiento de los mecanismos que le permiten a la planta modular su fisiología, desarrollo y crecimiento de acuerdo con la percepción de la fuente de nutriente en el suelo, puede tener consecuencias importantes, por ejemplo en el diseño de nuevos cultivos con una producción de biomasa sostenida y mejorar la adquisición de nutrientes en sistemas agrícolas pobres en nutrimentos. Debido a que el nitrógeno (N) es el elemento que se requiere en mayores cantidades y, por lo tanto, el que más limita los rendimientos agrícolas, se plantea que éste, junto con el fósforo, juega un papel central en la integración de la respuesta de las raíces a los cambios nutrimentales que se presentan en el suelo. En nuestro estudio, el sistema radicular de chile habanero ha presentado algunas respuestas a diferentes fuentes de N que son similares, aunque con sensibilidades diferenciales a las presentadas en *Arabidopsis thaliana* o en cereales, pero otras han sido particulares para esta especie, por lo que nosotros proponemos el chile habanero como un modelo para elucidar los mecanismos por los cuales las raíces responden a ambientes fluctuantes de N.

Palabras clave

Aminoácidos, chile habanero, nitrato, nitrógeno, sistema radical

Introducción

Desigual a los animales, todas las estructuras que comprenden el cuerpo de una planta son adicionadas postembriogénicamente. Cada planta puede integrar la información que recibe del ambiente y desencadenar una respuesta que conduzca a la

formación de nuevas raíces y brotes. Debido a su falta de movilidad, esta estrategia de desarrollo dinámica le proporciona a la planta una clara ventaja, permitiéndole capturar los recursos edáficos que se encuentren disponible en sus alrededores y de los cuales es totalmente dependiente.

La disponibilidad espacial y temporal de los nutrientes en el suelo, particularmente del N, es altamente heterogénea. Por ejemplo, la concentración de nitrato puede variar en un orden de magnitud entre centímetros de distancia o en el curso de un día.^(1,2,3) Esta situación hace que la planta y particularmente la raíz, por ser el órgano directamente expuesto, tengan que ser capaces de percibir estos cambios y de responder adecuadamente a ellos.

Se sugiere que el N puede tener un papel significativo en la integración de la respuesta de las raíces a estos gradientes nutrimentales en el suelo. Esta sugerencia se sustenta en el hecho de que el N es un elemento que se requiere en grandes cantidades por las plantas, llegando a representar hasta 1.5% de la materia seca de las mismas. Debido a estos requerimientos, el N es el elemento mineral que más limita la productividad de los cultivos.

La respuesta radical al N es diversa y depende de varios factores, entre los que se encuentran: la fuente de N (inorgánica y orgánica), la dosis, la especie, la edad de la planta, el estado nutricional interno de ésta, así como el tipo de exposición al nutrimento (el sistema radical completo o una parte del mismo), entre otros.

El nitrato es la forma inorgánica de N más abundante en los suelos aeróbicos, siendo ésta la más utilizada por la mayoría de los cultivos de importancia agrícolas. Este elemento provoca cambios importantes en el desarrollo radical de las plantas; básicamente, estos cambios han sido descritos sobre las raíces laterales, pero la raíz primaria parece ser menos sensible a nitrato. Cuando se aplica de forma heterogénea, ocurre una proliferación del sistema radical en las zonas de las raíces expuestas al mismo y una inhibición en el segmento sometido a un déficit.^(4,5,6,7,8,9,10,11,12)

La proliferación radical, en respuesta a nitrato, puede deberse a un mayor número y/o elongación de las raíces laterales (RL), lo cual es variable dependiendo de la especie. Por ejemplo, en cereales parecen suceder ambos fenómenos,^(4,5,6,7,8) mientras que en *Arabidopsis* los resultados son discrepantes, reportándose en algunos experimentos una estimulación en la elongación, pero no en el número de RL en el segmento enriquecido con nitrato^(10,11) y en otros, una estimulación en ambos procesos.⁽¹²⁾

Por otro lado, recientemente se reportó que el aminoácido glutamato, el cual es una fuente de N orgánica, también es capaz de provocar efectos drásticos y específicos sobre el sistema radicular.^(13,14) El L-glutamato inhibió fuertemente el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*.⁽¹⁴⁾ Este aminoácido es uno de los más abundantes en la materia orgánica en descomposición⁽¹⁵⁾ y aunque sus niveles en el suelo se encuentran por debajo de los 10 μM , éstos se incrementan hasta alcanzar el orden de los milimolares en los alrededores de esta materia orgánica, pues los tejidos animales y vegetales contienen este aminoácido en forma libre en ese orden de magnitud.^(14,16)

Entonces, estos resultados indican que las raíces de las plantas pueden diferenciar entre diferentes fuentes de N en el suelo y responder de manera particular a cada una. Las estrategias que poseen las raíces para responder a los nutrimentos presentes en el suelo cobran un extraordinario valor en aquellos suelos que son pobres en nutrimentos, como los de los trópicos.

Particularmente, más de 90% de los suelos de la Península de Yucatán son del tipo litosoles y rendzinas,⁽¹⁷⁾ los cuales se caracterizan por ser arcillosos, con una profundidad entre 0 y 30 cm, con alta pedregosidad, un pH por lo general que tiende a ser alcalino, ricos en materia orgánica y extremadamente pobres en N.^(17,18) A pesar de estas características adversas para el desarrollo, estos suelos confieren propiedades a las especies que se cultivan en ellos, que las hacen únicas en el mundo, tal es el caso del chile habanero de Yucatán, radicando su exclusividad en características como su sabor, aroma y especialmente su picor.

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) pertenece a la familia de las Solanaceas y ocupa el segundo lugar, después del tomate, en importancia económica para los productores de hortaliza del estado. La demanda actual por este chile en los mercados nacionales e internacionales es alta y se prevé que siga en aumento. Sin embargo, los rendimientos son bajos, ocasionado por las características adversas de estos suelos, entre otros factores ambientales. Por ello, el mejoramiento de la especie y el diseño de estrategias de cultivo amigables con el medio ambiente son imperantes para incrementar la productividad del chile en estos suelos.

Resultados

Respuesta de chile habanero a tratamientos de nitrato

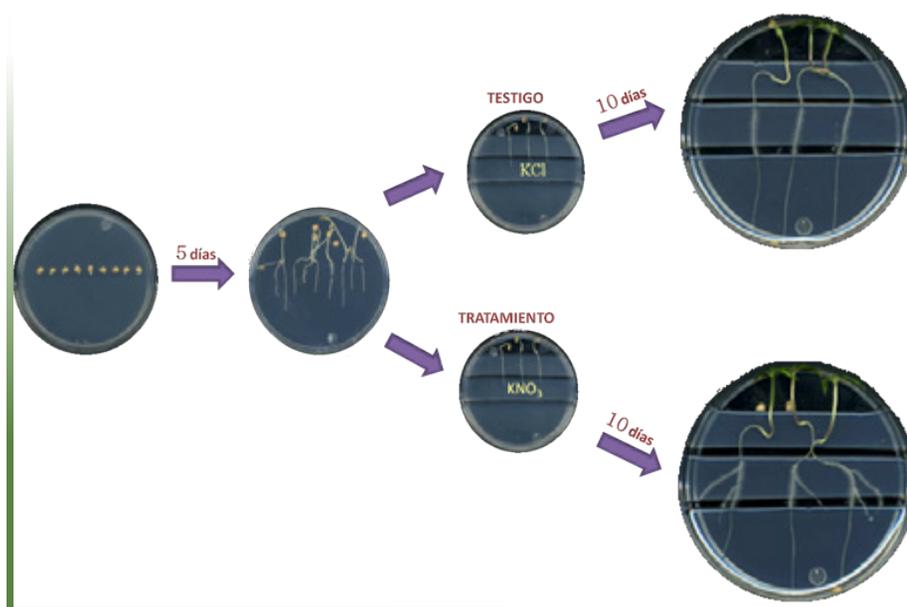
El estudio del desarrollo de raíces en respuesta a factores ambientales es complejo, debido a que este órgano crece subterráneamente en la mayoría de las plantas, lo cual dificulta las evaluaciones de crecimiento. Además, el daño mecánico producido durante la extracción de las raíces, sumado a la coextracción con microorganismos y partículas de suelo adheridas a las mismas, dificultan la interpretación a nivel bioquímico y molecular de los eventos específicos que ocurren en respuesta a estos factores. Por ello fue necesario generar modelos en el laboratorio que simularan las condiciones heterogéneas en las que las raíces se encuentran expuestas a los nutrimentos en el suelo y que permitieran realizar las eva-

luaciones necesarias para entender estos eventos en chile habanero.

Se adecuó un modelo *in vitro* reportado previamente para *Arabidopsis*,⁽¹⁰⁾ en el cual el nitrato se aplicó heterogéneamente a lo largo de la RP (Figura 1). Las plántulas de chile habanero se cultivaron en condiciones asépticas, a partir de semillas previamente esterilizadas y germinadas en cajas de petri estériles. Cuando la RP alcanzó aproximadamente 2 cm de longitud, las plántulas fueron transferidas a las cajas de agar segmentadas, en las cuales solo el segmento medio de la RP estuvo en contacto con 1 mM de KNO_3 (tratamiento) o KCl (testigo) y el resto de la raíz fue sometida a concentraciones de 0.01 mM de NH_4NO_3 , las cuales fueron las basales que contenía el medio -NI para el crecimiento de las plántulas.⁽¹⁹⁾

Figura 1

Establecimiento de un modelo *in vitro* para evaluar el efecto de condiciones heterogéneas de nitrato sobre el crecimiento radicular de chile habanero



Las semillas de chile habanero se esterilizaron y se colocaron en cajas de petri con papel de filtro humedecido, hasta que germinaron. Para el crecimiento de las plántulas, éstas fueron colocadas en posición vertical en cajas de petri con el medio -NI⁽¹⁹⁾ hasta que la raíz primaria alcanzó los 2 cm (aproximadamente cinco días). Las plántulas fueron transferidas a las cajas de agar segmentadas, donde el nutrimento fue colocado en el segmento medio de la caja, de tal manera que el ápice radicular (aproximadamente 2 mm) estuviera en contacto con dicha concentración. La concentración de nitrato fue de 0.01 mM - 1 mM - 0.01 mM para los segmentos superior - medio - inferior, respectivamente. En el tratamiento testigo, el KNO₃ en el segmento medio fue sustituido por KCl (ver descripción más detallada en^(19y20)).

En este modelo se observó que el nitrato incrementó localmente el número y la longitud de las RL e inhibió la formación de las mismas en el segmento inferior donde no se encuentra el nutrimento (Figura 1). Así mismo, y a diferencia de lo que se ha reportado en *Arabidopsis*, la RP de chile habanero fue altamente sensible al nitrato, inhibiéndose en una ventana de tiempo muy estrecha después de la exposición al mismo y a dosis tan bajas como 100 mM. Este efecto no fue observado cuando la plántula fue expuesta a amonio, por lo que es probable que en este mecanismo intervengan eventos de señalización en respuesta a nitrato como molécula señal

y no al metabolismo del mismo. Una observación importante ha sido el hecho que diferentes variedades de chile habanero presentaron una sensibilidad diferencial a este nutrimento, siendo la inhibición de la RP y la proliferación local de RL, efectos generales y particulares dentro de la especie, respectivamente.

Se sabe que las fitohormonas y en particular las auxinas tienen un papel importante en la formación de raíces laterales, es por ello que usando el modelo de cajas de agar segmentada se han llevado a cabo estudios para conocer cómo la aplicación de fitohormonas modula el efecto del nitrato sobre el

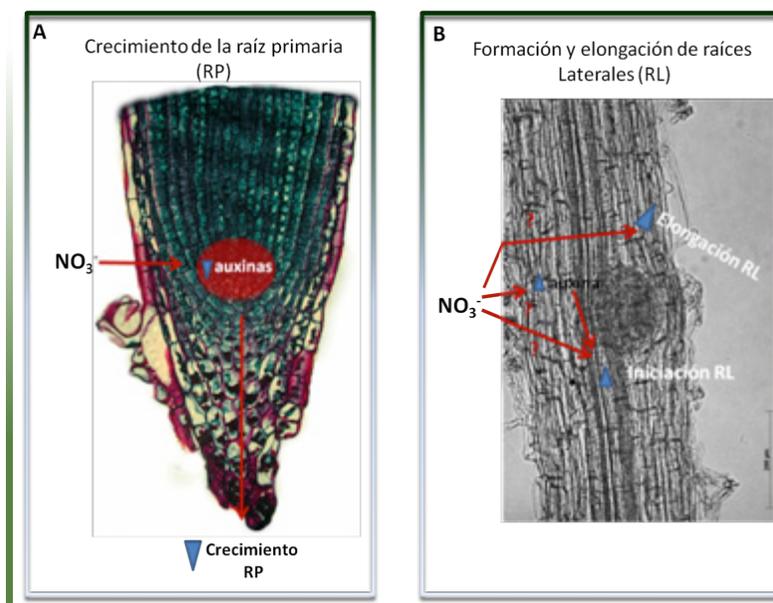
crecimiento radicular de chile habanero.⁽¹⁹⁾ Se aplicó ácido indolacético (AIA) más/menos nitrato, al segmento medio de las cajas segmentadas y se observó que la aplicación de la hormona revirtió la inhibición que ejercía el nitrato sobre la RP. A partir de estos resultados se propone un modelo en que el arresto del crecimiento de la RP podría ser debido a una reducción transitoria en los niveles de auxina en el ápice radicular por la exposición a nitrato (Figura 2 A).

Por otro lado, el efecto del nitrato sobre el desarrollo de las RL parece ser un fenómeno más complejo. Cuando se aplicó el AIA al segmento medio, éste estimuló la formación y elongación de las RL a niveles semejantes a los que se observaron con nitrato y al aplicar ambos compuestos de manera conjunta no

se observó un incremento adicional en estos parámetros.⁽¹⁹⁾ Estos resultados sugieren que el nitrato podría inducir una acumulación de auxina localmente en las células formadoras de RL del periciclo, estimulándose la formación de los primordios de las RL (Figura 2 B). Sin embargo, si esto ocurriera, debe de existir una concentración umbral de la auxina para desencadenar el proceso en chile habanero que al sobrepasarse no se logra obtener una mayor inducción en la formación de RL, lo cual explica por qué el nitrato no indujo un efecto mayor cuando se aplicó en conjunto con la auxina. No obstante, no se puede descartar que el nitrato pueda inducir la proliferación radicular en chile habanero por una ruta diferente a la controlada por auxina (Figura 2 B).

Figura 2

Modelos propuestos para explicar el efecto de condiciones heterogéneas de nitrato sobre el sistema radicular de chile habanero



A) Efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz primaria (RP). B) Efecto estimulador localizado sobre la formación y elongación de las raíces laterales (RL). El modelo se describe en el texto. La imagen en A es una fotografía tomada al microscopio óptico de un corte longitudinal del ápice radicular de chile habanero. La imagen en B es una fotografía tomada al microscopio óptico de la zona de diferenciación de la raíz primaria de chile habanero sometida a un proceso de clareado, donde se observa la formación de un primordio de RL.

También, se han conducido experimentos en condiciones de hidroponía (Figura 3A) para estudiar la susceptibilidad de diferentes especies de chile habanero a tratamientos de déficit de N. Se ha observado una alta variabilidad dentro de la especie, encontrando variedades que presentaron un mayor desarrollo del sistema radical ante estas condiciones y que fueron menos susceptibles a períodos de déficit de este nutrimento (Figura 3B). Actualmente, se evalúa la capacidad de almacenamiento y removilización de N de

estas variedades con el objetivo de conocer los mecanismos involucrados en un uso más eficiente de este elemento.

Esta variabilidad también se ha hecho presente cuando aplicamos el nutrimento de forma heterogénea.⁽¹⁹⁾ Se ha comprobado que algunos mecanismos bioquímicos, como la regulación postraducciona de proteínas por fosforilación, pueden mediar en la respuesta de la raíz de chile habanero a nitrato.⁽²¹⁾

Figura 3

Comportamiento de diferentes variedades de chile habanero ante un déficit de nitrógeno



A). Condiciones de crecimiento en hidroponía. Plántulas de 30 a 45 días de germinadas creciendo en condiciones de hidroponía son sometidas a tratamientos de ausencia de nitrógeno durante diferentes días. B) Se muestran imágenes representativas de tres plántulas que pertenecen a variedades de chile habanero diferentes, las cuales fueron sometidas a un déficit de nitrógeno por seis días. Nótese las diferencias en el crecimiento del sistema radicular ante esta condición de estrés.

Respuesta del sistema radicular de chile habanero a los aminoácidos, una fuente orgánica de N

Las condiciones de suelo y de cultivo de chile habanero en Yucatán aseguran que su sistema radicular está expuesto a una alta concentración de materia orgánica, donde los aminoácidos representan la mayor frac-

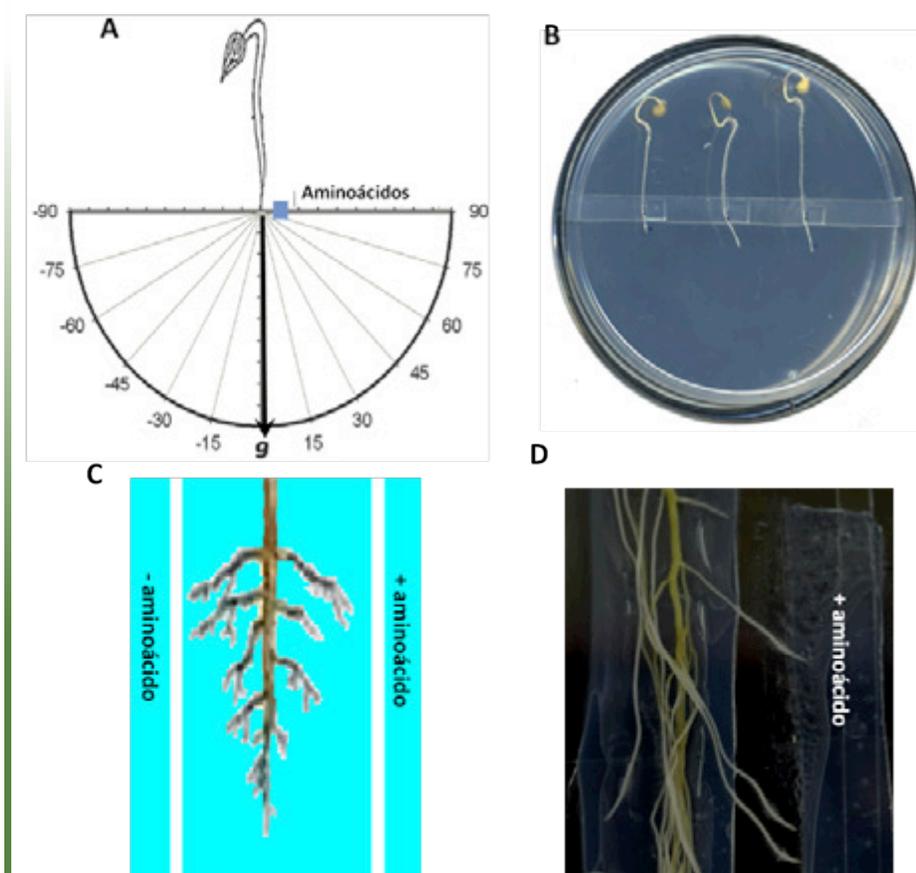
ción del N orgánico de bajo peso molecular disuelto en el suelo.⁽¹⁶⁾ Además de evaluar el efecto de la exposición de las raíces a los aminoácidos colocados en el medio, en el laboratorio se están desarrollando experimentos pioneros en los cuales se evalúan si los aminoácidos podrían ejercer un efecto quimioatractivo sobre las raíces de chile

habanero. Este efecto se ha estudiado sobre la RP y sobre las RL, diseñando modelos *in vitro* para cada caso (Figura 4).

Para la RP se utilizaron plántulas cuya raíz media aproximadamente 2 cm y el ápice radicular fue expuesto a un parche aislado que contenía el aminoácido a evaluar, el cual está separado de ésta aproximadamente 3 mm. Debido a que el parche (bloque de agar) se coloca encima de una

tira de acetato, el aminoácido no se difunde en el medio (Figura 4 A y B). Para las RL, las plántulas de aproximadamente 30 días después de germinadas se colocan sobre un bloque de agar central, rodeado por dos bloques, donde solo uno de ellos contiene el aminoácido a ensayar (Figura 4 C y D). Ambos modelos se desarrollan en condiciones asépticas y se evalúa la redirección del crecimiento de estas raíces en respuesta al estímulo.

Figura 4
Modelos diseñados para estudiar el efecto quimiotrópico de los aminoácidos sobre las raíces de chile habanero



A) y B) Efecto quimiotrópico de los aminoácidos sobre la raíz primaria. C) y D) Efecto quimiotrópico de los aminoácidos sobre las raíces laterales. Las imágenes en A) y C) son los esquemas de los modelos propuestos, mientras que las de B) y D) son plántulas de chile habanero expuestas a estas condiciones. Los modelos se describen en el texto.

Los resultados que se han obtenido a partir de estos estudios indican que las raíces de chile habanero pueden percibir algunos aminoácidos, redirigiendo su crecimiento hacia esta fuente de N orgánica. Esta respuesta parece estar mediada por eventos de señalización que podrían involucrar receptores de aminoácidos, particularmente los de glutamato.^(22,23)

También se han observado cambios importantes en la morfología y anatomía de la raíz cuando es expuesta a los aminoácidos,

Discusión

Como organismos sésiles, las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados que le permiten modificar su fenotipo en respuesta a cambios ambientales en las cuales ellas se desarrollan. La raíz es una de las estructuras que presenta mayor plasticidad y esta respuesta es de vital importancia para la vida de la planta, en particular cuando se cultiva en suelos con muy poca concentración de nutrimentos.

Se ha observado que existen algunos nutrientes que pueden actuar como señales que atraen a las raíces hacia los parches ricos en nutrimentos; sin embargo, no todos los nutrimentos presentan esta función ni todas las especies vegetales responden de igual manera a ello. También, los mecanismos responsables de estos cambios son enormemente desconocidos. Tener información de cómo ocurren estos mecanismos en una especie de importancia económica, que además crece en suelos pobres en nutrimentos y altamente pedregosos, resulta de un enorme interés y permitirá brindar mayor información de la posible conservación y/o especificidad de estos mecanismos en las plantas superiores. Nuestro modelo de estudio, *Capsicum*

siendo estas modificaciones específicas para determinados aminoácidos. Estos cambios pueden repercutir en los procesos de absorción de nutrientes y agua a partir del suelo. Actualmente, se están estudiando cuáles son los mecanismos que participan en dichas respuestas, que de manera significativamente se dan diferente en chile habanero, comparándolo con las plantas modelos.

chinense Jacq., presenta respuestas novedosas a la presencia exógena de N a nivel de crecimiento radical.

La RP de chile habanero es altamente sensible a la concentración exógena de nitrato. Tal efecto no ha sido reportado para otras especies vegetales. Particularmente, en *Arabidopsis*, algunos autores han observado una inhibición al aplicar altas concentraciones de este nutrimento (50 mM) de manera homogénea;⁽²⁴⁾ mientras que otros no han logrado observar este efecto en esta misma especie.⁽¹⁰⁾

Al exponer la raíz de chile habanero a condiciones heterogéneas de nitrato, tanto el número como la elongación de las RL se estimula, tal como se ha descrito para cereales^(7,8) y en algunos casos para *Arabidopsis*,⁽¹²⁾ aunque en otro trabajo solo se reporta una estimulación en la elongación y no en el número de las RL para esta especie.⁽¹⁰⁾

El papel de las fitohormonas, principalmente auxinas⁽²⁵⁾ y citocininas,⁽²⁶⁾ así como de otros componentes tales como los transportadores de nitrato,^(25,27) factores de transcripción⁽²⁸⁾ y proteínas cinasas⁽²⁹⁾

en la respuesta radicular a nitrato ha sido descrito en otras especies, particularmente en la planta modelo *Arabidopsis*. Sin embargo, chile habanero presenta respuestas particulares, resultando un modelo para estudiar los mecanismos involucrados en esta respuesta.

Hasta el momento se tienen avances importantes en la caracterización molecular de dicha respuesta, donde se ha detectado que el nitrato induce la expresión específica de determinados genes en el ápice radicular de chile habanero,⁽²⁰⁾ los cuales se encuentran actualmente en fase de caracterización para conocer su función en este proceso. También, se ha aislado y caracterizado parcialmente un ADNc que tiene similitud con un transportador de nitrato de alta afinidad de otras especies. Esta secuencia es la primera que se reporta para el género *Capsicum* y sería interesante conocer si este transportador pudiera funcionar como un transceptor en chile habanero, tal como se ha propuesto para este tipo de proteínas en *Arabidopsis*.⁽²⁸⁾

Por otro lado, se ha reconocido por mucho tiempo que los aminoácidos, particularmente el glutamato, pueden ser moléculas señales importantes en los animales, y el descubrimiento de que receptores de estos compuestos parecidos a los de mamíferos también están presentes en el genoma de las plantas⁽³⁰⁾ abre la posibilidad de que estos compuestos tengan una función similar a su contraparte de animales.

La concentración de los aminoácidos en el suelo pueden alcanzar los niveles milimolares en los alrededores de la materia orgánica, por lo que éstos pudieran estar señalizando para las raíces parches ricos en nutrimentos. A pesar de esta posible importancia y de lo que ellos pudieran estar aportando para la nutrición vegetal, existen escasos estudios de interacciones regulatorias entre los aminoácidos y el desarrollo de raíces.^(13,14)

La raíz de chile habanero presentó una respuesta quimiotrópica positiva novedosa, no reportada anteriormente para plantas, hacia parches ricos en determinados aminoácidos. También, se observaron cambios morfológicos importantes en el ápice radicular, los cuales pudieran contribuir a que las raíces aumentaran el proceso de absorción de agua y nutrimentos. De esta manera, pudieran ser más eficientes en la captura de éstos, en condiciones limitantes de los mismos.

Es necesario señalar que la raíz de chile habanero respondió diferencialmente a nitrato, que a los aminoácidos. Esto significa que ella fue capaz de diferenciar entre ambas fuentes de N. El significado ecológico de este comportamiento aún no está esclarecido, pero podría estar relacionado con la distinción entre la poza de nitrato que es transiente en el suelo y la naturaleza de mayor duración de una fuente orgánica de N (como una hoja en el suelo, cadáver de animales, etcétera).

Conclusiones

El sistema radicular de chile habanero puede percibir y responder a la presencia exógena de N. Esta respuesta depende de la fuente de N, la concentración y la forma en la que se aplica la misma, así como la variedad. Se detectaron cambios en el sistema radicular de chile en respuesta a N, los cuales no han sido reportados para otras especies. Por esta razón chile habanero puede ser un modelo para estudiar los mecanismos que poseen las plantas para responder a ambientes fluctuantes

de N en el suelo. Si se logran desenredar los mecanismos por los cuales las raíces perciben eficientemente el N en el suelo, que es el elemento requerido en mayor concentración y más limitante para la productividad de los cultivos, y logran redirigir su crecimiento en respuesta a ello, entonces estaremos en disposición en un futuro de contribuir al mejoramiento de la especie para incrementar la productividad en estos suelos.

Agradecimientos

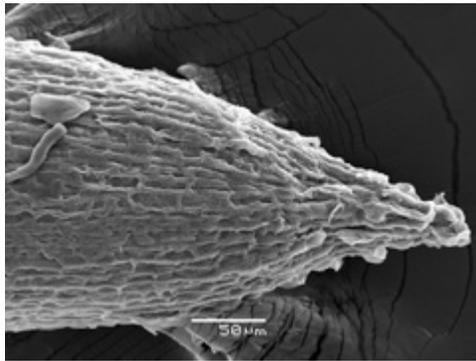
La presente investigación ha estado apoyada por Conacyt (Proyecto Núm. 60258).

Referencias bibliográficas

- (1) Bloom A.J., Frensch J., Taylor A.R. 2006. "Influence of inorganic nitrogen and pH on the elongation of maize seminal roots". *Ann Bot-London* 97: 867-873.
- (2) Owen A.G., Jones D.L. 2001. "Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition". *Soil Biol Biochem* 33: 651-657.
- (3) Miller A.J., Cramer M.D. 2004. "Root nitrogen acquisition and assimilation". *Plant and Soil* 274: 1-36.
- (4) Hackett C. 1972. "A method of applying nutrients locally to roots under controlled conditions, and some morphological effects of locally applied nitrate on the branching of wheat roots". *Aust J Biol Sci* 24: 1169-1180.
- (5) Drew M.C., Saker L.R., Ashley T.W. 1973. "Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley I. The effect of nitrate concentration on the growth of axes and laterals". *J of Exp Bot* 24: 1189-1202.
- (6) Drew M.C. 1975. "Comparison of the effects of a localized supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley". *New Phytologist* 75: 479-490.
- (7) Drew M.C., Saker L.R. 1975. "Nutrient supply and the growth of the seminal root system in barley. II. Localized, compensatory increases in lateral root growth and rates of nitrate uptake when nitrate supply is restricted to only part of the root system". *J Exp Bot* 26: 79-90.

- (8) Granato T.C., Raper C.D. 1989. "Proliferation of maize (*Zea mays* L.) roots in response to localized supply of nitrate". *J Exp Bot* 40: 263-275.
- (9) Scheible W.R., Lauerer M., Schulze E.D., Caboche M., Stitt M. 1997. "Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco". *Plant J* 11: 671-691.
- (10) Zhang H., Forde B.G. 1998. "An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture". *Science* 279: 407-409.
- (11) Zhang H., Jennings A., Barlow P., Forde B. 1999. "Dual pathways for regulation of root branching by nitrate". *P Natl Acad Sci USA* 96: 6529-6534.
- (12) Linkohr B.I., Williamson L.C., Fitter A.H., Leyser O. 2002. "Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*". *Plant J* 29: 751-760.
- (13) Filleur S., Walch Liu P., Gan Y. and Forde B.G. 2005. "Nitrate and glutamate sensing by plant roots". *Biochemical Society* 33: 283-286.
- (14) Walch-Liu P., Liu L.H., Remans T., Tester M., Forde B.G. 2006. "Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Cell Physiol* 47: 1045-1057.
- (15) Lipson D., Näsholm T. 2001. "The unexpected versatility of plants: Organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems". *Oecologia* 128: 305-316.
- (16) Jones D.L., Shannon D., Junvee-Fortune T., Farrar J.F. 2005. "Plant capture of free amino acids is maximized under high soil amino acid concentrations". *Soil Biology & Biochemistry* 37: 179-181.
- (17) Ramírez-Jaramillo G., Góngora S., Pérez L., Chel L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J., López H. 2005. Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán. INIFAP-Sagarpa, Campo Agrícola Experimental, Mocochoá, Yucatán, México.
- (18) Bautista F., Palacio A.G. 2005. *Caracterización y manejo de los suelos de la Península de Yucatán. Implicaciones agropecuarias, forestales y ambientales*. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma de Yucatán, Instituto Nacional de Ecología. 282 pp. ISBN: 968-5722-13-7.
- (19) Celis-Arámburo T.J., Carrillo-Pech M., Castro-Concha L., Miranda-Ham L.M., Martínez-Estévez M., Echevarría-Machado I. 2011. "Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq.". *Plant Physiol Biochem* 49: 1456-1464
- (20) Celis-Arámburo T.J. 2011. Efecto de la distribución heterogénea de nitrato sobre el sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- (21) Cuxim-Huchim R.J. 2010. Caracterización bioquímica del efecto del nitrato sobre el sistema radicular de *Capsicum*. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán. Yucatán, México.
- (22) Palacios-Medel E. 2009. Efecto quimiotrópico del glutamato en la raíz de chile habanero. Tesis de licenciatura. Instituto tecnológico de Mérida, Mérida, Yucatán, México.

- ⁽²³⁾ Palacios-Medel E. 2011. Caracterización del efecto quimiotrópico del glutamato en raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- ⁽²⁴⁾ Signora L., De Smet I., Foyer C.H., Zhang H. 2001. "ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*". *Plant J* 28: 1-9.
- ⁽²⁵⁾ Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A. 2010. "Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants". *Dev Cell* 18: 927-937.
- ⁽²⁶⁾ Laplaze L., Benková E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., Weijers D., Calvo V., Parizot B., Herrera-Rodriguez M., Offringa R., Graham N., Doumas P., Friml J., Bogusz D., Beeckman T., Bennett M. 2007. "Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation". *Plant Cell* 19: 3889-3900.
- ⁽²⁷⁾ Yendrek C.R., Lee Y.C., Morris V., Liang Y., Pislariu C.I., Burkart G., Meckfessel M.H., Salehin M., Kessler H., Wessler H., Lloyd M., Lutton H., Teillet A., Sherrier D.J., Journet E.P., Harris J.M., Dickstein R. 2010. "A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*". *Plant J* 62: 100-112.
- ⁽²⁸⁾ Remans T., Nacry P., Pervent M., Filleur S., Diatloff E., Mounier E., Tillard P., Forde B.G., Gojon A. 2006. "The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches". *P Natl Acad Sci USA* 103: 19206-19211.
- ⁽²⁹⁾ Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C., Tsay Y.F. 2009. "CHL1 functions as a nitrate sensor in plants". *Cell* 138: 1184-1194.
- ⁽³⁰⁾ Lam H., Hsieh M., Coruzzi G. 1998. "Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in *Arabidopsis thaliana*". *Plant J* 16: 345-353.





Absorción de potasio en raíces de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y su relación con cloruro de cesio y tetraetilamonio**

Capítulo 11

José Ramón Pacheco-Arjona, Nancy Ruiz-Lau, Fátima Medina-Lara, Yereni Minero-García, César de los Santos Briones, Ileana Echevarría-Machado, Manuel Martínez-Estévez*
*Autor responsable: luismanh@cicy.mx

** Este capítulo es parte de la tesis de Maestría de José Ramón Pacheco Arjona y del artículo: Pacheco-Arjona *et al.* (2011) *Afr. J. Biotechnol.* 10(62):13418-13429



Resumen

El potasio (K^+) es esencial para el crecimiento de las plantas y para la producción de los cultivos. Los sistemas de transporte de K^+ incluyen canales de K^+ , diversos tipos de canales catiónicos no selectivos, permeables a K^+ y transportadores de las familias KUP/HAK/KT, TRK/HKT y K^+/H^+ . Los transportadores KUP/HAK/KT juegan un papel importante y fundamental en la homeostasis de K^+ en las células vegetales. Para comprobar esto se evaluó la absorción total de K^+ de las raíces de las plantas de chile habanero sometidas a déficit de K^+ . Como resultado de esta investigación se observó que plantas en ausencia de K^+ por 72, 96 y 120 h y posteriormente resuplementadas en un medio que contiene K^+ a bajas concentraciones, logran disminuir la cantidad de potasio en el medio a diferentes velocidades. Plantas en ausencia de K^+ por 72 h y resuplementadas con K^+ y bloqueadores de canales de K^+ (CsCl y TEA) absorben menos K^+ que aquellas que no fueron expuestas a los bloqueadores.

Palabras clave

Potasio, transporte de alta afinidad, canales, cesio

Introducción

El potasio (K^+) es el segundo nutriente mineral más abundante en las plantas; es esencial para el crecimiento de éstas y en consecuencia para la producción de los cultivos. Aunque las concentraciones de K^+ en la solución del suelo no son muy elevadas (entre 0.1 a 6 mM, dependiendo del tipo de suelo), las plantas son capaces de acumular grandes cantidades, generalmente entre 2 y 10% del peso seco de la

planta.⁽¹⁾ Dentro de la planta, el ion potasio (K^+) desempeña funciones cruciales en la elongación celular, movimiento de las hojas, tropismo, homeostasis metabólica, germinación, osmorregulación, apertura y cierre de los estomas y está relacionado en numerosos procesos bioquímicos. El K^+ está presente en todos los compartimentos de las células vegetales y se presenta en dos grandes pozas, la vacuola y el citosol. La función del K^+ en la activación enzimática y biosíntesis de proteínas se basa en la concentración alta y estable dentro del citoplasma. Por lo tanto, la homeostasis de K^+ citoplásmico es esencial para los procesos metabólicos por lo que hay un control estricto de la concentración citoplásmica de K^+ que es aproximadamente de 100 mM.^(2,3) Dos de los principales mecanismos de control están implicados en el mantenimiento de la homeostasis: el control del flujo de K^+ a través de la membrana plasmática y la movilización de las reservas de K^+ vacuolar.⁽⁴⁾ Para entender cómo las necesidades de K^+ son sufragadas por las plantas y la forma de mantener la homeostasis de éste dentro de la planta es necesario entender plenamente la absorción del K^+ en la planta y su transporte interno.

A lo largo de millones de años, las plantas han desarrollado una sofisticada red de sistemas de transporte para K^+ . Éstos incluyen los canales de K^+ tipo Shaker; diversos tipos de canales catiónicos no selectivos permeables a K^+ , transportadores de las familias KUP/HAK/KT, HKT y K^+/H^+ , y otros transportadores menos estudiados como los KEA y los transportadores CHX.⁽⁵⁾ Junto con los canales de K^+ tipo "Shaker", los transportadores KUP/HAK/KT juegan un papel importante y fundamental en la homeostasis de K^+ en las células vegetales, incluyendo una función en la absorción tanto de alta como de baja afinidad de K^+ .⁽⁶⁾ Existen evidencias que indican que estos transportadores se encuentran en toda la planta⁽⁷⁾ y con una función tanto en la membrana plasmática como en el tonoplasto.⁽⁸⁾ La evidencia experimental para proponer funciones de transporte de K^+ de muchos de los transportadores KUP/HAK/KT está aún bajo investigación. Existen muy pocos reportes de que genes de *Arabidopsis* que codifican canales y transportadores de K^+ sean regulados directamente por la concentración de K^+ externo, a pesar de que muchos de estos genes han demostrado que son inducidos o reprimidos por estrés y hormonas.⁽⁹⁾ Se sabe muy poco sobre la forma en que se regulan y coordinan los sistemas de transporte y el suministro disponible de K^+ en las plantas. Se sabe que la deficiencia de K^+ resulta de cambios cuantitativos, como cualitativos en los mecanismos de absorción de K^+ .⁽¹⁰⁾ Esta activación ha sido tradicionalmente asociada con la inducción de la expresión de transportadores de alta afinidad, tradicionalmente considerados como los principales mecanismos de adaptación a la inanición de potasio.⁽¹¹⁾

A partir del conocimiento de los efectos de ausencia y resuplementación de K^+ sobre la absorción de éste en la planta y el estudio de los niveles de expresión de los transcritos pertenecientes a uno de los principales transportadores relacionados con la absorción de potasio de alta afinidad se podría conocer más acerca del funcionamiento de uno de los sistemas de transporte menos entendido; la finalidad del presente estudio fue determinar la absorción de potasio en condiciones de ausencia y resuplementación de K^+ en plantas de chile habanero (*C. chinense*) e identificar los niveles de expresión de un gene que codifica para un transportador de tipo HAK en raíces de chile habanero.

Resultados y discusión

Absorción de K^+ en plantas de chile habanero (*C. chinense* Jacq.)

En el análisis del efecto en la absorción de K^+ a $50 \mu\text{M}$ de KCl se observó una disminución de éste en el medio, indicando la absorción de este ion por las raíces de las plantas, la cual fue dependiente del tiempo de ausencia al que estuvieron sometidas.

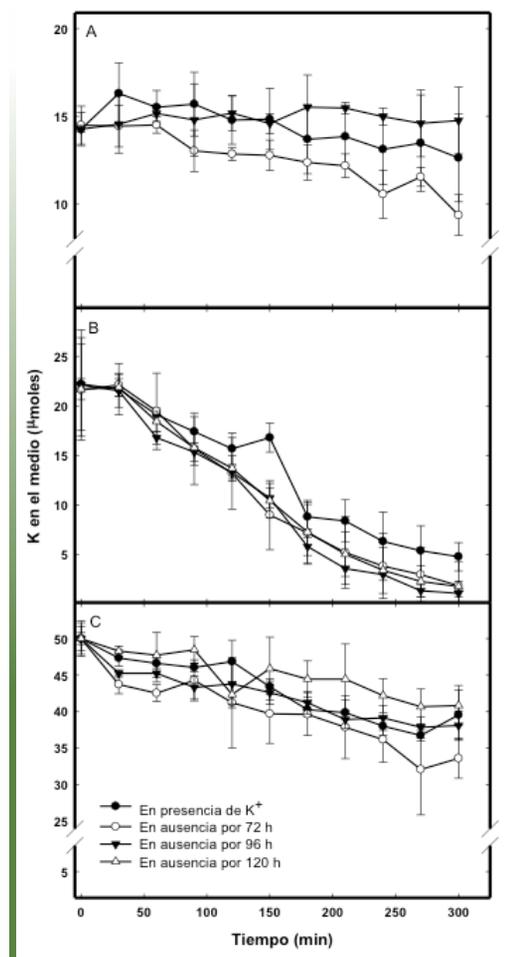
Las plantas que estuvieron en ausencia de K^+ por 72 h fueron las que presentaron mayor absorción de K^+ , mientras que las que estuvieron en ausencia por 96 h presentaron una absorción muy baja, la cual no presentó diferencia significativa con respecto de las plantas que nunca estuvieron en ausencia de K^+ (Figura 1A).

La absorción neta de K^+ , calculada como la diferencia entre la absorción total (μmoles de K^+ que disminuyeron en el medio) y el total liberado (μmoles de K^+ que aumentaron en el medio) fue aproximadamente cinco veces mayor en las plantas sometidas a 72 h de ausencia de K^+ , comparadas con las plantas testigo (creciendo siempre en presencia del nutrimento), cuando ambas fueron colocadas en $50 \mu\text{M}$ de K^+ (Cuadro 1). Sin embargo, no hubo absorción neta de este ion en aquellas plantas que estuvieron sometidas a ausencia de K^+ durante 96 h (Cuadro 1).

Independientemente del período de déficit de K^+ a la cual estuvieron sometidas las plantas, la absorción total de K^+ bajo estas condiciones tuvo valores de entre 5 y 8 μmoles aproximadamente, no observándose diferencias importantes entre los distintos tratamientos (Cuadro 1). Dado que la absorción neta tanto en las plantas sometidas al tratamiento de 96 h como en los testigos fueron de un valor mucho menor que la absorción total, se puede decir que hubo una liberación de K^+ al medio bajo estas dos condiciones. Este comportamiento no fue

observado para las plantas que estuvieron en ausencia de K^+ por 72 h (Cuadro 1).

Figura 1
Efecto de la ausencia de K^+
en la toma de alta afinidad de K^+



Las plantas crecieron en solución H1/5 (1.4 mM de K^+) por 45 días, después fueron transferidas a una solución libre de K^+ por 0 h (círculos negros), 72 h (círculos blancos), 96 h (triángulos negros) y 120 h (triángulos blancos). Después de cada tiempo, se adicionó al medio en el cual se encontraban las plantas: $50 \mu\text{M}$ (A), $100 \mu\text{M}$ (B) y $200 \mu\text{M}$ (C) de K^+ utilizando como fuente KCl. Las muestras de la solución externa fueron tomadas a diferentes tiempos y se determinó la cantidad de K^+ . Cada uno de los datos representa la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes, $n=3$.

Maathuis y Sanders⁽¹²⁾ señalan que en varias especies es posible observar la absorción de K⁺ a concentraciones menores a 1 μM, mientras que Sheahan *et al.*⁽¹³⁾ indican que en algunas especies la absorción de K⁺ se observa a concentraciones de 50 a 100 mM. Borges *et al.*⁽¹⁴⁾ indican que las demandas del chile habanero para la absorción de K⁺ son superiores a 89 μM de K⁺ en la solución en contacto con la superficie radicular. También indican que las concentraciones de K⁺ para impedir la liberación de K⁺ endógeno de la planta a la solución externa deben de ser superiores a dicha concentración. En este estudio observamos absorción de K⁺ a

una concentración de 50 μM de KCl sin liberar el ion al medio, particularmente en el tratamiento de 72 h de ausencia de K⁺. Esto contradice a lo reportado por Borges *et al.*⁽¹⁴⁾ Una explicación de lo anterior podría estar dada por un estudio realizado por Martínez-Cordero *et al.*⁽¹⁵⁾ en el cual reportan que en plantas de *Capsicum annum* expuestas a un déficit de K⁺ de 2 a 8 h y re-suplementadas con 50 μM de K⁺ no se observa absorción de K⁺, en tanto que en plantas que estuvieron en ausencia de K⁺ por más de 1 día sí puede observarse una absorción del ion con una tendencia de a mayor tiempo de inanición mayor cantidad de absorción.

Cuadro 1
**Absorción total y absorción neta de K⁺
en plantas de chile habanero**

ABSORCIÓN DE POTASIO						
Tratamiento	[KCl] μM					
	50		100		200	
	Absorción Total	Absorción Neta	Absorción Total	Absorción Neta	Absorción Total	Absorción Neta
+K ⁺	6.01 ± 0.53	1.54 ± 0.22	22.61 ± 8.76	14.01 ± 6.72	14.67 ± 4.01	11.33 ± 0.74
-K ⁺						
72 h	8.36 ± 0.73	7.22 ± 0.21	22.19 ± 1.89	19.70 ± 3.86	20.04 ± 1.00	13.89 ± 0.49
96 h	5.08 ± 1.19	0.64 ± 2.01	22.70 ± 2.57	20.99 ± 0.73	11.22 ± 1.83	2.57 ± 1.16
120 h			20.13 ± 0.53	20.04 ± 0.51	17.64 ± 2.93	5.99 ± 2.27

Las plantas crecieron en solución H1/5 (1.4 mM de K⁺) por 45 días y después fueron transferidas a una solución libre de K⁺ por 0, 72, 96 y 120 h. En el tiempo cero se adicionó al medio en el cual se encontraban las plantas 50, 100 y 200 μM de K⁺ utilizando KCl como fuente de potasio, el K⁺ fue medido como se describe en "Materiales y Métodos". El contenido de potasio se expresó en μmoles. Se presentó el valor promedio de tres réplicas ± DE.

Cuando las plántulas expuestas a los diferentes tratamientos fueron colocadas en presencia de 100 μmoles de K⁺ se observó una reducción importante de K⁺ en el medio, indicando la toma del mismo por las raíces de las plantas (Figura 1B). Existió una tendencia a una mayor toma de K⁺ en las plantas sometidas a ausencia de K⁺, a partir de los 90 min de exposición a K⁺ (Figura 1B). En el Cuadro 1 se observa que la toma

neta de K⁺ por las raíces de estas plantas sometidas a los tratamientos de ausencia de K⁺ fue de 20 μmoles, mientras que en las plantas testigo fue de 14 μmoles, aunque no tuvieron muchas diferencias. También es de destacar que bajo estas condiciones (100 μM de K⁺) no se observó una salida significativa de K⁺ al medio, ya que la absorción neta fue similar a la absorción total en todos los tratamientos (Cuadro 1). La

absorción de K^+ por las plantas a esta concentración fue mayor comparándola con la absorción dada por plantas expuestas a 50 μM de KCl (Figura 1A). Esto concuerda con lo reportado por Martínez-Cordero *et al.*,⁽¹⁵⁾ en donde las plantas de *Capsicum annuum* expuestas a 100 μM de KCl presentaron una mayor absorción comparada con las expuestas a 50 μM de KCl.

Por otro lado, las plantas sometidas a ausencia de K^+ por 72 h fueron las que presentaron mayor absorción de este ion al ser transferidas a un medio con 200 μM de K^+ (Figura 1C). Al determinar la absorción neta se observó que en efecto ésta fue superior en el tratamiento de ausencia durante 72 h (cuyo valor fue 13.89 ± 0.49 $\mu moles$), presentando una diferencia significativa si se compara con las plantas testigo, en las cuales la absorción neta fue de 11.33 ± 0.74 $\mu moles$ (Cuadro 1). Es de destacar que en los tratamientos de 96 y 120 h la absorción neta se redujo significativamente, comparada con lo observado en las plantas testigo; y este valor fue mucho menor a la absorción total presentada en cada condi-

ción, lo cual indica que hubo una salida de K^+ hacia el medio (Cuadro1). En general, la absorción de K^+ a esta concentración disminuye si la comparamos con el estudio realizado a 100 μM de KCl y esto puede deberse a que la concentración de K^+ externo puede producir cambios que afecten la actividad del sistema de absorción de K^+ de alta afinidad.

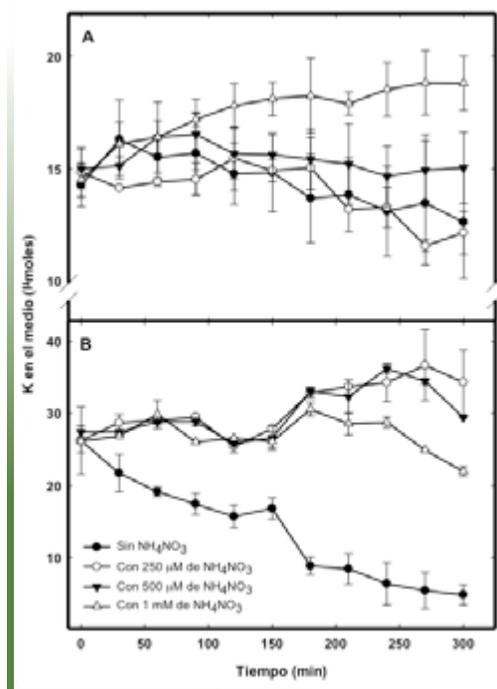
A partir de los resultados obtenidos se decidió utilizar el tratamiento de 72 h de ausencia a K^+ y nuevamente adicionar 50 y 100 μM del mismo, para estudiar el efecto del NH_4^+ y de los bloqueadores de canales, sobre la toma de K^+ . Esta solución se hizo tomando como criterio la absorción neta que presentó el tratamiento de 72 h $-K^+$ + 50 μM de KCl, la cual fue significativamente mayor con respecto del tratamiento testigo y además fue el único tratamiento en este caso que no presentó un eflujo de K^+ . Por el otro lado, el tratamiento de 72 h $-K^+$ + 100 μM de KCl tampoco provocó un eflujo de K^+ al medio, y bajo estas condiciones (100 μM) la absorción neta de K^+ fue superior a los demás tratamientos (50 y 200 μM).

Efecto del NH_4^+ sobre la absorción de K^+

Cuando las plantas de chile habanero expuestas al tratamiento de 72 h $-K^+$ fueron colocadas en un medio que contenía 50 μM de KCl, en presencia NH_4NO_3 , éstas redujeron significativamente la toma de K^+ (Figura 2A). Las plantas expuestas a la concentración más baja de NH_4NO_3 (250 μM) presentaron una reducción en el contenido de K^+ en el medio durante los primeros 30 min de tratamiento, indicando una toma del ion a este intervalo de tiempo (Figura 2.2A). Sin embargo, a partir de este tiempo y hasta las tres horas se observó un ligero incremento de los valores de K^+ en el medio, indicando un eflujo del mismo desde

la raíz al medio. A partir de las 3 horas se observó una tendencia a la disminución del K^+ en el medio. A la dosis de 500 μM de NH_4NO_3 , el comportamiento observado fue similar al de 250 μM , en los primeros tiempos existió una tendencia a aumentar la cantidad de K^+ en el medio (indicando eflujo de K^+), mientras que a tiempos mayores la tendencia es a disminuir o a mantenerse constante, indicando un influjo pequeño (Figura 2A). Cuando la dosis de NH_4^+ se incrementó a 1 mM, se obtuvo un aumento de K^+ en el medio durante las 5 h del experimento, indicando un eflujo de K^+ .

Figura 2
Efecto del NH_4^+ en la toma de alta afinidad de K^+



Las plantas crecieron en solución H1/5 (1.4 mM de K^+) por 45 días, después se transfirieron a una solución H1/5 libre de K^+ y libre de nitrógeno y fueron resuplementadas con 50 μM (A) y 100 μM (B) de KCl más 250 μM (círculos blancos), 500 μM (triángulos negros) y 1 mM (triángulos blancos) de N utilizando como fuente 50% de NO_3^- y 50% de NH_4^+ . Las muestras de la solución externa fueron tomadas a diferentes tiempos y se determinó la cantidad de K^+ . Cada uno de los datos representa la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes, $n=3$.

El Cuadro 2 muestra una reducción en la absorción total de K^+ en aquellas plantas expuestas a 50 μM de KCl en presencia de NH_4^+ comparadas con las plantas testigos. Esta reducción fue dependiente de la dosis de NH_4^+ utilizada. En cuanto a la absorción neta, ésta se redujo en más de 60% en aquellas plantas expuestas a 250 μM de NH_4^+ , comparada con las plantas testigo; mientras que dosis mayores de NH_4^+ inhibieron en 100% la absorción neta, favoreciendo significativamente el eflujo de K^+ desde las raíces (Cuadro 2).

Cuando el tratamiento fue: 72 h $-\text{K}^+$ / + 100 μM de KCl , en presencia de NH_4^+ , el efecto fue significativo. Se observó una inhibición en la toma de K^+ , comparada con la toma de las plantas testigos (Figura 2B) y una tendencia al eflujo de K^+ al medio, en el periodo final de la evaluación, la cual fue mayor a 250 y 500 μM de NH_4^+ . También se observó una reducción significativa en la absorción total de K^+ durante las cinco horas en aquellas plantas expuestas a 100 μM de K^+ en presencia de NH_4^+ , esta reducción se dio para las dosis de 250 y 1000 μM (Cuadro 2). Bajo estas condiciones no se obtuvo una absorción neta de K^+ , sino por el contrario se pudo observar un eflujo significativo del mismo hacia el medio.

Graficando la absorción total vs Concentración de NH_4^+ se pudo constatar que en el tratamiento de 50 μM las plantas redujeron su absorción total de una manera completamente dependiente de la dosis (Figura 3), donde aproximadamente a una dosis de NH_4^+ de 340 μM se obtuvo 50% de inhibición. Sin embargo, en el tratamiento de 100 μM se observó un comportamiento diferente al del tratamiento de 50 μM , en este caso se obtuvo una reducción más significativa (más de 60% de inhibición) en la absorción total en las plantas expuestas a 250 μM de NH_4^+ , mientras que entre 250 μM y 500 μM no se obtiene un incremento mayor en la inhibición, indicando posiblemente la existencia de otros posibles sistemas de transporte que no son sensibles a NH_4^+ . Sin embargo, a dosis mayores de NH_4^+ (1 mM) se inhibe totalmente la absorción total en estas plantas (Figura 3). Es necesario destacar que en el tratamiento de 50 μM no se obtuvo una reducción total en la absorción de este ion (Figura 3).

Existen muchos estudios en los cuales reportan que la entrada de K^+ mediada por los sistemas de transporte de alta afinidad es reducida severamente por el NH_4^+ .⁽¹⁶⁻²²⁾

Cuadro 2

Absorción total y absorción neta de K^+ en plantas de chile habanero en presencia de NH_4NO_3 , CsCl y TEA durante cinco horas

ABSORCIÓN DE POTASIO				
Tratamiento	[KCl] μM			
	50		100	
	Absorción Total	Absorción Neta	Absorción Total	Absorción Neta
NH_4NO_3 (mM)				
0.0	8.36 \pm 0.73	7.22 \pm 0.21	22.19 \pm 1.89	19.70 \pm 3.86
0.25	6.07 \pm 1.92	2.69 \pm 2.07	7.69 \pm 1.57	-5.43 \pm 0.01
0.5	2.14 \pm 0.45	-0.04 \pm 0.70	12.39 \pm 3.48	-0.91 \pm 0.81
1.0	0.94 \pm 0.59	-4.29 \pm 0.47	0.28 \pm 0.15	-0.03 \pm 0.02
CsCl (mM)				
10	2.21 \pm 1.73	-16.19 \pm 2.39	8.35 \pm 5.90	-5.52 \pm 3.89
20	4.44 \pm 0.70	-6.42 \pm 0.47	21.36 \pm 0.25	9.72 \pm 2.11

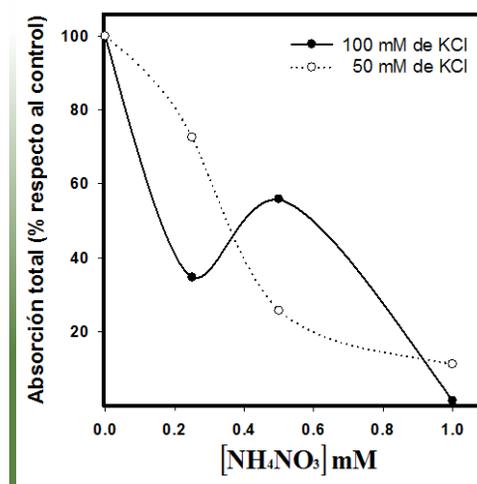
Las plantas crecieron en solución H1/5 (1.4 mM de K^+) por 45 días y después fueron transferidas a una solución libre de K^+ por 72 h. En el tiempo cero se adicionó al medio en el cual se encontraban las plantas 50 y 100 μM de K^+ utilizando KCl como fuente de K^+ más los componentes a estudiar. El K^+ fue medido como se describe en "Materiales y Métodos". El contenido de potasio se expresó en $\mu moles$. Se presenta el valor promedio de tres replicas \pm DE.

El mecanismo por el cual el NH_4^+ inhibe la entrada de K^+ en los sistemas de transporte de alta afinidad no está firmemente establecido, éste podría ser el resultado de una competencia directa entre el NH_4^+ y el K^+ por el transportador.⁽²³⁾

La respuesta de las plantas en el tratamiento a 100 μM de KCl podría ser explicada por los resultados obtenidos en estudios previos, el primero fue realizado por Buschmann *et al.*,⁽²⁴⁾ en el cual reportaron un aumento en los transcritos de *AKT1* al eliminar el K^+ a plantas de trigo, lo que sugiere que los canales de K^+ en trigo pueden desempeñar un papel importante en la búsqueda de K^+ . Otros estudios de análisis de tipo electrofisiológico muestran que la insensibilidad de NH_4^+ es específica para canales de K^+ tipo Shaker^(17,25-26) y por último, el que reporta que la susceptibilidad diferencial del NH_4^+ en los sistemas de transporte de alta y baja afinidad puede

Figura 3

Curva dosis-respuesta del efecto de NH_4^+ sobre la absorción total de K^+



demostrar la capacidad de *AKT1* de mediar el transporte de K^+ en un nivel de alta afinidad, esto después de la inhibición de los sistemas de transporte de alta afinidad

por NH_4^+ en *A. thaliana*, también indican que al utilizar una mutante *akt1* ésta crece muy poco a bajas concentraciones externas de K, mientras que las plantas de tipo

silvestre son menos afectadas, indicando que el AKT1 podría buscar K^+ a concentraciones que se encuentran en el campo de alta afinidad.^(17,25)

Absorción de K^+ en presencia de bloqueadores de canales de K^+ (CsCl y TEA)

Con el objetivo de profundizar en el estudio de los mecanismos de toma de K^+ de alta afinidad en raíces de chile habanero se decidió utilizar dos compuestos, el CsCl y el TEA, los cuales se han usado frecuentemente como bloqueadores de canales de K^+ en células animales y también algunos trabajos reportan su uso para plantas.⁽²⁷⁾

Cuando las plantas que se encontraban en ausencia de K^+ durante 72 h fueron transferidas a un medio en presencia de $50 \mu\text{M}$ de K^+ y CsCl se observó una mayor toma de K^+ a los primeros 30 min, comparadas con la de las plantas testigo. Sin embargo, a partir de este momento aumentó el contenido de K^+ en el medio indicando la salida de este ion de la raíz. Esta liberación fue máxima al final de las 5 h de evaluación. Cuando se realizó el cálculo de la absorción total de K^+ por las raíces en este período de tiempo se obtuvo una inhibición de más de 70%, no existiendo una absorción neta y presentándose un elevado eflujo de K^+ al medio (Cuadro 2).

Estos resultados indican que las plantas tratadas con CsCl en un principio absorben K^+ pero después de un tiempo (150 min) comienzan a liberarlo e incluso liberan el K^+ endógeno que tenían antes de ser tratadas, esto concuerda con un estudio realizado por Hong-Yan *et al.*⁽²⁷⁾ en el cual reportan que al tratar por 3 horas con 30 mM de CsCl más 0.25 mM de K^+ a raíces de arroz el contenido de K^+ disminuye en el tejido de $5.41 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS a $4.99 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de PS. Al analizar la absorción de K^+ a las mismas condiciones pero en un medio a $100 \mu\text{M}$

de KCl, las plantas en presencia de CsCl en un principio liberaron K^+ y posteriormente se mantuvieron a cantidades similares de absorción, la absorción total en las plantas tratadas se inhibió en 62% ($8.35 \pm 5.90 \mu\text{moles de K}^+$), con respecto del control (22.19 ± 1.89) y la absorción neta fue negativa, liberando al medio $5.52 \pm 3.89 \mu\text{moles de K}^+$ (Cuadro 2). La liberación de K^+ efectuada por las plantas a esta concentración de K^+ fue menor si la comparamos con la liberada en el tratamiento de $50 \mu\text{M}$ de KCl.

Al analizar la absorción de K^+ a las mismas condiciones pero en un medio a $100 \mu\text{M}$ de KCl, las plantas en presencia de 20 mM de TEA presentaron una liberación de K^+ en los primeros 30 min y posteriormente presentaron una absorción que fue aumentando con respecto del tiempo; esto sucedió hasta el minuto 150 en el cual la absorción se mantuvo en las mismas cantidades hasta llegar al minuto 300 (Figura 4B). Las plantas tratadas con TEA tuvieron una inhibición en la absorción total de 4% (21.36 ± 0.25) con respecto del control (22.19 ± 1.89); la absorción neta de las plantas tratadas fue de 9.72 ± 2.11 , 51% menor que las plantas control (19.70 ± 3.86) (Figura 4B y Cuadro 2).

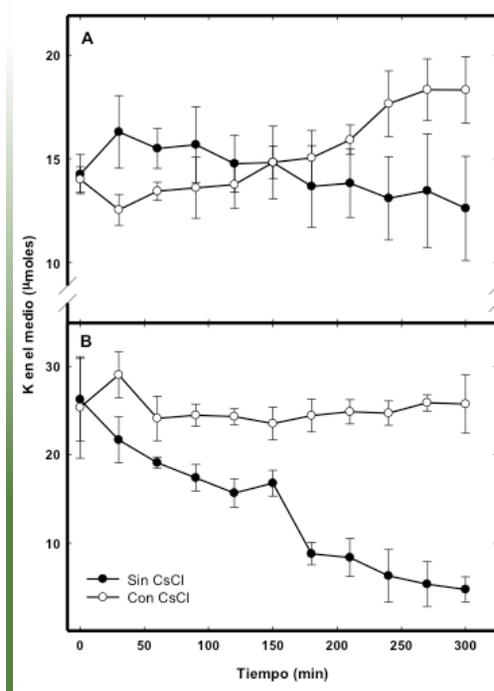
Es poco lo que podemos discutir en cuanto a estudios con plantas completas utilizando el bloqueador TEA. Ketchum y Poole⁽²⁹⁾ mencionaron que el TEA al parecer es un bloqueador totalmente ineficaz en las células de las plantas en general, esta visión no ha cambiado mucho en los últimos años, como ejemplo Hong-Yan *et al.*⁽²⁷⁾ en un estudio rea-

lizado en arroz reportan que no encontraron alguna diferencia significativa en la absorción de K^+ en plantas expuestas a 0.25 mM de K^+ más 30 mM de TEA, sin embargo, existen estudios electrofisiológicos en células vegetales en los cuales reportan que existe una inhibición en la absorción de K^+ cuando estas se encuentran en presencia de TEA.⁽²⁸⁾

Nuestros resultados no coinciden con Ketchum y Poole⁽²⁹⁾ y con Hong-Yan *et al.*,⁽²⁷⁾ ya que en chile habanero si observamos

inhibición en la absorción de K^+ al encontrarse presente TEA, esta inhibición podría estar dándose en un sistema de absorción dual. Se ha reportado que el canal AKT1 puede mediar el transporte de K^+ en un nivel similar al de un transportador de alta afinidad.^(17, 25)

Figura 4
Efecto del TEA en la toma de alta afinidad de K^+



Las plantas crecieron en solución H1/5 (1.4 mM de K^+) por 45 días, después se transfirieron a una solución H1/5 libre de K^+ y fueron resuplementadas con 50 μ M (A) y 100 μ M (B) de KCl más 20 mM de TEA (círculos blancos). Las muestras de la solución externa fueron tomadas a diferentes tiempos y se determinó la cantidad de K^+ . Cada uno de los datos representa la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes, $n=3$.

Conclusiones

Las raíces de chile habanero fueron capaces de absorber K^+ , cuando fueron colocadas en un medio con $50 \mu M$ de K^+ . Esta absorción incrementó cuando las plantas fueron expuestas a un déficit de K^+ durante 72 h. Estos resultados sugieren que bajo estas condiciones en las raíces de chile se inducen mecanismos de transporte de K^+ de alta afinidad que son los responsables para dicha toma.

La mayor absorción de K^+ por las raíces de chile se obtuvo cuando éstas se colocaron en un medio de $100 \mu M$ de K^+ . Sin embargo, no se observó un aumento en la absorción cuando a las raíces se les aplicaron diferentes períodos de déficit de K^+ , indicando que no se indujeron otros mecanismos de transporte de K^+ .

El NH_4^+ inhibió la toma de K^+ por las raíces de las plantas expuestas por 72 h a la ausencia de K^+ y colocadas posteriormente a $50 \mu M$ de K^+ .

Esta inhibición fue dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que el sistema inducido de toma de K^+ de alta afinidad que está presente en las raíces es sensible a NH_4^+ y es responsable de aproximadamente 90% de la toma de K^+ de alta afinidad bajo estas condiciones, ya que hubo aproximadamente una absorción de 10% que no fue sensible a NH_4^+ .

El NH_4^+ también inhibió la toma de K^+ de alta afinidad en las raíces de las plantas que fueron cultivadas durante 72 h en ausencia de K^+ y transferidas a $100 \mu M$ del mismo. Sin embargo, el comportamiento en respuesta a la dosis de NH_4^+ fue diferente al observado a $50 \mu M$, indicando que a $100 \mu M$ se encuentran presentes en la raíz otros mecanismos de toma de K^+ de alta afinidad, las cuales, como se planteó anteriormente, no son inducidas por los tratamientos de déficit y además no son reguladas de igual manera por NH_4^+ . También se sugiere que a $100 \mu M$ no estuvieron presentes los mecanismos de toma insensibles a NH_4^+ , ya que la inhibición fue prácticamente total.

La toma de K^+ de alta afinidad también fue sensible a los bloqueadores de canales de K^+ CsCl y TEA. La sensibilidad fue mayor para la condición de $50 \mu M$. Estos resultados sugieren que pudieran existir canales de K^+ que participen en la toma de K^+ de alta afinidad o que estos compuestos pudieran tener un efecto negativo para algunos transportadores de K^+ presentes en las raíces de chile habanero. Es importante comentar que se necesitan estudios más profundos en este tema, ya que hay muy pocos antecedentes sobre el uso de estos bloqueadores en plantas y los resultados de los mismos son contradictorios.

Agradecimientos

Este proyecto contó con financiamiento 166621 del Conacyt. JRPA y NRL agradecen la beca de Maestría y de Doctorado, respectivamente, otorgadas por el Conacyt.

Referencias bibliográficas

- (1) Tisdale S.L., Nelson W.L., Beaton J.D., Havlin J.L. 1993. *Soil fertility and fertilizer*. Macmillan, New York.
- (2) Leigh R.A., Walker D.J., Fricke W., Tomos A.D., Miller A.J. 1999. "Patterns of potassium compartmentation in plant cells as revealed by microelectrodes and microsampling". In: *Frontiers in Potassium Nutrition: New Perspectives on the Effects of Potassium on the Physiology of Plants*. (eds D.M. Oosterhuis & Berkowitz) The Potash and Phosphate Institute and the Crop Science Society of America. pp. 63-70.
- (3) Cuin T.A., Miller A.J., Laurie S.A., Leigh R.A. 2003. "Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves". *J Exp Bot* 54: 657-661. DOI: 10.1093/jxb/erg072.
- (4) Walker D.J., Leigh R.A., Miller A.J. 1996. "Potassium homeostasis in vacuole plant cells". *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:10510-10514.
- (5) Mäser P., Thomine S., Schroeder J.I., Ward J.M., Hirschi K., Sze H., Talke I.N., Amtmann A., Maathuis F.J.M., Sanders D., Harper J.F., Tchieu J., Gribskov M., Persans M.W., Salt D.E., Kim S.A., Guerinot M.L. 2001. "Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis". *Plant Physiol* 126:1646-1667. DOI:10.1104/pp.126.4.1646.
- (6) Vallejo A.J., Peralta M.L., Santa-María G.E. 2005. "Expression of potassium-transporter coding genes, and kinetics of rubidium uptake, along a longitudinal root axis". *Plant Cell Environ* 28:850-862. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2005.01334.x
- (7) Ahn S.J., Shin R., Schachtman D.P. 2004. "Expression of KT/KUP genes in Arabidopsis and the role of root hairs in K⁺ uptake". *Plant Physiol* 134:1135-1145. DOI: 10.1104/pp.103.034660.
- (8) Bañuelos M.A., Garcíadeblas B., Cubero B., Rodríguez-Navarro A. 2002. "Inventory and functional characterization of the HAK potassium transporters of rice". *Plant Physiol* 130:784-795. DOI:10.1104/pp.007781.
- (9) Pilot G., Gaymard F., Mouline K., Cheral I., Sentenac H. 2003. "Regulated expression of Arabidopsis Shaker K⁺ channel genes involved in K⁺ uptake and distribution in the plant". *Plant Mol Biol* 51: 773-787.
- (10) Shin R., Schachtman D.P. 2004. "Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation". *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8827-8832. DOI: 10.1073/pnas.0401707101.
- (11) Fernando M., Kulpa J., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. 1990. "Potassium-dependent changes in the expression of membrane-associated proteins in barley roots. I. Correlations with K⁺ (86Rb⁺) influx and root K⁺ concentration". *Plant Physiol* 92:1128-1132. DOI: 0032-0889/90/92/1128/05.
- (12) Maathuis F.J., Sanders D. 1996. "Mechanism of potassium by higher plant root". *Physiol Plant* 96:158-168. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00197.x
- (13) Sheahan J.J., Ribeiro-Neto L., Sussman M.R. 1993. "Cesium insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*". *Plant J* 3:647-656. DOI: 10.1111/j.1365-313X.1993.00647.x
- (14) Borges-Gómez L., Chuc-Puc Gómez J., Escamilla-Bencomo A., Medina-Lara F. 2006. "Cinética de la absorción de potasio por las raíces de chile habanero (*Cap-sicum chinense* Jacq.)". *Agrociencia* 40:431-440.

- (15) Martínez-Cordero M.A., Martínez V., Rubio F. 2005. "High-affinity K^+ uptake in pepper plants". *J Exp Bot* 56:1553–1562. DOI:10.1093/jxb/eri150.
- (16) Wang M.Y., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. 1996. "Interactions between K^+ and NH_4^+ : effects on ion uptake by rice roots". *Plant Cell Environ* 19:1037–46. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00210.x.
- (17) Spalding E.P., Hirsch R.E., Lewis D.R., Qi Z., Sussman M.R., Lewis B.D. 1999. "Potassium uptake supporting plant growth in the absence of AKT1 channel activity–inhibition by ammonium and stimulation by sodium". *J Gen Physiol* 113:909–18. DOI:10.1085/jgp.113.6.909.
- (18) Santa-María G.E., Danna C.H., Czibener C. 2000. "High-affinity potassium transport in barley roots. Ammonium-sensitive and -insensitive pathways". *Plant Physiol* 123:297–306. DOI:10.1104/pp.123.1.297.
- (19) Kronzucker H.J., Szczerba M.W., Britto D.T. 2003. Cytosolic potassium homeostasis revisited: 42K-tracer analysis in *Hordeum vulgare* L. reveals set-point variations in $[K^+]$. *Planta* 217:540–546. DOI: 10.1007/s00425-003-1032-5.
- (20) Szczerba M.W., Britto D.T., Kronzucker H.J. 2006. "Rapid, futile K^+ cycling and pool-size dynamics define low-affinity potassium transport in barley". *Plant Physiol* 141:1494–1507. DOI:10.1104/pp.106.082701.
- (21) Szczerba M.W., Britto D.T., Ali S.A., Balkos K.D., Kronzucker H.J. 2008. " NH_4^+ -stimulated and-inhibited components of K^+ transport in rice (*Oryza sativa* L.)". *J Exp Bot* 59:3415–3423. DOI:10.1093/jxb/ern190.
- (22) Nieves-Cordones M., Martínez-Cordero M.A., Martínez V., Rubio F. 2007 "An NH_4^+ -sensitive component dominates high-affinity K^+ uptake in tomato plants". *Plant Sci* 172:273–80. DOI:10.1016/j.plantsci.2006.09.003.
- (23) White P.J. 1996. "The permeation of ammonium through a voltage-independent K^+ channel in the plasma membrane of rye roots". *J. Membr Biol* 152:89–99.
- (24) Buschmann P.H., Vaidyanathan R., Gassmann W., Schroeder J.I. 2000. "Enhancement of $Na(+)$ uptake currents, time-dependent inward-rectifying $K(+)$ channel currents, and $K(+)$ channel transcripts by $K(+)$ starvation in wheat root cells". *Plant Physiol* 122:1387–1397. DOI:10.1104/pp.122.4.1387.
- (25) Hirsch R.E., Lewis B.D., Spalding E.P., Sussman M.R. 1998. "A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition". *Science* 280:918–21.
- (26) Su Y.H., North H., Grignon C., Thibaud J.B., Sentenac H., Ve'ry A.A. 2005. "Regulation by external K^+ in a maize inward shaker channel targets transport activity in the high concentration range". *Plant Cell* 17:1532–48. DOI:10.1105/tpc.104.030551.
- (27) Liu H.Y., Sun W.N., Su W.A., Tang Z.C. 2006. "Co-regulation of water channels and potassium channels in rice". *Physiol Plant* 128:58–69. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2006.00709.x
- (28) Wegner L.H., De Boer A.H., Raschke K. 1994. "Properties of the K^+ Inward Rectifier in the Plasma Membrane of Xylem Parenchyma Cells from Barley Roots: Effects of TEA^+ , Ca_2^+ , Ba_2^+ and La_3^{++} ". *J Membr Biol* 142:363–379.
- (29) Ketchum K.A., Poole R.J. 1991. "Cytosolic calcium regulates a potassium current in corn (*Zea mays*) protoplasts". *J Membr Biol* 119: 277-288





Comportamiento del desarrollo radicular del chile habanero en presencia de aluminio

Capítulo 12

María de Fátima Medina-Lara, Emanuel Bojórquez-Quintal,
Camilo Escalante-Magaña, Carlos Francisco de Jesús Fuentes-Cerda,

Manuel Martínez-Estévez*

*Autor responsable: luismanh@cicy.mx



Resumen

Además de la importancia comercial del chile habanero para la Península de Yucatán, esta planta se ha utilizado como modelo de estudio para responder preguntas relacionadas a la interacción de las plantas con el estrés abiótico, específicamente por elementos como el aluminio. Este trabajo surge como resultado de la comparación de *Capsicum chinense* Jacq., con especies como *Coffea arabica* y *Arabidopsis thaliana*, donde haciendo uso de un modelo de cajas segmentadas se observó el efecto de Al^{3+} sobre las raíces de dichas especies, mostrando *A. thaliana* una alta sensibilidad, *C. arabica* un efecto benéfico a bajas concentraciones de Al^{3+} y en *C. chinense* no se observó un efecto inhibitorio en el crecimiento radicular, aun a concentraciones de 500 μM de Al^{3+} , la cual ya es tóxica para muchas plantas, lo cual la hace interesante para estudios posteriores en este aspecto.⁽¹⁾

Esto nos llevó al planteamiento de una nueva estrategia experimental que tuvo como objetivo evaluar el efecto del aluminio sobre las raíces de chile habanero en condiciones de hidroponía, en plántulas expuestas a concentraciones de 0 a 1000 μM por 14 días, haciendo uso de una solución nutritiva a un pH de 4.3, evaluando el uso del amortiguador homopipes. Los resultados mostraron que con 1000 μM de aluminio se observó el efecto tóxico de este metal en plantas de 35 DDG, al disminuir la longitud radicular total de las raíces.

Palabras clave

Chile habanero, nutrición mineral, raíces, aluminio, hidroponía, estrés

Introducción

La agricultura siempre ha tenido un impacto ambiental fuerte. Hay que talar bosques para tener suelo apto para el cultivo, hacer embalses de agua para regar, canalizar ríos, etcétera. La agricultura moderna ha multiplicado los impactos negativos sobre

el ambiente, causando la contaminación por plaguicidas y fertilizantes, la deforestación, la pérdida de biodiversidad genética, la destrucción de los suelos, así como su alcalinización o acidificación, entre otros problemas.

La acidificación de los suelos es un problema que se agrava principalmente por la contaminación generada por el ser humano, ya que si bien los suelos ácidos se presentan de manera natural en regiones del planeta como las zonas tropicales y subtropicales, cada vez ocupan mayor superficie por efecto de dicha contaminación. Los suelos ácidos tienen un pH menor a 5.5 y constituyen aproximadamente 30% del área total de la tierra del planeta, así como 50% de los suelos arables del mundo, y representan un problema para la producción agrícola, ya que al disminuir el pH se presentan problemas nutrimentales y de toxicidad por metales, principalmente aluminio.⁽²⁾

El aluminio se encuentra en el suelo en forma de aluminosilicatos u óxidos de aluminio, pero en suelos ácidos el aluminio es liberado y se vuelve soluble en las formas $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y Al^{3+} , siendo esta última la forma más tóxica, ocasionando daños a nivel tisular, celular y molecular en las plantas superiores. Sin embargo, su principal efecto tóxico es la inhibición del crecimiento radical, por alteraciones en su arquitectura y disminución de su elongación, afectando la absorción de nutrientes como Ca y K.⁽²⁾

Sin embargo, actualmente también se discuten los efectos benéficos del aluminio a bajas concentraciones, en el crecimiento y toma de nutrientes de varias especies, especialmente las que son nativas de suelos ácidos,⁽³⁾ lo cual representa una ventaja adaptativa para dichas plantas, hablándose de especies acumuladoras y no acumuladoras de aluminio, según su concentración en los tejidos. Es decir, estas plantas crean mecanismos de tolerancia, para adaptarse a la presencia de aluminio como respuesta a las condiciones que su medio ambiente les impone.⁽⁴⁾

En lo que respecta a *Capsicum chinense* Jacq., existe un reporte del nivel de sensibilidad de sus raíces a aluminio utilizando el modelo de cajas segmentadas, donde no se observó la disminución en la elongación de las raíces, incluso a concentraciones de 500 mM, la cual ya es tóxica para muchas especies sensibles, como *Arabidopsis thaliana*.⁽¹⁾ Sin embargo, *C. chinense* se recomienda sembrar en regiones donde los suelos no presentan una condición ácida⁽⁵⁾ y, por lo tanto, se esperaría que fuera sensible a la acidez y al aluminio. Además, se ha reportado en *Capsicum annuum* daños en la ultraestructura de las raíces de plántulas expuestas a aluminio, mostrando fuerte sensibilidad, así como cambios en la morfología y la anatomía de la raíz.⁽⁶⁾ Estos resultados nos llevaron a plantearnos el uso de otra estrategia como es la hidroponía, para continuar con los estudios fisiológicos y morfológicos que nos permitan corroborar los efectos del aluminio en *C. chinense* Jacq. antes mencionados.

La información que se genere bajo estas condiciones puede contribuir al manejo de este cultivo en suelos ácidos, ya que *C. chinense* es un cultivo importante en varios países, y en México su cultivo no sólo se circunscribe a la Península de Yucatán sino

también a otras entidades federativas que presentan problemas de suelos ácidos y, frecuentemente, de aluminio.⁽⁷⁾ Por otra parte, si *C. chinense* presentara tolerancia al aluminio, resultaría un buen modelo para generar conocimientos que permitan entender los mecanismos de esta tolerancia y contribuir, a largo plazo, con la producción de plantas transgénicas de interés comercial tolerantes al aluminio, lo cual posibilitaría cultivar en suelos ácidos y minimizar daños ecológicos.

Suelos ácidos

Según datos de la FAO, se ha determinado que los suelos ácidos constituyen aproximadamente el 30% del área total de la tierra del planeta, así como el 50% de los suelos arables del mundo, lo cual indica su importancia como un factor que limita la producción agrícola en el ámbito mundial. En muchos países en desarrollo, estos suelos constituyen una limitante para el cultivo de plantas comestibles como son el maíz y el arroz, ya que el 20% y 13%, respectivamente, de estos cultivos, se desarrolla en estos suelos.⁽⁴⁾

Los suelos ácidos se caracterizan por un pH, el cual puede ser fuertemente ácido (5.5-4.5) o extremadamente ácido (<4.5); tienen

una capacidad de intercambio catiónico baja y una baja saturación de bases.^(4,8)

El pobre crecimiento vegetal en los suelos ácidos se debe de manera general a una deficiencia de nutrientes y toxicidad por metales, que en específico incluye a la toxicidad por Al, toxicidad por Mn, baja provisión de N (principalmente en forma de NH_4^+), deficiencia de P, deficiencia de Mo y concentraciones tóxicas de ácidos fenólicos. Se ha considerado al propio ion H^+ como la principal causa del pobre crecimiento vegetal,⁽⁹⁾ por otro lado, se ha sugerido que el bajo suministro de Ca^{2+} a pH bajo es la principal causa.⁽¹⁰⁾

Disponibilidad de nutrientes en suelos ácidos

El pH de los suelos ácidos afecta directa o indirectamente la disponibilidad de muchos nutrientes (Figura 1), teniendo implicaciones en el crecimiento de las plantas. Esto se debe a que, dependiendo del pH del suelo, la planta puede captar diversos minerales. Por ejemplo, si el pH es inferior a 5, la disponibilidad de algunos nutrientes

como P, Ca, Mg y Mo es muy baja y la absorción por parte de la planta es limitada. Por otro lado, la disponibilidad de elementos tóxicos como el Al aumenta, siendo la toxicidad por este mineral la principal limitante del cultivo de plantas con interés económico⁽¹¹⁾ y ecológico en los suelos ácidos en el ámbito mundial.

Aluminio en suelos

El estudio sobre la fitotoxicidad del Al empezó a principios del siglo XX y ha cobrado importancia porque se ha descrito, junto con

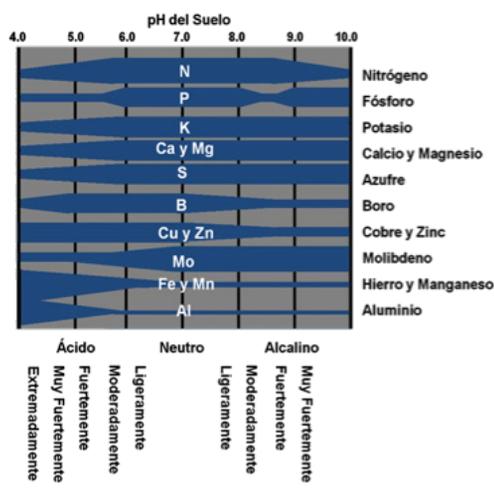
diversos metales, como importantes limitadores del crecimiento de las plantas provocando fuertes pérdidas económicas.^(13,14)

El aluminio (Al) es el metal más abundante en la tierra y el tercer elemento en abundancia en la corteza terrestre, donde compone aproximadamente el 8% en peso. En la naturaleza, se encuentra solamente en forma oxidada. En cambio, en solución acuosa, el ion hidroliza las moléculas de agua formando hidróxidos. La química del Al es bastante compleja, debido a su alta carga iónica y su pequeño radio atómico, este metal es capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran en el suelo en forma soluble.⁽¹⁵⁾

Dependiendo del pH del suelo, el Al molecular existe en varias formas de hidroxialuminio: $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, AlOH^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_3$ y $\text{Al}(\text{OH})_4^-$. Cuando el pH es menor de 5 el Al^{3+} es la especie más tóxica para las plantas, sin embargo, cuando el pH del suelo es de 5 a 6, las especies dominantes son el AlOH^{2+} y $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, las cuales no son tan tóxicas para las plantas como Al^{3+} . Cuando el pH es neutro, el $\text{Al}(\text{OH})_3$ es formado, sin embargo, no es tóxico y es relativamente insoluble. El aluminato $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ es la especie dominante

cuando el pH es alcalino ($\text{pH} > 7.0$). La concentración de Al en suelos ácidos puede variar en un rango de varios micromoles (μM) a milimoles (mM), dependiendo de las condiciones del suelo.⁽⁸⁾

Figura 1
Disponibilidad de nutrientes en función del pH del suelo



Fuente: TerraGis, UNSW 2007.⁽¹²⁾

Toma del aluminio en plantas

El sistema radical toma el Al en un proceso de intercambio que involucra los sitios de unión de Ca en la superficie de las células de la raíz, este proceso empieza cuando las raíces son expuestas al metal, después de un periodo corto de tiempo, siendo el ápice de la raíz el principal sitio de toma del Al.⁽¹⁶⁾

La pared celular es el principal sitio de unión de este elemento antes de entrar al citoplasma, debido a la carga negativa de sustancias como la pectina. Sin embargo, la membrana plasmática funciona como una barrera al movimiento pasivo del Al hacia el interior de la célula.⁽⁸⁾

El aluminio depositado en la pared celular forma precipitados o es adsorbido, también puede ser desorbido y solubilizado con citrato. En células de raíz de plantas resistentes a este metal, se producen compuestos que se unen al Al para formar compuestos no tóxicos como son los ácidos orgánicos (citrato, malato y oxalato), los fosfatos y algunas proteínas (fosfolipasa, glucanasa, NAD cinasa) al ser inducidas por el Al libre.⁽¹⁷⁾ Por otro lado, la toma de Al es significativamente reducida a bajas temperaturas ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) en comparación con altas temperaturas ($23\text{ }^{\circ}\text{C}$).⁽¹⁸⁾ Asimismo, altas concentraciones de los cationes NH_4 y H^+ facilitan la toma del Al en la rizosfera en suelos con $\text{pH} < 5.0$.⁽¹⁷⁾

Distribución del aluminio en la raíz

Se sabe que dependiendo de la sensibilidad de cada tipo de planta variará la concentración de Al en la raíz.⁽¹⁹⁾ El Al se acumula en los ápices de las raíces, incluyendo la caliptra y las zonas meristemáticas y de elongación.⁽²⁰⁾ A partir de los estudios por tinción de raíces de trigo con hematoxilina se ha demostrado que el Al se acumula en epidermis y en las células de la corteza.⁽²⁰⁾ El Al se acumula en

las células de la capa externa de la raíz en los primeros 30 min y en las capas más internas después de las 18 h de tratamiento, pero en menor concentración.⁽²¹⁾ La acumulación de Al en la raíz sigue una relación lineal con respecto del tiempo de exposición al metal,⁽¹⁸⁾ entra al cilindro central o estela de la raíz y se mueve ascendentemente hasta las hojas.⁽⁸⁾

Efectos de la toxicidad por aluminio

El rango de procesos fisiológicos, celulares y moleculares en los que interfiere la toxicidad por Al es grande, lo cual deriva en una gran cantidad de síntomas en las plantas. La toxicidad por Al resulta de su interacción con el apoplasto (pared celular), membrana celular y el simplasto (citosol). Si bien algunos síntomas y respuestas son detectables en segundos o minutos después de su exposición al metal, otros son solamente discernibles a exposiciones prolongadas ya sean horas o días. Sin embargo, el principal efecto de la toxicidad por Al es la inhibición del crecimiento de la raíz, por lo que se ha utilizado como una medida de la toxicidad por este metal.

Esta inhibición se ha observado en muchas especies, por ejemplo, se ha encontrado

que plántulas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro*, inhiben la elongación de su raíz en presencia de 300 μM de AlCl_3 .⁽²²⁾ Además de la inhibición de la elongación de la raíz, se observan otros efectos visibles, las raíces son pequeñas y quebradizas, los ápices de éstas así como los ápices de las raíces laterales se hinchan y se tornan de color café, además hay un pobre o nulo desarrollo de los pelos radicales,⁽²³⁾ por lo que estos efectos provocan respuestas secundarias como lo son la inhibición de la toma de agua y de nutrientes.⁽²⁴⁾ El grado de toxicidad varía dependiendo de la especie de planta, las condiciones de crecimiento, la concentración de Al y la duración de la exposición al metal. En el Cuadro 1 se observan los efectos de la toxicidad por Al que se presentan a diferentes niveles en plantas superiores.

Cuadro 1

Posibles blancos de la toxicidad del aluminio en plantas superiores⁽⁸⁾

Toxicidad del aluminio (Al) en plantas superiores	
A nivel de tejidos	Evidencias (efectos)
Ápice de la raíz	Inhibición de la división celular de la raíz y la elongación de la zona de transición
Cofia o caliptra	Vacuolización de la cofia o caliptra
Pelos radicales	Reducción de los pelos radicales

continuación...

Toxicidad del aluminio (Al) en plantas superiores	
A nivel celular	
Pared celular	Incremento del contenido de peptina, hemicelulosa y celulosa en la pared celular
Membrana plasmática	Inhibición del transporte de cationes
Mitocondria	Inhibición de la actividad respiratoria
Citoesqueleto y microtúbulos	Reorganización del citoesqueleto
Simplasto	Acumulación del Al en el núcleo
Apoplasto	Acumulación de Al entre las células
A nivel molecular	
ADN	Disturbios en la replicación del ADN
ATP	Reducción de las funciones del ATP
GTP	Reducción de las funciones del GTP
Calmodulina	Reducción de las funciones de la calmodulina
Proteínas/enzimas	Impacto sobre las proteínas de membrana, ATPasa y NAD-cinasa.
Interacción con otros cationes y aniones inorgánicos	
Ca ²⁺	Interrupción de la ruta de señalización por Ca ²⁺
H ⁺	Alterna pH citosólico
ROS	Especies reactivas de oxígeno

Efecto benéfico del aluminio

Si bien hay muchos estudios relacionados con el papel tóxico del aluminio, hay reportes del papel benéfico de este elemento en algunas especies de plantas, suministrado a bajas concentraciones. Existen reportes donde el Al aumenta el crecimiento principalmente de plantas nativas o adaptadas a suelos ácidos como *Miscanthus sinensis* y *Melastoma malabathricum*, en esta última especie el Al aumenta la toma de P, ya que se observó una mayor concentración de P en hojas de plantas de *M. malabathricum* expuestas a Al, así como en las raíces, aunque el incremento del P en las raíces pudiera ser debido a la precipitación de Al-P sobre la superficie de la raíz y/o en el espacio libre de Donnan.^(3,25) En trigo, la presencia

de 100 µM de Al incrementó la extrusión de H⁺ y la polaridad de la membrana, lo cual podría estar relacionado con una mayor toma de nutrientes y con el incremento en el crecimiento.⁽²⁶⁾

En algunos informes se ha reportado un aumento de la biomasa de las raíces de especies arbóreas después de ser tratadas con Al y esto se ha relacionado con un alivio de la toxicidad por H⁺ por cationes polivalentes como el Al³⁺.^(27,28) Este mecanismo se ha demostrado en plantas como trigo, pepino, rábano japonés, guisante, etcétera.⁽²⁹⁾

En suspensiones celulares de té se ha observado que el tratamiento con Al provocó la activación del sistema antioxidante, sugiriéndose que el papel fundamental del Al en la promoción del crecimiento de las plantas de té está conectado con el sistema de barrido de ROS, lo que resulta en una mayor integridad de la membrana y una menor lignificación de la pared celular.⁽³⁰⁾

Por otra parte, *M. malabathricum* secreta mucílago para acumular Al en suelos con baja disponibilidad de este elemento y su acumulación incrementa el crecimiento de raíces y brotes de la planta. Posiblemente el Al acumulado en el mucílago de la raíz sea posteriormente absorbido en forma de un complejo con ácidos orgánicos y se demostró que el mucílago secretado por las capas más externas de la raíz presenta características físicas y químicas únicas que facilitan la toma de este metal.^(31,32,33)

También se ha considerado que una de las principales razones del incremento del crecimiento en *M. malabathricum* es la

reducción de la acumulación del Fe inducido por Al y se ha sugerido que el poco crecimiento en *M. malabathricum* en ausencia de Al sea por efecto del oxalato sintetizado en altas cantidades, ocasionando la formación de complejos con metales alcalinos, como el Ca y el Mg en la planta, resultando posiblemente en deficiencia de esos nutrientes.⁽³⁴⁾

Por otro lado, también se sugiere que el efecto benéfico sobre el crecimiento de la raíz y los cambios en la morfología de ésta posiblemente se deba a cambios en los niveles de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en las raíces, siendo el Al capaz de inducir directa o indirectamente la síntesis o el transporte de RCV, tales como el ácido indol acético, citocininas y giberelinas.⁽²⁹⁾

También se han reportado cambios morfológicos en presencia de Al como el engrosamiento, coloración blanca y una buena elongación de la raíces en *C. sinensis*, *Q. acutissima*, *C. camphora*, *E. viminalis*, *Q. serrata* y *M. malabathricum*.^(30,35)

Mecanismos de resistencia al aluminio

Las plantas, ante cualquier estrés al que se enfrenten, pueden presentar mecanismos de resistencia y tolerancia, lo cual ha sido observado como respuesta al estrés por Al. Las respuestas de las plantas frente a la toxicidad por Al varían considerablemente, dependiendo de la especie e incluso dependiendo de la variedad que se está estudiando.

Entre los mecanismos de resistencia se mencionan: la exclusión de moléculas de bajo peso molecular (como ácidos orgánicos) para la quelación del Al apoplástico, la modificación del pH rizosférico, la unión del Al a la pared celular, disminución de la

permeabilidad de la membrana a la penetración de Al, así como la unión del Al con el mucílago asociado al ápice de la raíz o tal vez el flujo del propio Al de las células de la raíz.^(15,36) Entre los mecanismos de tolerancia se mencionan la quelación del Al con moléculas orgánicas en el interior celular, su unión a proteínas en el citoplasma y su posterior compartimentalización en la vacuola u otros organelos.⁽¹⁵⁾ También se han reportado modificaciones del metabolismo que permiten la función celular normal en presencia de Al.⁽³⁶⁾

Se ha visto que los ácidos orgánicos (malato, citrato y oxalato) son moléculas que se unen al Al y que permiten la exclusión de este metal al formar complejos estables y menos tóxicos que la forma iónica. Entre algunas de las plantas que secretan aniones orgánicos se encuentran *T. aestivum*, *Z. mays*, *F. esculentum* M., *Cassia tora* L., *H. vulgare*, *L. bicolor*, *P. falcataria*, así como especies de eucalipto y abeto.⁽³⁷⁾ En la especie *E. camaldulensis*, con una alta resistencia a Al, se ha considerado que no solo la exclusión de ácidos orgánicos son claves en el mecanismo de resistencia de esta planta, ya que se ha reportado un compuesto (nuevo) unido a Al en raíces y éste podría tener un papel importante en la alta resistencia de la planta actuando como un mecanismo interno de detoxificación.⁽³⁸⁾

El mucílago de la raíz también juega un importante papel como mecanismo de resistencia a metales. Debido a que los azúcares en el mucílago contienen ácido urónico, los grupos carboxilo del ácido urónico pueden absorber cationes metálicos evitando que estén disponibles, como en *V. unguiculata*;⁽³⁹⁾ también se ha demostrado que la pectina del mucílago (peso molecular elevado) juega un papel importante en la inmovilización del Al, reduciendo su toma en el ápice de la raíz.⁽⁴⁰⁾

Otro de los mecanismos de resistencia y/o tolerancia al estrés del Al es su interacción con otros elementos. Se ha demostrado que el P puede prevenir el efecto tóxico debido a la directa precipitación de Al-P en la zona de incorporación del P.⁽⁴¹⁾ Su interacción con Ca puede evitar los efectos tóxicos de Al sobre el crecimiento de la raíz, la formación de raíces laterales y en el crecimiento de pelos radiculares en *Glycine max*.⁽⁴²⁾ En *T. aestivum* también se ha reportado que el Ca y Mg confieren protección contra la toxicidad por Al.⁽⁴³⁾ Con B se ha visto que el mecanismo de acción del B está relacionado con la reducción de los sitios de unión del Al a la pectina de la pared celular, así, evitando la acumulación del Al y algunas de las consecuencias de la toxicidad por este metal.⁽⁴⁴⁾ De igual forma, se menciona que el B puede prevenir el decremento de la actividad de la Rubisco y evitar la inhibición de la fotosíntesis.⁽⁴⁵⁾ El silicio también puede formar complejos y precipitar en el citoplasma con Zn, Cd y Al en forma de silicatos y ser posteriormente compartamentalizados en la vacuola.^(4,46,47) Sin embargo, hasta el momento estos mecanismos todavía no son completamente entendidos y principalmente son especulativos.

Chile habanero como modelo de estudio del aluminio

Aunque el chile habanero es originario de Sudamérica,⁽⁴⁸⁾ en México es muy conocido y es mayormente cultivado en las regiones de Yucatán, Campeche, Quintana Roo y Tabasco. En Yucatán, el chile habanero es parte importante de su identidad culinaria y de gran importancia como producto hortícola, lo cual ha derivado en una amplia serie de investigaciones utilizando como modelo esta planta, tanto en el área de la

investigación básica como aplicada, con el fin de tener un mayor conocimiento de su fisiología y la relación con su entorno, encausado a obtener un producto en el campo con alto valor de comercial.

Los suelos donde se cultiva el chile habanero en Yucatán son considerados de neutros a básicos, encontrándose pH que van de 7.5 a 8.5,⁽⁴⁹⁾ aunque en algunas suelos puede

encontrarse pH de 5.2 al sur del estado,⁽⁵⁰⁾ es considerada una planta que crece en condiciones alcalinas y se menciona que especies que crecen con un pH de suelo básico son más sensibles al efecto del aluminio.

Dentro del género *Capsicum*, se ha evaluado el efecto tóxico del aluminio en la microestructura de las raíces de *Capsicum annum* L., usando un sistema hidropónico de cultivo, empleando las técnicas de microscopía de luz y microscopía electrónica de barrido. Se observó en las raíces tratadas con aluminio un diámetro mayor, la reducción o ausencia de la cápside y grietas en la superficie. La longitud de la zona de elongación y meristemática se redujo.⁽⁶⁾

Se observaron alteraciones en la disposición, el tamaño y forma de las células en la región apical de la raíz. Las células en la zona de crecimiento presentan cambios en sus planos de división. Las células de precortez y la corteza primaria muestran necrosis o síntomas de la destrucción. Muchas células se caracterizaron por hipertrofia y vacuolización fuerte. En las vacuolas se observan numerosos cuerpos oscuros.⁽⁵¹⁾

Usando microscopía electrónica de transmisión (MET) se evaluaron los cambios en la estructura celular. Estos involucran reducción en el número de granos de almidón en leucoplastos de la cápside, formación de núcleos lobulados y reducción en el número de cisternas de los dictiosomas, así como daño en las membranas celulares. La hinchazón de las mitocondrias fue observada junto con una reducción en el número de crestas mitocondriales o la ruptura de la membrana de estas estructuras. En las vacuolas se observa la presencia de numerosos cuerpos oscuros de gran tamaño, probablemente la mayoría depósitos de aluminio. La pared celular, a menudo engrosada, fue ondulante o se observó la formación de dos paredes de corta

distancia.⁽⁵¹⁾ Estos resultados obtenidos demuestran la alta sensibilidad de *Capsicum annum* L. al estrés por aluminio.

Al comparar el efecto de aluminio en la elongación de la raíz primaria de plántulas de *Arabidopsis thaliana*, *Coffea arabica* L., y *Capsicum chinense* Jacq., utilizando como modelo cajas segmentadas con diferentes dosis de aluminio, se reportó en *Arabidopsis thaliana* una disminución de la longitud radical conforme aumenta la dosis de aluminio; en *Coffea arabica* L. se observó un aumento en la longitud radical de café a bajas concentraciones de aluminio, y en *Capsicum chinense* Jacq. no se observan diferencias en la longitud radical, incluso a concentraciones de 500 μM respecto del testigo, la cual ya es tóxica para muchas especies sensibles a aluminio, lo que resulta contradictorio con los resultados obtenidos en *Capsicum annum*⁽¹⁾ pero que hace interesante estudiar con mayor amplitud esta respuesta de las raíces del chile habanero a este elemento.

En México, un total de 13,128,300 ha dedicadas a la silvicultura, a la ganadería y a la agricultura, pueden ser afectadas en mayor o menor grado por la acidez del suelo;⁽⁵²⁾ éste es uno de los factores que limitan el desarrollo de las plantas en algunos suelos de los estados de Chiapas, Michoacán, Veracruz, Jalisco, Puebla y Tabasco,⁽⁷⁾ por lo tanto evaluar el efecto del aluminio en plantas de chile habanero generaría información que podría tener aplicación en otras regiones del país. Además, su rápida germinación y ciclo de vida relativamente corto le confieren ventajas respecto de otras especies de importancia comercial empleadas en estudios del efecto tóxico del aluminio, como el café.

Hidroponía como herramienta en la investigación

La hidroponía es una tecnología para desarrollar plantas en solución nutritiva (SN), con o sin el uso de un medio artificial (arena, grava, vermiculita, lana de roca, etcétera) para proveer soporte mecánico a la planta⁽⁵³⁾ y forma parte de los sistemas de producción llamados cultivos sin suelo, en donde el medio de crecimiento y/o soporte de la planta está constituido por sustancias con una tasa variable de aportes a la nutrición mineral de las plantas.⁽⁵⁴⁾

Sin embargo, en sus inicios se desarrolló en laboratorios y condiciones controladas con el fin de resolver problemas fundamentales relacionados con la nutrición y la fisiología de las plantas, lo cual permitió determinar una lista de elementos esenciales para el desarrollo de estos organismos,⁽⁵⁵⁾ muchos de esos resultados son la base para que actualmente la hidroponía sea una técnica ampliamente usada en el mundo para la producción de los cultivos más rentables. Sin embargo, aún sigue siendo una herramienta experimental, por ejemplo en el descubrimiento de nuevos elementos benéficos o esenciales para las plantas.

Se han desarrollado muchas formulaciones o soluciones nutritivas, considerando las proporciones y concentraciones de los elementos esenciales adecuados en las soluciones, así como sus propiedades físicas y químicas (acidez, alcalinidad y sus características osmóticas).⁽⁵⁵⁾ Sin embargo, una solución nutritiva no es superior a otra, ya que las plantas pueden adaptarse dentro de un rango a diferentes condiciones de nutrientes, así que el uso de alguna y las modificaciones que se le hagan dependerá del fin con que son utilizadas. La solución de Hoagland es ampliamente usada porque se considera adecuada para el crecimiento de

amplio rango de especies de plantas diferentes.⁽⁵⁶⁾ Sin embargo, al igual que otras soluciones nutritivas, son tomadas como base o como referencia para hacerles modificaciones según la pregunta que se desee resolver en alguna investigación, por ejemplo experimentos donde se pretenda evaluar la ausencia o presencia de algún elemento.

En general, los componentes de la solución nutritiva se caracterizan por su alta solubilidad, se deberán elegir por tanto las formas hidratadas de estas sales. Debe considerarse la cantidad de nitrógeno amoniacal, en función de la especie involucrada y su tolerancia a este elemento; además, otro aspecto a tener en cuenta es la relación potasio/nitrógeno (K/N) (2:1). El hierro debe aportarse quelatado para favorecer su absorción.⁽⁵⁴⁾

La composición de nutrientes cambia cuando son absorbidos por la planta, disminuyendo en la SN; la rapidez de estos cambios depende del índice del crecimiento de la planta y el volumen disponible para cada planta, además se presenta una alteración cualitativa ya que no todos los nutrientes son absorbidos a la misma magnitud. Esto ocasiona como efecto secundario un desbalance ácido-base (pH) de la SN. Por lo tanto, lo ideal es mantener la concentración de los nutrimentos en la solución nutritiva constante, pero como estos requerimientos cambian en cada etapa de desarrollo de la planta, para evitar una deficiencia de nutrientes, una estrategia es poner una cantidad suficiente de cada elemento esencial en la SN, en un rango adecuado de concentración total y con límites amplios de proporciones iónicas. Además, conforme crecen, las plantas también absorben agua o ésta es evaporada de la superficie de la solución, reduciendo los

niveles en el tanque, ocasionando también cambios en la concentración de la SN.⁽⁵⁵⁾

Por lo tanto, un adecuado suministro de nutrientes también involucra: 1) volumen de la solución en relación al número de plantas creciendo, el estado de crecimiento y el índice

de absorción de los nutrientes, y 2) frecuencia de los cambios de la solución. Además, debe tomarse en cuenta la tolerancia de las plantas a la acidez o alcalinidad, sus necesidades de aeración y su susceptibilidad a daños por excesivas concentraciones de elementos como boro, manganeso, cobre o zinc.⁽⁴⁴⁾

Soluciones nutritivas en el estudio del efecto de aluminio en plantas

Muchas investigaciones relacionadas con la resistencia y toxicidad al aluminio se han realizado en plántulas crecidas en SN.⁽⁵⁷⁾ Sin embargo, se requieren varias consideraciones al trabajar con aluminio debido a las complejas relaciones entre la química acuosa de Al y su fitotoxicidad.

Se debe considerar el pH de la SN, ya que se sabe que al añadir iones hidroxilo se aumenta el pH de la solución y esto generalmente disminuye la toxicidad de Al, lo cual puede deberse a la toxicidad diferencial de los productos de hidrólisis mononucleares o a la formación de complejos polinucleares no tóxicos hidroxil-Al o $\text{Al}(\text{OH})_3$ en fase sólida.⁽⁵⁸⁾ Sin embargo, se sabe que a un pH ácido, como ya se ha mencionado, aunque pueden estar presentes otras especies tóxicas mononucleares, la actividad de Al^{3+} es el mejor indicador del efecto del aluminio en las plantas.

Además, se requiere el uso de soluciones nutritivas diluidas para tratar de que todos los nutrimentos se encuentren disociados y para evitar problemas de acomplejamiento con el Al, ya que si bien se ha observado que las plántulas pueden crecer vigorosamente durante varios días solo en agua con aireación, suplementado solo con las sales de Ca, algunos estudios pueden requerir un medio de crecimiento más completo con el fin de mantener el crecimiento durante períodos más largos o para lograr otros

objetivos. Algunos iones adicionales de nutrientes, tales como NO_3^- , NH_4^+ , K^+ y Mg^{2+} , no causan polinucleación, aunque pueden causar el crecimiento inducido por los cambios de pH.⁽⁵⁹⁾ Las interacciones de Al^{3+} - SO_4^{2-} están bien caracterizadas así que los problemas por esta interacción pueden evitarse si se tiene cuidado con la suplementación de SO_4^{2-} a las soluciones.^(60,61) La mayoría de los iones de micronutrientes no interactúan con Al a pH ácidos y bajas concentraciones utilizadas. Sin embargo, algunos problemas se pueden encontrar con micronutrientes quelados (por ejemplo, Fe-citrato). El nutriente más común que puede causar complejos y polinucleación con Al^{3+} es el fosfato.⁽⁶²⁾

Por otra parte, las raíces pueden alcalinizar o acidificar su superficie y el medio adyacente, dependiendo las regiones de la raíz y la composición de solutos del medio.⁽⁵⁹⁾ Estos cambios de pH pueden tener efectos significativos de las especies de Al sobre la superficie celular, el potencial eléctrico de la superficie celular y la actividad de Al^{3+} en la superficie celular.⁽⁶³⁾ En consecuencia, algunos estudios de toxicidad por aluminio pueden requerir el uso de amortiguadores en el medio, de los cuales existen pocos reportados, como es el caso de homopiperazina (homopiperazine-N,N'-bis-2-[ethane-sulfonic acid]) y el succinato en periodos de tiempo corto.⁽⁶⁴⁾

Crecimiento radicular de chile habanero en presencia de aluminio bajo condiciones de hidroponía

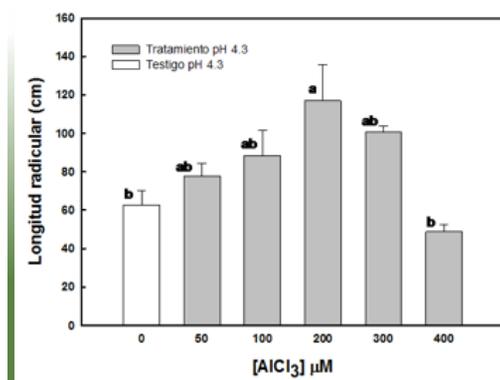
Para evaluar el efecto del aluminio sobre las raíces de plantas de chile habanero, se realizaron experimentos de dosis-respuesta a diferentes concentraciones de aluminio, utilizando la solución nutritiva Hoagland modificada a 1/5 de su fuerza iónica. Los experimentos se realizaron probando el amortiguador homopipes (homopiperazina-N,N'-bis-2-[ácido etanosulfónico]), durante un ciclo de cultivo determinado, buscando con su uso mantener el pH de la solución nutritiva con un valor de 5 o menos, ya que a dicho pH es cuando el Al^{3+} se encuentra disponible y causa su efecto tóxico en las plantas.

En dichos trabajos se observó que la SN aumenta su pH rápidamente cuando éste inicia con pH de 4.3 y que el uso del amortiguador homopipes puede ayudar a mantener el pH por debajo de un valor de 5 hasta por siete días, si se usan plántulas hasta de 28 DDG. Se observó que las raíces de *C. chinense* sometidas hasta concentraciones de 400 μM , no muestran una reducción en su longitud radicular respecto al control, con excepción de la concentración 200 μM , la cual muestra mayor crecimiento radicular respecto del control y a la concentración de 400 μM (Figura 2).

Para evaluar la deposición de Al en los tejidos de la raíz, se empleó la tinción con hematoxilina reportada por Polle *et al.*,⁽⁶⁵⁾ observándose que el Al se acumula en el ápice a medida que aumentamos la concentración de $AlCl_3$, sin embargo aun a 400 μM de aluminio no se observan daños en la morfología de las raíces y no se observa deposición en el cilindro central (Figura 3), por lo tanto, aunque se observa un aumento de la deposición de aluminio en las raíces evaluadas no se observa un efecto

en la inhibición radicular lo cual indica que *C. chinense* no es sensible a concentraciones hasta de 400 μM , sin embargo, se observa un aumento en la longitud radicular a 100 μM .

Figura 2



Longitud radicular en plántulas de *C. chinense* de 28 DDG, sometidas a estrés por aluminio, en solución nutritiva H1/5 amortiguada con homopipes 2 mM. Experimento dosis-respuesta de 14 días. Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

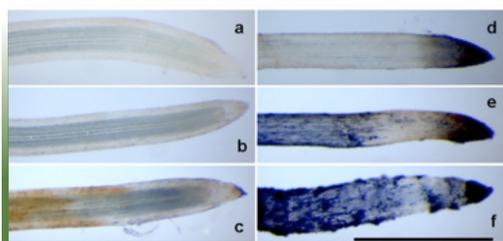
A 500 μM tampoco es posible encontrar diferencias respecto de concentraciones menores de $AlCl_3$ en plántulas de 35 DDG. Únicamente se observó que la concentración de 1000 μM tiene un efecto inhibitorio significativo en la longitud radicular (Figura 4).

Además, cuando se tiñeron las raíces con hematoxilina, se observó una ligera acumulación del metal en el ápice raíz con 100 μM de Al. En las raíces expuestas a 400 y 500 μM de $AlCl_3$ se observó la acumulación gradual de este metal en el ápice, a 1000 μM de $AlCl_3$ se observó la acumulación de dicho metal en todas las zonas de la raíz evaluada, observándose a dicha

concentración daño en la raíz (Figura 5). También se observó una reducción en el área foliar (Figura 6).

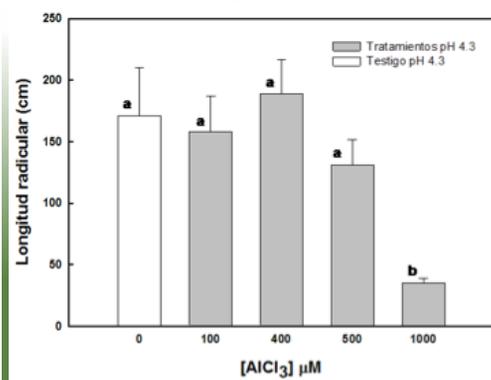
Bojórquez-Quintal, en 2010,⁽¹⁾ reporta que no se observan diferencias hasta una concentración de 500 μM en la elongación de las raíces primarias, en plántulas de *C. chinense* siete DDG, usando un modelo de cultivo *in vitro* de cajas segmentadas. En nuestro estudio, al evaluar plántulas de mayor edad, 28 DDG es posible observar un incremento a concentraciones menores de aluminio (100 μM).

Figura 3



Tinción con hematoxilina de raíces de *C. chinense* 28 DDG, expuestas a seis concentraciones de AlCl_3 , usando solución nutritiva H1/5 amortiguada con homopipes 2 mM. Donde, a) 0 μM b) 50 μM c) 100 μM d) 200 μM e) 300 μM y f) 400 μM de AlCl_3 , en un experimento dosis-respuesta de 14 días. La barra representa 1 mm.

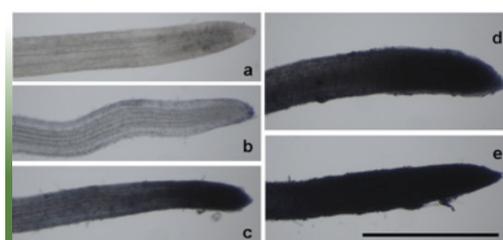
Figura 5



Longitud radicular en plántulas de *C. chinense* de 35 DDG, sometidas a estrés por aluminio, en solución nutritiva H1/5 amortiguada con homopipes 2 mM. Experimento dosis-respuesta de 14 días. Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

Estudios realizados en Solanáceas describen la disminución en la producción de la parte aérea en *Lycopersicon esculentum* en dosis crecientes de Al, pero se observa un aumento en la producción de brotes y raíces en *Capsicum annum* a bajas concentraciones de Al. Sin embargo, ellos reportan que *C. annum* es más sensible a H^+ que al aluminio, y que dicho aumento en el rendimiento es atribuible al posible alivio de la toxicidad de H^+ por el aluminio.⁽⁵⁷⁾ Este mecanismo de alivio de la toxicidad por H^+ , provocada por cationes polivalentes con el Al, ha sido demostrada en plantas como trigo, pepino, rábano japonés, guisante, etcétera.⁽²⁹⁾

Figura 4



Tinción con hematoxilina de raíces de *C. chinense* 35 DDG, expuestas a cinco concentraciones de AlCl_3 , usando solución nutritiva H1/5 amortiguada con homopipes 2 mM. Donde, a) 0 μM b) 100 μM c) 400 μM d) 500 μM y e) 1000 μM de AlCl_3 , en un experimento dosis-respuesta de 14 días. La barra representa 1 mm.

También se ha reportado en especies que crecen en condiciones de suelo ácido, el aumento del crecimiento radicular a bajas concentraciones de aluminio, lo cual se relaciona principalmente con la toma de nutrientes, ya que se reporta un aumento en la toma de K y N, así como un decremento en la toma de Ca y Mg por la aplicación de aluminio, siendo de especial interés el P, observándose que el Al aumenta la toma de P, encontrándose una mayor concentración de P en hoja y raíces de plantas expuesta a aluminio, por ejemplo se observó un incremento en el crecimiento de la raíz de *Melastoma malabathricum* a 100 μM de

Figura 6



Efecto de 1000 μM de Al^{3+} sobre el área foliar y radicular en plantas de *C. chinense* 35 DDG, usando solución nutritiva H1/5 amortiguada con homopipes 2 mM, en un experimento dosis-respuesta de 14 días.

Al^{3+} .⁽³⁾ Dicho aumento de la concentración de P en las raíces puede deberse a la precipitación de P con Al sobre la superficie de la raíz o en el apoplasto de ésta y que de alguna forma las especies tengan la habilidad de utilizar ese P precipitado.⁽²⁹⁾

Se ha sugerido que en el efecto benéfico sobre el crecimiento de la raíz y cambios en la morfología de ésta, estén implicados cambios en los niveles de reguladores del crecimiento vegetal en las raíces, encontrándose

que el Al es capaz de inducir directa o indirectamente la síntesis o el transporte de los reguladores de crecimiento, como el ácido indolacético, citocininas y giberelinas.⁽²⁹⁾ Se ha reportado que la formación de nuevas raíces fue acelerada por el tratamiento con Al en *Quercus acutissima* y *Cinnamun camphora*, observándose que dichos resultados fueron correlativos con bajas concentraciones de AIA y un incremento en la concentración de citocininas en raíces tratadas con Al.⁽³⁵⁾

Conclusiones

Los experimentos con soluciones nutritivas muestran que las especies y variedades difieren en su sensibilidad, y que la concentración crítica para una planta dada varía dependiendo del pH de la solución, de la concentración de calcio y de la técnica experimental. Por tanto, no es posible dar valores exactos, pero los niveles críticos parecen variar desde aproximadamente 1 μM para plantas tolerantes al aluminio a alrededor de 1 μM para plantas sensibles.⁽⁶⁶⁾ Con fun-

damento en los resultados obtenidos bajo las condiciones de hidroponía mencionadas, se puede clasificar a esta especie, como una planta con tolerancia intermedia al aluminio.

Sin embargo, debe considerarse la dificultad de mantener el pH debido a las interacciones entre los componentes de la solución nutritiva y si todo el aluminio está en solución, ya que puede formar complejos con otros iones de la solución nutritiva, sobre todo el fosfato,

el cual comúnmente puede causar complejos y polinucleación con Al^{3+} ,⁽⁶²⁾ por lo que es recomendable, para corroborar el efecto de rizotoxicidad por aluminio específicamente,

realizar dichos experimentos en agua con aireación, suplementado solo con las sales de Ca, usando el amortiguador homopipes.

Referencias bibliográficas

- (1) Bojórquez-Quintal J.E.A. 2010. Efecto del Al sobre el crecimiento radical de plántulas de cafeto cultivadas in vitro. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México.
- (2) Kochian L.O., Hoekenga O.A. and Piñeros M.A. 2004. "How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency". *Annu Rev Plant Biol* 55:459-493.
- (3) Osaki M., Watabane T., Tadano T. 1997. "Beneficial effect of aluminium on growth of plants adapted to low pH". *Soils Sci. Plant Nutr.* 43(3):551-563.
- (4) Pilon-Smits E.A.H., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M., Schiavon M. 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology.* 12:267-274.
- (5) Tún-Dzul J.C. 2001. Chile Habanero. Características y Tecnología de producción. Sagarpa, INIFAP, Produce Yucatán, p. 74.
- (6) Konarska A. 2008a. "Toxic influence of aluminum on root microstructure of red pepper (*Capsicum annuum* L.)". *EJPAU.* 11(4):26. Disponible en: <http://www.ejpau.media.pl/volume11/issue4/art-26.html>.
- (7) Aguilar-Noh A. 1991. "La acidez y su fertilidad". En: *Memorias del Primer Seminario Sobre el Manejo de Suelos Tropicales en Chiapas*. Impreso por el CIES. pp. 40-45.
- (8) Pessaraki M. 2008. "Acid Soil and Aluminum Tolerance in Turfgrasses". In: *Handbook of Turfgrass Management and Physiology*, University of Arizona Tucson, Arizona, U.S.A., pp. 375-388.
- (9) Kidd P.S., Llugany M., Poschenrieder Ch., Gunsé B., Barceló J. 2001. "The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.)". *J. Exp. Bot.* 52:1339-1352.
- (10) Arnon D.I. and C.M. Johnson. 1942. "Influence of hydrogen ion concentration on the growth of higher plants under controlled conditions". *Plant Physiol.* 17:525-539.
- (11) Rengel Z. and W. Zhang. 2003. "Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium-toxicity syndrome". *New Phytol.* 159:295-314.
- (12) TerraGis. Soil Reaction pH. UNSW 2007. Disponible en: http://www.terragis.bees.unsw.edu.au/terraGIS_soil.
- (13) Foy C.D., Chaney R.L., White M.C. 1978. "The physiology of metal toxicity in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol.* 29:511-566.
- (14) Poschenrieder Ch., Massot N., Guevara P., Barceló J. 1992. "Aluminio: II. Mecanismos de toxicidad en hombre, animales y plantas". *Cir Far.* 313:27-42.
- (15) Garzón T. 2003. Estudio de la compartimentación celular en plantas modelo sometidas a estrés por aluminio, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

- (16) Roy A.K., Sharma A., Talukder G. 1988. "Some aspects of aluminum toxicity in plants". *Bot. Rev.* 54:145–178.
- (17) Taylor G.J. and S.M. Macfie. 1994. "Modeling the potential for boron amelioration of aluminum toxicity using the Weibull function". *Can. J. Bot.* 72:1187-1196.
- (18) Zhang G.C. and G.J. Taylor. 1990. "Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. Identity of the linear phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars". *Plant Physiol.* 94:577–584.
- (19) Yamamoto Y., Rikiishi S., Chang Y.C., Ono K., Kasai M., Matsumoto H. 1994. "Quantitative estimation of aluminium toxicity in cultured tobacco cells: Correlation between aluminium uptake and growth inhibition". *Plant Cell Physiol.* 35:575-583.
- (20) Sasaki M., Yamamoto Y., Ma J.F., Matsumoto H. 1997. "Early events induced by aluminium stress in elongation cells of wheat root". *Soil sci. Plant Nutr.* 43:1009-1014.
- (21) Lazoft D.B., Goldsmith J.G., Linton R.W. 1996. "The in situ analysis of intracellular aluminium in plants". *Prog. Botany* 58:112-149.
- (22) Illes P., Schlicht M., Pavlovkin J., Lichtscheidi I., Baluska F., Ovecka M. 2006. "Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminium into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric oxide production". *Journal of Experimental Botany* 57(15):4201-4213.
- (23) Kochian L.V., Piñeros M.A., Hoekenga O.A. 2005. "The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity". *Plant and Soil* 274:175–195.
- (24) Kochian L.V. 1995. "Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:237–260.
- (25) Yoshii Y. 1937. "Aluminium requirements of solfatara plants". *Bot. Mag.* 51:262-270.
- (26) Kinraide T.B. 1993. "Aluminum enhancement of plant growth in acid rooting media. A case of reciprocal alleviation of toxicity by two toxic cations". *Physiologia Plantarum* 88:619-625.
- (27) Thornton F.C., Schaedle M. Ryanal D.J. 1986. "Effect of aluminum on the growth of sugar maple in solution cultura". *Can. J. Forest Res.* 16:892-896.
- (28) _____ 1989. "Tolerance of red oak and American and European beech seedlings to aluminum". *J. Environ. Qual.* 18:541-545.
- (29) Tomioka R., Oda A., Takenaka C. 2005. "Root growth enhancement by rhizospheric aluminum treatment in *Quercus serrata* Thunb". Seedlings. *J. For Res.* 10:319-324.
- (30) Ghanati F., Morita A., Yokota H. 2005. "Effects of aluminium on the growth of tea plant and activation of antioxidant system". *Plant Soil* 276:133-141.
- (31) Watanabe T., Jansen S., Osaki M. 2005. "The beneficial effect of aluminium and the role of citrate in Al accumulation in *Melastoma malabathricum*". *New Phytol.* 165: 773-780.
- (32) Watanabe T., Misawa S., Hiradate S., Osaki M. 2008a. "Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminium accumulation". *New Phytol.* 178:581-589.
- (33) Watanabe T., Misawa S., Hiradate S., Osaki M. 2008b. "Root mucilage enhances aluminum accumulation in *Melastoma malabathricum*, an aluminum accumulator, Article Addendum". *Plant Signaling & Behavior* 3(8):603-605.

- ⁽³⁴⁾ Watanabe T. and M. Osaki. 2009. "Possible Reasons Why Aluminum is a Beneficial Element for *Melastoma malabathricum*, an Aluminum Accumulator". In: *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis*. Disponible en: <http://escholarship.org/uc/item/187933t1>.
- ⁽³⁵⁾ Oda A. 2003. Physiological and ecological study about effect of acid rain on forest. Effect of aluminum concentration on growth and endogenous growth regulatory substances of woody plant seedlings (in Japanese), Doctoral dissertation, The United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Tottori.
- ⁽³⁶⁾ Ligaba A., Katsuhara M., Ryan P.R., Shibusaka M., Matsumoto H. 2006. "The BnALMT1 and BnALMT2 genes from *Brassica napus* L. encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells". *Plant Physiol.* 142:1294–1303.
- ⁽³⁷⁾ Dong X.Y., Shen R.F., Chen R.F., Zhu Z.L., Ma J.F. 2008. "Secretion of malate and citrate from roots is related to high Al-resistance in *Lespedeza bicolor*". *Plant Soil* 306:139–147.
- ⁽³⁸⁾ Tahara K., Hashida K., Ohara S., Kojima K., Shinohara K. 2009. "Aluminum-de-toxifying compounds in roots of *Eucalyptus camaldulensis*". In: *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis*. Disponible en: <http://escholarship.org/uc/item/9k7244qb>.
- ⁽³⁹⁾ Horst W.J., Wagner A., Marshner H. 1982. "Mucilage protects root meristems from aluminium injury". *Z Pflanzenphysiol.* 105:435-444
- ⁽⁴⁰⁾ Xu M.M., Yu M., Wang C.Q., Zhang Y.H., Wang H.Z., Xiao H.D. 2009. "The binding of Al in different polysaccharides alleviates Al toxicity to root apices". In: *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI, Department of Plant Sciences, UC Davis*. Disponible en: <http://escholarship.org/uc/item/2s7331t5>.
- ⁽⁴¹⁾ Pierre W.H. and A.D. Stuart. 1933. "Soluble aluminum studies, IV. The effects of phosphorus in reducing the detrimental effects of soil acidity on plant growth". *Soil Sci.* 36:211-227.
- ⁽⁴²⁾ Brady D.J., Edwards D.G., Asher C.J., Blamey F.P.C. 1993. "Calcium amelioration of aluminium toxicity effects on root hair development in soybean [*Glycine max* (L.) Merr]". *New Phytologist* 123:531-538.
- ⁽⁴³⁾ Kinraide T.B. 1998. "Three mechanisms for the calcium alleviation of mineral toxicities". *Plant Physiol.* 118:513-520.
- ⁽⁴⁴⁾ Yu M., Shen R., Xiao H., Xu M., Wang H., Zeng Q., Bian J. 2009. "Boron alleviates aluminum toxicity in pea (*Pisum sativum*)". *Plant Soil* 314:87-98.
- ⁽⁴⁵⁾ Jiang H.X., Tang N., Zheng J.G., Chen L.S. 2009b. "Antagonistic actions of boron against inhibitory effects of aluminum toxicity on growth, CO₂ assimilation, ribulose-1,5-bis-phosphate carboxylase/oxygenase, and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of *Citrus grandis* seedlings". *BMC Plant Biology* 9:102.
- ⁽⁴⁶⁾ Currie H.A. and C.C. Perry. 2007. "Silica in Plants: Biological, Biochemical and Chemical Studies". *Ann Bot.* 100:1383-1389.
- ⁽⁴⁷⁾ Cunha K.P.V. and C.W.A. do Nascimento. 2009. "Silicon effects on metal tolerance and structural changes in maize (*Zea mays* L.) grown on a cadmium and zinc enriched soil". *Water Air Soil Poll.* 197:323-330.
- ⁽⁴⁸⁾ Laborde C. and Q. Pozo. 1982. *Presente y pasado del chile en México*. SARH-INIA. México, D.F., pp. 79.

- ⁽⁴⁹⁾ Ramírez G., Góngora S., Pérez L., Chel L., González T., Tun J., Escalante E., Rodríguez L., Ledon J., Castillo J., López H. 2005. *Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero. Caracterización del medio físico para el cultivo de chile habanero en el estado de Yucatán*. INIFAP-Sagarpa, Campo Agrícola Experimental Mocochoá, Yucatán, México.
- ⁽⁵⁰⁾ Borges-Gómez L., Soria-Fregoso M., Casanova-Villarreal V., Villanueva-Cohuo E., Pereyda-Pérez G. 2008. "Correlación y calibración del análisis de fósforo en suelos de Yucatán, México, para el cultivo del chile habanero". *Agrociencia* 42:21-27.
- ⁽⁵¹⁾ Konarska A. 2008b. "Changes in the ultrastructure of *Capsicum annuum* L. seedlings roots under aluminum stress conditions". *Acta Agrobotánica* 16(1):27-32.
- ⁽⁵²⁾ López W., González D., Casas E. 1994. "Socioeconomic aspects of acid soil management: the case of southeast Mexico". En: *Memorias del 15th World Congress of Soil Science*. Impreso por el INEGI y el CNA, México, pp. 520-535.
- ⁽⁵³⁾ Lara-Herrera A. 1999. "Nutrient Solution Management in the Hydroponic Production of Tomato". *Terra*. 17(3):221-229.
- ⁽⁵⁴⁾ Carrasco G. and J. Izquierdo. 1996. Manual técnico: La Empresa Hidropónica de Mediana Escala, La técnica de la solución Nutritiva Recirculante (NFT), FAO-ONU. Oficina Regional para América Latina y el Caribe; Universidad de Talca, Chile. Disponible en: http://www4.fao.org/faobib_sp/index.html.
- ⁽⁵⁵⁾ Hoagland D.R. and D.I. Arnon. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station, University of California, Berkeley, Circular 347, p. 1-32.
- ⁽⁵⁶⁾ Smith G.S., Johnston C.M., Smith I.S. 1983. "Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture". *New Phytol.* 94:537-548.
- ⁽⁵⁷⁾ Wheeler D.M., Edmeades D.C., Chrishe R.A., Gardner R. 1992. "Effects of aluminum on growth of 34 species: A summary of results obtained in low ionic strength solution culture". *Plant and Soil* 146:61-66.
- ⁽⁵⁸⁾ Parker D., Zelazny L.W., Kinraide T.B. 1988. "Aluminum Speciation and Phytotoxicity in Dilute Hydroxy-Aluminum Solutions". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52:438-444.
- ⁽⁵⁹⁾ Marschner H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. 2nd Edition, Academic Press, New York, pp. 889.
- ⁽⁶⁰⁾ Kinraide T.B. 1997. "Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate and fluoride complexes of aluminium". *J. Exp. Bot.* 48:1115-1124.
- ⁽⁶¹⁾ Nordstrom D.K. 1982. The effect of sulfate aluminum on aluminum concentration in natural water: some stability relations in the system Al₂O₃-SO₃-H₂O at 298 K. *Geochim. Cosmochim. Acta* 46:681-692.
- ⁽⁶²⁾ Lindsay W. 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley, New York.
- ⁽⁶³⁾ Kinraide T.B., Yemiyahu U., Rytwo G. 1998. "Computation of surface electrical potential of plant cell membranes. Correspondence to published zeta potentials from diverse plant sources". *Plant Physiol.* 118:505-512.
- ⁽⁶⁴⁾ Kinraide T.B. and B.K. Sweeney. 2001. "Buffered, phosphate-containing media suitable for aluminum toxicity studies". *Plant and Soil* 235:75-83.
- ⁽⁶⁵⁾ Polle E., Konzak C.F., Kittrick J.A. 1978. "Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots". *Crop Sci.* 18:823-827
- ⁽⁶⁶⁾ Russell E.W. and A. Wild. 1992. *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Rusel*. Ediciones Mundi-Prensa Libros, Madrid, España. pp. 909.





Aislamiento de hongos y bacterias a partir de plantas de chile habanero cultivadas en distintos municipios del estado de Yucatán

Capítulo 13

Fernando Moguel-Salazar, Miguel A. Carballo-Bautista,
Ligia G. Brito-Argáez, Carmela Alcocer Álvarez, Ignacio R. Islas-Flores*

*Autor responsable: islasign@cicy.mx



Resumen

En Yucatán, el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una de las actividades agropecuarias que soporta la economía de un número importante de pequeños productores. No obstante, este cultivo es atacado por microorganismos fitopatógenos que abaten el rendimiento. Conocer a los microorganismos que se asocian a las plantas de chile habanero podría ayudar a mejorar las prácticas fitosanitarias que en Yucatán se aplican a este cultivo. En este estudio se describe el aislamiento de hongos y bacterias a partir de chile habanero colectado en diferentes municipios de Yucatán. Los hongos se identificaron por medio de claves taxonómicas y las bacterias por pruebas bioquímicas. Varias de las bacterias presentes en las plantas de chile pudieran provenir de las aguas subterráneas utilizadas para riego de las plantaciones, dado que el agua frecuentemente está contaminada con coliformes, provenientes del fecalismo al aire libre o de la descarga de las letrinas al subsuelo.

Palabras clave

Chile habanero, hongos fitopatógenos, bacterias fitopatógenas, identificación bioquímica, identificación taxonómica

Introducción

Las enfermedades causadas por microorganismos (hongos y bacterias) son de importancia fundamental en chile (*Capsicum* sp.), dado que en condiciones climáticas favorables, pueden reducir la producción de fruto por arriba del 50%. En Yucatán, se cultiva el chile dulce (*Capsicum annuum*), el chile Xcatik (*Capsicum* sp.) y el tradicional chile habanero (*Capsicum chinense*) y todos ellos son afectados por enfermedades virales y enfermedades de tipo fúngico o bacteriano. En las plantaciones de chile o en la siembra de traspatio, la práctica más común es eliminar las plantas sintomáticas apenas se detectan las primeras señales de enfermedad,

además de que en los grandes plantíos de inmediato se aplican bactericidas o fungicidas. Esta práctica es una limitante que dificulta la realización de estudios sistemáticos tendientes a establecer la dinámica poblacional de los microorganismos, así como los factores que facilitan su dispersión a las áreas de producción y los que estimulan su infectividad *in situ*.

En el caso del chile habanero es común que las plantas cultivadas en condiciones de campo o en invernadero muestren amarillamiento o manchas necróticas en las hojas, síntomas que podrían indicar la presencia de enfermedades fúngicas o bacterianas.^(3,6) Sin embargo, debido a las prácticas culturales que se siguen con las plantas enfermas, en la mayoría de los casos su agente causal no ha sido descrito. Por lo anterior, en este trabajo se tuvo como objetivo realizar el aislamiento de microorganismos patógenos y saprófitos asociados a cultivos de *Capsicum chinense* establecidos en distintos municipios del estado de Yucatán. Se identificaron a los microorganismos más comunes que se asocian a las plantas de chile habanero y que pudieran ser dañinos o benéficos para esta especie. Para ello se colectaron hojas, frutos y plántulas de cultivares criollos de chile habanero a partir de plantaciones de esta especie que estaban ubicadas en la zona Lunche-Cuzamá, Ticul, Kini-Motul, Tekat y Chixchulub Pueblo.

Resultados

Los materiales de chile habanero que mostraban manchas necróticas o pudriciones fueron colectados y colocados individualmente en el interior de bolsas de plástico de sello hermético, transportados al laboratorio e inmediatamente procesados para el aislamiento de los microorganismos. En

el laboratorio, los materiales vegetales se sanitizaron por medio de lavados con H₂O estéril (1 min), inmersión en 70% etanol (2 min), incubación en 0.36% de cloro comercial (3 min) y enjuague con abundante H₂O estéril (2 min).

Aislamiento de bacterias

Los materiales sanitizados (frutos, hojas, tallos) fueron seccionados en pequeños fragmentos (~3 mm) y colocados en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo estéril para crecimiento de bacterias (8 g L⁻¹ de hidrolizado de caseína, 0.0358 g L⁻¹ MgSO₄, 2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 10 g L⁻¹ glucosa, 4 g L⁻¹ extracto de levadura).

El medio de cultivo se incubó a 32 °C con agitación (10.62X10⁻² x g durante 24 h; concluida la incubación una alícuota de la

suspensión se inoculó en el medio de cultivo YDC (10 g L⁻¹ extracto de levadura, 20 g L⁻¹ glucosa, 20 g L⁻¹ CaCO₃, 15 g L⁻¹ agar) en el medio MS (20 g L⁻¹ agar, 10 g L⁻¹ manitol, 3 g L⁻¹ L-asparagina, 2 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0.5 g L⁻¹ ácido nicotínico, 0.2 g L⁻¹ ácido nitrilotriacético, 4.0 mg L⁻¹ azul de bromotimol, 10 mg L⁻¹ rojo neutro) o en el medio KB (20 g L⁻¹ peptona, 1.5 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1.5 g L⁻¹ MgSO₄, 15 mL L⁻¹ glicerol, 15 g L⁻¹ agar).

Los medios arriba descritos son selectivos para *Xanthomonas* sp., *Erwinia* sp. y *Pseudomonas* sp., respectivamente. Cuando se observó el desarrollo de las colonias se analizaron sus características morfológicas en cada uno de los medios de selección. La purificación de las bacterias se realizó por estría cruzada y dilución en solución isotónica (0.86% NaCl).^(7,11,12) Con cada una de

las cepas aisladas se realizaron pruebas de patogenicidad sobre plantas, hojas y frutos de chile habanero. Los aislados bacterianos puros se identificaron mediante un sistema automatizado Biomerieux 32E ID (bioMérieux) y pruebas fisiológicas y bioquímicas.^[6] Las cepas aisladas se crioconservaron a -196 °C en una mezcla de 40% glicerol y medio líquido Luria-Bertani.

Aislamiento de hongos

Para el aislamiento de los hongos los fragmentos de tejido, previamente sanitizados, fueron inoculados en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA) e incubados en oscuridad por 72 horas. Una vez desarrollado el micelio, los hongos fueron purificados por medio de la siembra de una hifa individual en medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y posteriormen-

te por la siembra de una espora individual en medio PDA. Las cepas puras fueron identificadas por medio de claves taxonómicas y ensayos de patogenicidad. Las cepas aisladas se crioconservaron a -196 °C en una solución de 40% glicerol y medio BSM o en 40% glicerol y medio líquido de Papa-Dextrosa (PDB), respectivamente.

Ensayos de patogenicidad

La patogenicidad de los aislados bacterianos se realizó sobre plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* SR1) y plantas de *Cap-sicum chinense* Jacq., de ocho semanas de edad. Se inocularon 1×10^8 unidades formadoras de colonia mL^{-1} (1×10^8 UFC mL^{-1}) en agua destilada estéril. La suspensión bacteriana (200 μL) se infiltró en la vena media utilizando una jeringa de insulina. La patogenicidad de los aislados fúngicos fue analizada colocando el inóculo (5 mm de medio PDA conteniendo micelio fúngico) en la superficie de hojas de chile habanero que previamente habían sido laceradas con un bisturí estéril. Las plantas inoculadas fueron introducidas en bolsas negras para jardinería e incubadas por 96 horas en invernadero ($75\% \pm 5\%$ de humedad relativa y 28 ± 3 °C). Al concluir el tratamiento las hojas fueron analizadas

para respuesta hipersensible, síntomas de licuefacción o autofagia.

Los hongos se cultivaron en medio PDA, donde mostraron diferentes características morfológicas. Con base en dichas características, así como sus estructuras reproductoras es que los hongos fueron identificados a nivel de género.

Parte de las características morfológicas de las bacterias cultivadas en el medio BSM fueron consideradas para su clasificación inicial, éstas incluyeron su forma de crecimiento, color, tamaño, borde, elevación, consistencia y luz reflejada y transmitida. Los microorganismos colectados se mantienen como cepas individuales a -80 °C.

De los diferentes aislados bacterianos almacenados a -80°C se tomaron 46 cepas al azar y se cultivaron individualmente en medio BSM durante 24 h a 28°C . Cada una de las cepas fue sometida a diferentes pruebas bioquímicas provistas en el paquete comercial automatizado Biomerieux 32E ID, con el fin de establecer su identidad.

Discusión

Los resultados del estudio muestran la presencia de una amplia diversidad de microorganismos asociados al cultivo de *C. chinense*. Parte de estos microorganismos se identificaron mediante pruebas bioquímicas con el sistema automatizado Biomerieux 32E ID, el resto aún permanecen sin identificar.

El contar con los aislados de los diferentes microorganismos es un avance en el aislamiento y caracterización de los microorganismos (patógenos y saprofitos) que están asociados al cultivo de chile habanero, porque este tipo de estudios no se habían realizado para el estado de Yucatán.

La mayoría de las plantaciones de *Capsicum chinense* establecidas a cielo abierto son atacadas por virus, los cuales pueden ocasionar pérdidas de hasta 100% de la producción.⁽³⁾ No obstante, poco se conoce acerca del efecto que en el cultivo de *Capsicum chinense* ejercen los microorganismos asociados.

En *Capsicum annum* se ha descrito que *Xanthomonas campestris* es la causante de la enfermedad conocida como mancha bacteriana. Se conoce que bajo condiciones favorables este patógeno puede ocasionar pérdidas considerables en la producción de chile,^(1,11) esto se debe a que varios de los patógenos de *Xanthomonas campestris* tienen

la identidad de algunos de los aislados fúngicos mostró que en las diferentes plantaciones, los más comunes son *Fusarium* sp y *Helminthosporium*, mientras que los más escasos fueron *Papulospora* sp., y *Cladospira* sp.

la capacidad para atacar un amplio rango de chiles; ya sean cultivos establecidos en campo o en invernadero.^(7,12)

En el caso de los hongos es bien conocido su efecto deletéreo en la producción de chile, particularmente de *Fusarium* sp y *Alternaria* sp. Es por ello que es importante conocer el tipo de microorganismos asociados a los cultivos de chile habanero, en especial determinar aquellos que son potencialmente patógenos. Dicho conocimiento podría ser útil para implementar medidas sanitarias donde se apliquen agroquímicos con mayor selectividad.

La investigación en chile habanero, como en otras especies de importancia agronómica, es un requisito para obtener información y generar resultados para ayudar a mantener mejores condiciones de cultivo y de manejo. En el presente trabajo, como parte de la caracterización del tipo de microorganismos que están asociados a las plantaciones de chile habanero establecidas en Yucatán, se aislaron 97 cepas de bacterias y 55 cepas de hongos. Estos microorganismos constituyen la primera colección que se establece partir del chile habanero. El conocer el tipo de microorganismos que están presentes en las áreas de producción de las zonas muestreadas representa una ventaja, debido a que pueden seleccionarse mejores tratamientos fitosanitarios, si los microorganismos son

fitopatógenos. En cambio, si son benéficos, entonces se podría intentar favorecer la permanencia de los mismos a través de la disminución en la aplicación de agroquímicos. Aunque no se ha logrado la identificación de todos los microorganismos aislados, los resultados indicaron que una parte de los microorganismos asociados a los cultivos de *C. chinense* pueden ser resultado de la actividad humana realizada cerca de las áreas de cultivo. Por ejemplo, la detección positiva de bacterias enteropatógenas o coliformes puede ser consecuencia de que algunas plantaciones aún se riegan con agua de pozo poco profunda, probablemente contaminada. En Yucatán no existe drenaje por lo cual el uso de letrinas y el fecalismo al aire libre son eventos comunes.⁽⁸⁾

En lo que respecta a la capacidad de los microorganismos para desencadenar enfermedad, los aislados ChA11 y ChA14 indujeron una respuesta de hipersensibilidad en hojas de chile habanero, y pudrición en frutos de esta misma especie. Ambos aislados se identificaron como miembros del género *Pseudomonas* por medio de pruebas bioquímicas.

Dada la capacidad de las cepas ChA11 y ChA14 para generar la respuesta hipersensible en chile habanero, las mismas podrían ser utilizadas en el establecimiento de un modelo de interacción planta-patógeno, específico de chile habanero. También se podrían aislar genes relacionados a la patogénesis, ya que las dos cepas desencadenan una reacción de hipersensibilidad y, por consiguiente las plantas de chile habanero podrían estar expresando genes de resistencia. Dichos genes se podrían utilizar en programas orientados a la obtención de cultivos de interés agronómico, más tolerantes al ataque de patógenos.

Por otra parte, las cepas ChA11 y ChA14 identificadas como *Pseudomonas* sp. podrían ser utilizadas en programas de

biocontrol en chile habanero o en otras solanáceas. Su utilización en cantidades suficientes para inducir la respuesta hipersensible pero sin que dañe los tejidos de las plantas de manera extensa, permitiría iniciar el establecimiento de la respuesta sistémica adquirida (RSA), la cual genera una mejor protección a la planta ante el ataque de patógenos. Esta propuesta tiene sustento en el hecho de que *Pseudomonas fluorescens* aislada a partir de plantas de tomate, ha sido utilizada como biocontrol de *Pythium aphanidermatum*.⁽⁶⁾ Además, la cepa de *Pseudomonas fluorescens* (CECT5398), en combinación con otras dos bacterias, fue utilizada en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* que afectan los rendimientos de tomate y chile.⁽²⁾ Las plantas tratadas con esta combinación de bacterias mostraron un mejor crecimiento y productividad. Por el contrario, las poblaciones de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* disminuyeron en forma dramática. La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* GRC1, también ha mostrado su habilidad para actuar como organismo antagonista *in vitro* en *in vivo* contra *Sclerotinia sclerotiorum*, pues su aplicación en cultivos de cacahuate redujo de manera importante la población de dicho patógeno.⁽⁴⁾

En el caso de los hongos algunos de éstos son patógenos de plantas, tal es el caso de *Alternaria solani*, un patógeno importante de las solanáceas, y *Fusarium*, un patógeno de diversas familias de plantas. Algunos otros hongos se comportan como saprófitos, solo degradan la materia muerta. Por supuesto, los más interesantes son los hongos patógenos porque los mismos ocasionan pérdidas importantes en la producción de fruto.

Conclusiones

Se aislaron diversos microorganismos asociados a cultivares de chile habanero localizadas en diferentes municipios del estado de Yucatán.

Por medio del paquete Bioumerieux 32E ID se identificaron 46 cepas bacterianas aisladas de las plantaciones de Kini-Motul, Lunche-Cuzamá, Chixchulub Pueblo, Tekat y Ticul.

De los microorganismos aislados, las cepas denominadas ChA11 y ChA14 desencadenaron una reacción de hipersensibilidad en *Capsicum chinense* en condiciones *in vitro* y en invernadero. La identificación bioquímica mostró que ambos aislados pertenecen al género *Pseudomonas*.

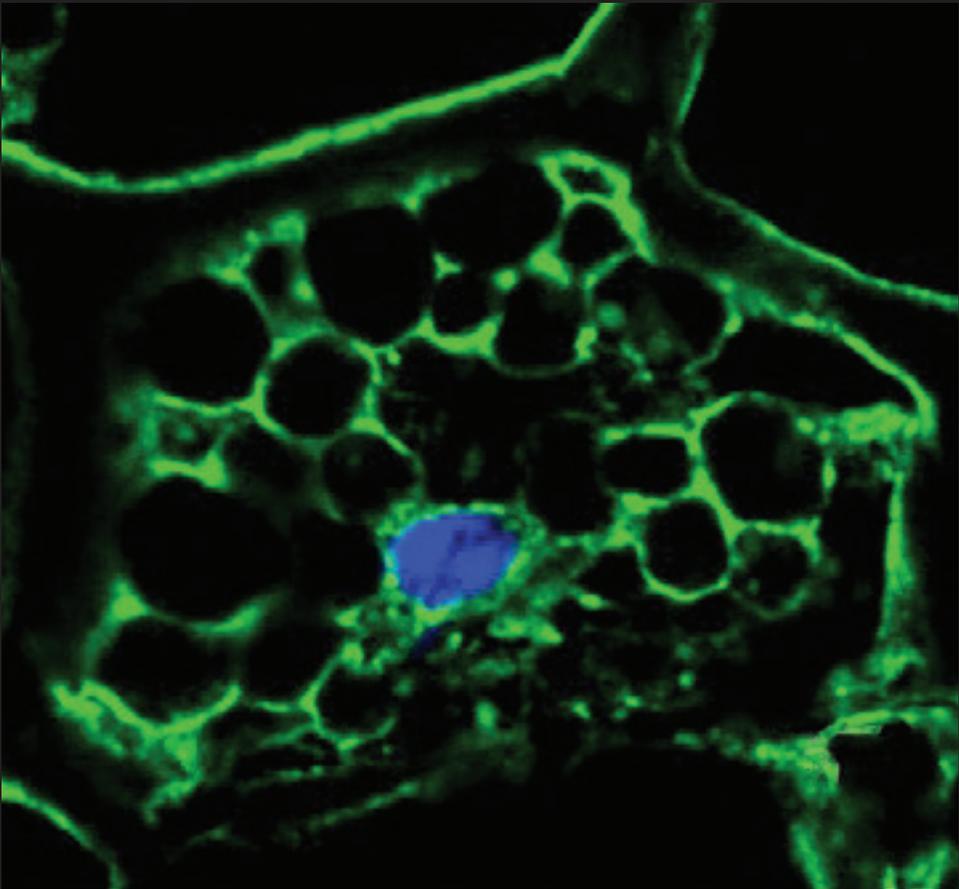
Agradecimientos

Al ingeniero Eleazar Xool por facilitarnos los muestreos en la Sociedad de Producción Rural Hortilatlino. A la Sociedad de Producción Rural Lunche-Cuzamá por permitirnos muestrear sus plantaciones de chile habanero. A la Fundación Produce Yucatán A.C. por el financiamiento al proyecto Núm. 0203.

Referencias bibliográficas

- (1) Biles C.L., Bruton B.D., Wall M.M., and Rivas M. 1995. "Phytophthora capsici zoospores infection of pepper fruit in various physical environments". *Proc. Okia Acad. Sci.* 75: 1-5.
- (2) Domenech J., Reddy M.S., Klopper J.W., Ramos B., Gutiérrez-Mañero J. 2006. "Combined application of the biological product LS213 with Bacillus, Pseudomonas or Chryseobacterium for growth promotion and biological control of soil-borne disease in pepper and tomato". *BioControl*, 51: 245-258.
- (3) Dzib Echeverría R., Ramírez Jaramillo G., Islas-Flores R., Leyva Morales C. 2005. "Caracterización de la cadena agroindustrial chile habanero y relevancia de las demandas tecnológicas (Capítulo III)", en: *Sistema producto chile. Estudio estratégico de la cadena agroindustrial chile habanero*. Pp. 169, Mérida, Yucatán.
- (4) Gupta C.P., Kumar B., Dubey R.C., Maheshwari D.K. 2006. "Chitinase-mediated destructive antagonist potential of Pseudomonas aeruginosa GRC, against Sclerotinia sclerotiorum causing stem rot of peanut". *BioControl* 51: 821-835.
- (5) Jayaraj J., Parthasaranthi T., Radhakrishnan N.V. 2007. "Characterization of a Pseudomonas fluorescens strains from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off". *BioControl* 52: 683-702.
- (6) Moguel-Salazar F., Quijano-Ramayo A., Keb-Llanes M., Moreno-Valenzuela O., Islas-Flores I. 2007. "Isolation of Pseudomonas spp from diseased Capsicum chinense (Habanero pepper) plants in Yucatan Mexico". *J. Phytopathol.* 155: 470-474.

- (7) Perezny K. and Collins J. 1997. "Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* on pepper relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays". *Plant Dis.* 61(7): 791-794.
- (8) Quiroz Carranza J. y Cantú Gutiérrez C. 2011. "Tradición, modernidad y sociedad civil en la costa de Yucatán". *Acta Universitaria* 21(1): 45-54.
- (9) Rajkumar M., Wang Hyu Lee and Kui Jae Lee. 2006. "Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper". *J. Basic Microbiol.* 45 (1): 55-63.
- (10) Ramamoorthy V., Raguchander T. and Samiyappan R. 2002. "Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Phytophthora* disease by seed treatment with fluorescent *Pseudomonads*". *Eur. Jour. Plant Pathol.* 108: 429-441.
- (11) Sahin F. and Millar S.A. 1998. "Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* pepper race 6". *Plant Dis.* 82(7): 794-799.
- (12) Sahin F., Abbasi P.A., Lewis M.L., Zhang J. and Miller S.A. 2003. "Diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv *vitians* from lettuce". *Phytopathol. Bacteriol.* 93 (2): 64-70.



Proteínas antimicrobianas, una bioprospección en chile habanero y generación de herramientas bioquímicas para su estudio

Capítulo 14

Fernando Moguel-Salazar, Ligia Brito-Argáez,
Javier García-Villalobos, Mayra A. Díaz-Brito,
Georgina Arzápalo-Castañeda, Ignacio Islas-Flores*
*Autor responsable: islasign@cicy.mx



Resumen

La bioprospección de frutos, plántulas y semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) mostró que la semilla es una fuente de péptidos antimicrobianos. El extracto soluble de semilla tiene actividad antimicrobiana contra *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Erwinia carotovora*. El fraccionamiento del extracto soluble por cromatografía en columna rindió dos fracciones peptídicas denominadas G10P1 y G10P2. La fracción G10P1 contuvo dos polipéptidos mayoritarios de 5.6 y 7.57 kDa y mostró la mayor actividad antimicrobiana en ensayos *in vitro*. Un anticuerpo policlonal generado contra G10P1 reconoció al polipéptido de 7.57 kDa y mostró que éste se produce y acumula exclusivamente en las semillas de *C. chinense*. El anticuerpo policlonal es la primera herramienta específica que se genera para estudiar a G10P1. Dado que la actividad antimicrobiana de la fracción G10P1 es contra bacterias fitopatógenas, se sugiere que las semillas de chile habanero podrían ser la fuente de agentes antimicrobianos de interés agrícola.

Palabras clave

Péptidos antimicrobianos, biocidas naturales, *Capsicum chinense* Jacq., semillas

Introducción

En animales y plantas existen proteínas que son capaces de eliminar bacterias, hongos y otras clases de patógenos.^(8,10,16) Diversos trabajos proponen las proteínas antimicrobianas como agroquímicos potenciales, dada su capacidad para inactivar a los patógenos que atacan a las plantas de interés agrícola.^(1,7,14)

Dada la necesidad de encontrar o producir compuestos antimicrobianos con mejores propiedades microbicidas, así como con un menor efecto sobre la salud de los seres humanos, animales y el medio ambiente, se ha estado explorando la

posibilidad de que las proteínas antimicrobianas aisladas a partir de plantas puedan ser utilizadas en la protección de las plantas de interés agronómico u ornamental.^(9,13)

En *Capsicum annuum*, a partir de hojas y semillas se han aislado e identificado genes y proteínas con capacidad antimicrobiana.⁽¹⁷⁾ Dado el potencial que a nivel agroindustrial y farmacéutico representa la manipulación de estos genes o de sus productos, en este estudio se realizó una bioprospección con el fin de determinar si en *Capsicum chinense* existen proteínas con capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris*. Se analizaron extractos proteicos totales obtenidos del pericarpio, semillas y plántulas de *C. chinense*. Se eligieron dichos tejidos porque se ha descrito que en ellos se acumulan las proteínas con actividad microbiocida.^(3,17) Se determinó que las semillas de *C. chinense* contienen péptidos de bajo peso molecular los cuales poseen actividad antimicrobiana. En este trabajo se describe la purificación de una fracción antimicrobiana denominada G10P1 así como la generación de un anticuerpo policlonal contra dicha fracción, el reconocimiento específico de un polipéptido de 7.57 en la fracción G10P1 y la especificidad de la acumulación de dicho polipéptido. Además, se describe el efecto de la fracción G10P1 cuando en mezclas con *Erwinia carotovora* se infiltra sobre plantas de jitomate (*Solanum esculentum*), creciendo en condiciones de invernadero.

Resultados

Colecta de frutos, semillas y plántulas

Se colectaron frutos sazones y maduros de cultivares criollos de *Capsicum chinense*. Los frutos maduros se seleccionaron con base en su color naranja (Figura 1A), dado que el cambio de color verde a naranja es indicativo de madurez fisiológica y comercial.

Los frutos sazones fueron seleccionados con base en su tamaño y fueron frutos que tenían diámetros de 2-3 cm en la parte más ancha del pericarpio y de 4 a 5 cm de largo. Las plántulas fueron de ocho semanas de edad (Figura 1B), provenientes de semilla criolla del cultivo naranja. Las semillas (Figura 1C) se extrajeron de los frutos criollos de color naranja.

Extracción de proteínas

Cien gramos de tejido de pericarpio, semillas o plántulas de chile habanero, fueron desinfectados individualmente por sumersión en

250 mL de etanol 70% durante 2 minutos; a continuación se adicionaron 250 mL de hipoclorito de sodio comercial al 0.024% y se incubó por 5 minutos; cada uno de los tejidos se lavó con agua destilada estéril por 5 minutos; por último, se enjuagaron con agua destilada estéril por 5 minutos. Cada uno de los tejidos se homogenizó con amortiguador de extracción conteniendo Tris-HCl, pH 7.5, NaCl, leupeptina y β -mercaptoetanol. Cada uno de los extractos se filtró de manera individual por una doble capa de gasa; el filtrado se separó por centrifugación a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se denominó fracción soluble (FS). El precipitado se disolvió en 10 mL de amortiguador de extracción, adicionado con 0.1% de Tween 20 y se le denominó fracción membranal (FM). Se evaluó la actividad inhibitoria de las fracciones membranal (FM) y soluble (FS) sobre el crecimiento de *Xanthomonas campestris*, *P. aeruginosa* y *Erwinia carotovora*.

Figura 1
Diferentes tejidos de *Capsicum chinense*
utilizados para la extracción de proteína



Frutos (A); plántulas (B); semillas (C).

Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*

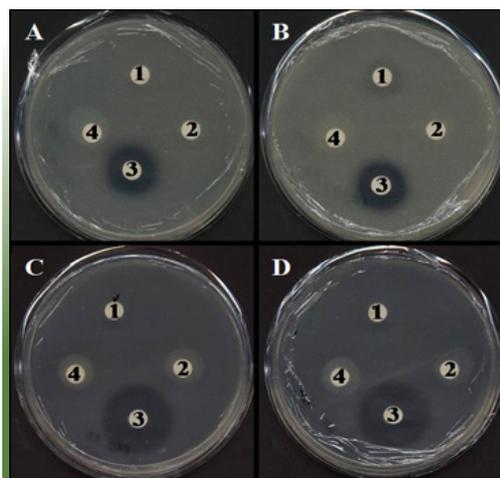
Para la determinación de la actividad antimicrobiana, una suspensión (1×10^8 UFC/mL) de *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* o *Pseudomonas aeruginosa*, fue mezclada en medio BSM (Sigma). Veinte mL del medio BSM conteniendo inóculo individual de cada una de las bacterias fue vertido en cajas Petri y se dejó solidificar.

Posteriormente, sobre el medio inoculado se colocaron cuatro discos de papel estéril (3MM, Whatman); a cada disco se le aplicaron extractos conteniendo 150 y 300 μg de proteína de los diferentes tejidos; cada extracto se analizó por separado. Las cajas Petri se incubaron a 32 °C; la inhibición del crecimiento se determinó a través de la formación de halos de inhibición. Como control se utilizó ampicilina (0.4 mg mL^{-1} , control positivo) y amortiguador de extracción (control negativo).^(5,12) Las fracciones soluble y membranal obtenidas del pericarpio de los frutos o de las plántulas no tuvo efecto sobre el crecimiento de *X. campestris* y *P. aeruginosa* (datos no mostrados).

En contraste, se observó que la proteína de semilla de ambas fracciones (soluble y membranal) inhibía levemente el crecimiento de *X. campestris* y *P. aeruginosa*; por facilidad de extracción y de manipulación se continuó

trabajando con la fracción soluble (Figura 2, paneles B y D, números 2 y 4).

Figura 2



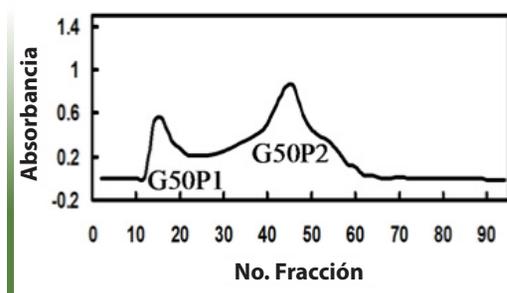
Efecto de la proteína de semilla de *C. chinense* sobre el crecimiento de *X. campestris* y *P. aeruginosa*. Extracto de proteína membranal (A y C) y soluble (B y D) sobre *X. campestris* (A y B) y *P. aeruginosa* (C y D). Amortiguador de extracción (1); 150 μg (4); 300 μg de proteína (2) y 0.4 mg mL^{-1} de ampicilina (3).

Purificación de polipéptidos

La purificación de la proteína contenida en la fracción soluble se realizó por cromatografía en columna utilizando resina Sephadex G50 y G10. Como eluyente se empleó Tris-HCl, pH 7.5 adicionado con NaCl. Un mL del extracto proteico ($750 \mu\text{g}$ de proteína/mL) se fraccionó

en una columna, conteniendo resina Sephadex G50. La columna fue eluída a 15 mL/h. Se colectaron fracciones de 750 μ L en tubos de ensayo. El monitoreo de la elución de la proteína a partir de las columnas se realizó a 280 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, ThermoSpectronic) (Figura 3). Las fracciones colectadas se liofilizaron y se resuspendieron en amortiguador de extracción. A la fracción resultante se le llamó G50P2. Para el segundo paso de purificación se utilizó una columna empacada con Sephadex G10.

Figura 3



Perfil de elución a 280 nm de la proteína soluble de chile habanero después de ser fraccionada por cromatografía en una columna empacada con resina Sephadex G50.

A esta nueva columna se le adicionó 1 mL del extracto G50P2. Las condiciones de fraccionamiento fueron iguales a las empleadas en la columna Sephadex G-50. A la fracción resultante se le llamó G10P1.

El ensayo de actividad antimicrobiana mostró que las fracciones G50P2 y G10P1 inhibían eficientemente el crecimiento de *X. campestris* y *P. aeruginosa* (datos no mostrados), por tal razón, por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida se analizó la composición de polipéptidos de cada una de las fracciones (Figura 4).

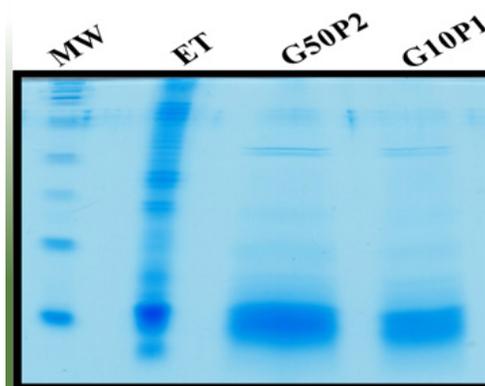
Electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Proteína (10 μ g), obtenida en el extracto total, la fracción G50P2 y en la fracción G10P1, fue sometida a electroforesis en geles de 15% de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 100 V por 4 horas. La tinción del gel con azul de Coomassie mostró que la fracción G10P1 contenía un par de péptidos con pesos moleculares de 7.57 y 5.6 kDa (Figura 4).

Dado que la fracción G10P1 seguía inhibiendo *in vitro* el crecimiento de las bacterias *X. campestris* y *P. aeruginosa*, se decidió utilizar la fracción para generar un anticuerpo policlonal contra la misma.

Figura 4

Análisis por electroforesis de las diferentes fracciones proteicas obtenidas de semillas de *Capsicum chinense*



Extracto total (ET); fracciones G50P2 (G50P2) y G10P1 (G10P1).

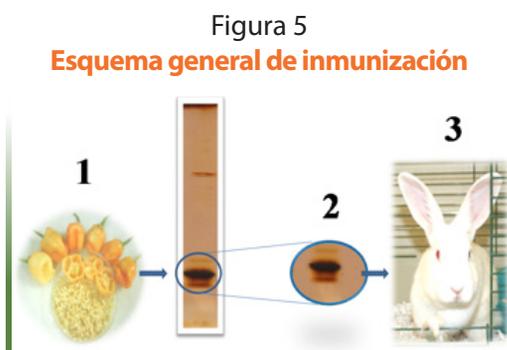
Generación de un anticuerpo policlonal contra G10P1

La generación del anticuerpo policlonal contra la fracción G10P1 se realizó en un conejo hembra, híbrido (Nueva Zelanda/Nuevo México), de 1 año de edad y un peso \sim 2 kg. El suero preinmune se obtuvo a partir de la sangre colectada (30 mL)

de una incisión realizada en la vena marginal de la oreja del conejo (cara externa). La sangre se dejó reposar a temperatura ambiente hasta que se formó un coágulo, enseguida se decantó el suero preinmune y se centrifugó a 1000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y separó en alícuotas de 500 μ L, las alícuotas se almacenaron a -20 $^{\circ}$ C hasta su utilización. La inmunización del conejo se realizó con 1 mL de adyuvante completo de Freund y 82.5 μ g de la fracción G10P1, la mezcla se inoculó en la zona subescapular; quince días después de la primera inoculación, se reinmunizó al conejo, con el fin de garantizar la producción de los anticuerpos policlonales.

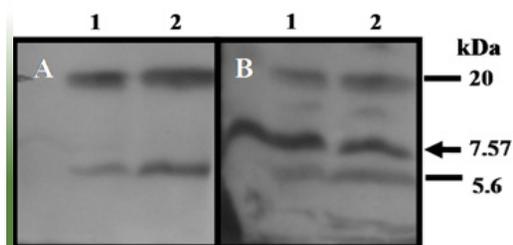
La reinmunización se realizó disolviendo la fracción G10P1 (82.5 μ g) en 1 mL de adyuvante incompleto de Freund e inoculando subcutáneamente. La colecta del suero inmune se realizó 30 días después de la primera inmunización.

El análisis por Western blot de la calidad del anticuerpo generado contra la fracción G10P1 mostró que el suero inmune reconoce al polipéptido de 7.57 kDa contenido en la fracción G10P1 (Figura 6, panel B, carriles 1 y 2).



Extracción de semillas (1); análisis por electroforesis de la fracción G10P1 y obtención del polipéptido de 7.57 kDa (2), inmunización de conejo (3).

Figura 6
Inmuno-reconocimiento del anticuerpo anti G10P1



Western blot con una dilución 1:500 del suero preinmune (A) o del suero inmune contra G10P1 (B). Proteína total (10 μ g) de semilla (1), o fracción G10P1 (2). El inmuno-reconocimiento se reveló con un anticuerpo secundario contra conejo (1:10,000) conjugado a peroxidasa de rábano. La flecha a la derecha indica el polipéptido reconocido por el suero inmune.

Determinación por Western blot del tejido donde se acumula el péptido de 7.57 kDa

Proteína (3 μ g) contenida en el extracto proteico de semillas, hoja, tallo, raíz y flor de *C. chinense* fue separada por electroforesis en geles disociantes de 15% de poliacrilamida. Posteriormente, el perfil proteico fue electrotransferido a membranas Hybond-PVDF, a 400 mA. Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada en amortiguador de fosfatos. Concluido el bloqueo, las membranas se lavaron con 30 mL de PBS y se inmunodetectaron en una dilución 1:500 del anticuerpo contra G10P1 en amortiguador de fosfatos. Las membranas se incubaron por 2 h., en una dilución 1:10000 de anticuerpo secundario contra conejo, acoplado a peroxidasa de rábano. La reacción de inmunodetección se reveló por quimioluminiscencia. Se observó que el anticuerpo contra G10P1 reconoce al polipéptido de 7.57 kDa solo en la fracción G50P2 (Figura 7, línea 1) y en la fracción de proteína total de semilla (Figura 7, línea 2), demostrándose de esta forma que la acumulación de este péptido ocurre únicamente en la semilla de *C. chinense*.

Una vez que se determinó que la fracción G10P1 mantenía su actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Xanthomonas campestris*, *P. aeruginosa* y *E. carotovora* (datos no mostrados), se continuó evaluando el

potencial de la fracción G10P1 para inhibir el crecimiento de *E. carotovora*, una vez que la bacteria se inocula en plantas de jitomate creciendo en condiciones de invernadero (Figuras 8, 9 y 10).

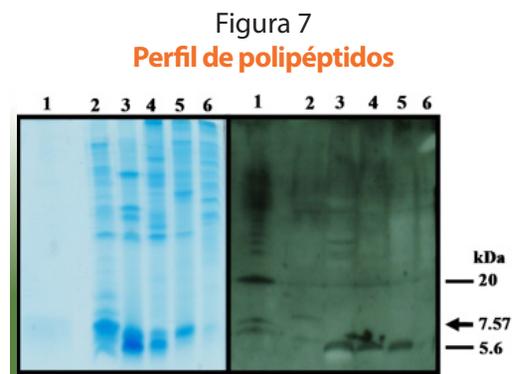


Figura 8
Aspecto visual de plántulas de jitomate



Las plántulas fueron mantenidas en condiciones de invernadero. Tallos (A) y hojas (B) de jitomate de 30 días de germinado.

Evaluación de la actividad contra *Erwinia carotovora* de la fracción G-10P1 en condiciones de invernadero

Germinación de semillas de jitomate

Semillas de jitomate (*Solanum esculentum*) de la variedad híbrida Maya, la cual no es tolerante a bacteriosis, fueron sembradas en una charola de germinación (1 semilla por cavidad) y germinadas bajo condiciones semicontroladas de temperatura (27 °C) y humedad relativa (57%) en una mezcla de sustrato estéril peatmoss-agrolita (2:1). Las plántulas que emergieron se transfirieron a vasos de plástico conteniendo agrolita estéril (Figura 8).

Infiltración de *Erwinia carotovora* en hojas y tallos de plántulas de jitomate

De un lote de 12 plántulas de jitomate establecidas en invernadero, tres plántulas

fueron infiltradas en tallo y tres en hojas con 1×10^8 UFC de *Erwinia Carotovora* (EC). Las restantes seis plántulas fueron infiltradas con 0.146 M de solución salina. Las plántulas de ambos lotes fueron selladas con bolsas transparentes de plástico a fin de mantener en los vasos la humedad relativa, superior a 60%. La evaluación visual del efecto del tratamiento se efectuó 48 horas después de la infiltración.

Se determinó que *E. carotovora* macera tanto las hojas como los tallos de las plántulas de jitomate donde se infiltra (Figura 9, paneles A y B). En contraste, las plántulas infiltradas con solución salina no mostraron síntomas de daño (Figura 9, paneles C y D).

Figura 9
**Aspecto visual en plántulas de jitomate
 48 horas después de la infiltración**



Las plántulas fueron revisadas 48 horas después de la infiltración con la 1×10^8 UFC/mL de *Erwinia carotovora* o 0.146 M de solución salina. Plántulas infiltradas con *E. carotovora* en hoja (A) o en tallo (B). Plántulas infiltradas con 0.146 M de solución salina (C, D).

Inoculación de plántulas de jitomate con *Erwinia carotovora* adicionadas con la fracción proteica G10P1

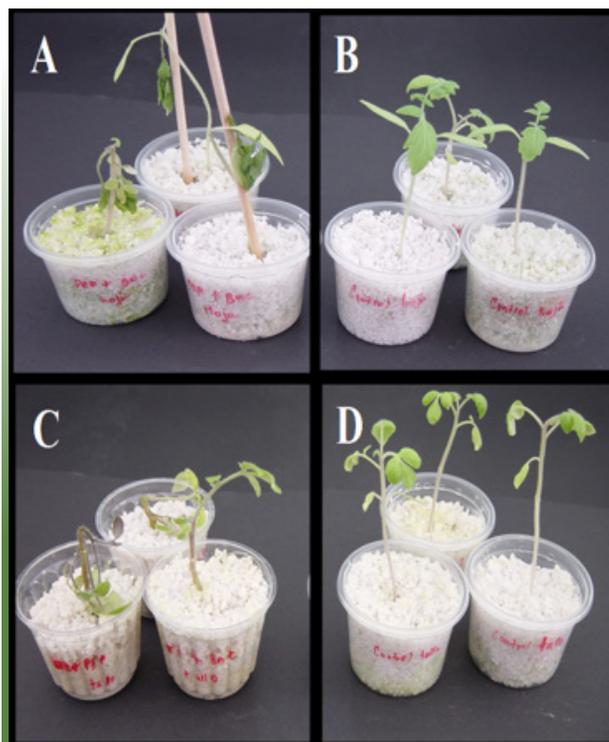
De un lote de 12 plántulas de jitomate establecidas en invernadero, tres se infiltraron en tallo y tres en hoja con 150 μ l de solución conteniendo 1×10^8 UFC de *Erwinia Carotovora* y 100 μ g de la fracción G10P1 (Figura 10 paneles A y C), o con 0.146 M de solución salina (Figura 10 paneles B y D).

Inoculación de plántulas de jitomate con *Erwinia carotovora* adicionadas con el bactericida Agrimicin 500

Un lote de seis plántulas establecidas en condiciones de invernadero fue infiltrado en

tallo (3) y hoja (3) con 150 μ l de solución 1×10^8 UFC de *Erwinia Carotovora* y 10 μ g/ μ l de agrimicin 500. Las plántulas de ambos lotes fueron selladas con bolsas transparentes de plástico con el fin de mantener en los vasos la humedad relativa superior al 60%. El bactericida agrícola es comercial y actualmente se vende con el nombre de Agrimicin 500, el cual cuenta con estreptomycin + oxytetracycline + cobre como sustancias activas. Se observó que después de 48 horas las plantas permanecen sin daños aparentes. Este hecho sugiere que el agrimicin es un buen bactericida. Este resultado era de esperarse dado que es uno de los bactericidas más empleados en campo para el combate de las infecciones bacterianas.

Figura 10
**Aspecto visual en plántulas de jitomate
 después de 48 horas de tratamiento**



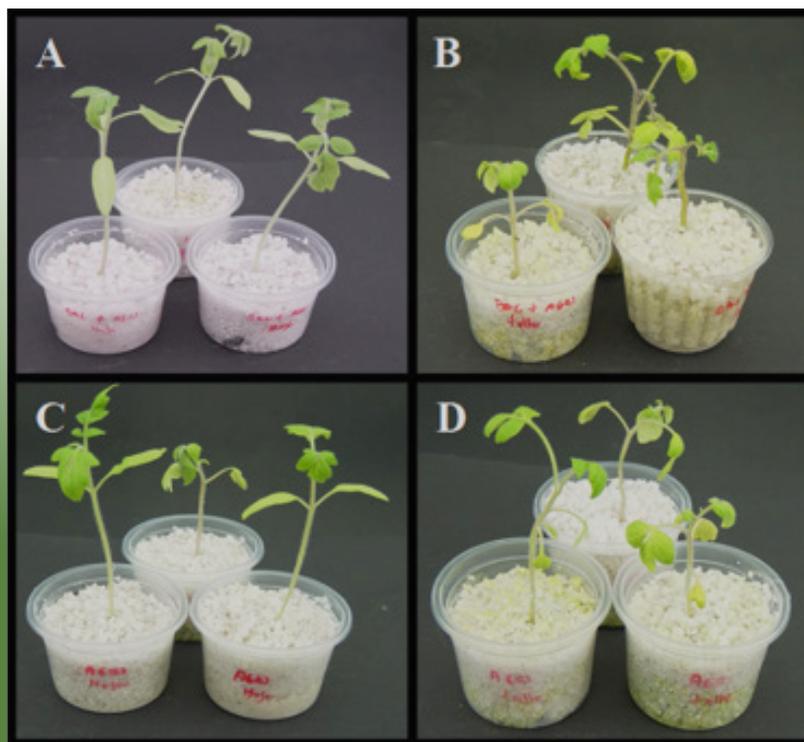
Aspecto visual en plántulas de jitomate después de 48 horas de tratamiento con la combinación de *Erwinia carotovora* y la fracción G10P1. Plántulas infiltradas en hoja (A), plántulas infiltradas en tallo (C). Plántulas control de cada tratamiento (B, D). Después de 48 h de la infiltración, se observó que las plantas que fueron infiltradas con la mezcla de *E. carotovora*-fracción G10P1 habían sufrido maceramiento tanto en hojas como en tallo. En contraste, las que habían sido infiltradas con solución salina no mostraban daño. El hecho de que la fracción G10P1 no fuera lo suficientemente potente para abatir el efecto de *E. carotovora* sobre las plantas de jitomate, de forma preliminar sugiere que esta fracción pudiera no ser una buena base en la búsqueda de un agroquímico natural.

Discusión

La adición de extractos de proteína total de fruto maduro de *C. chinense* a cultivos de las cepas de *X. campestris* y *P. aeruginosa*, no afectó el crecimiento *in vitro* de estos microorganismos, aun cuando se utilizaron 300 μg de proteína, cantidad que excede por mucho a las que han sido adicionadas en otros estudios. Duvick y colaboradores (1992) utilizaron 60 μg de la proteína MBP1 aislada de maíz, para inhibir completamen-

te el crecimiento de *Fusarium graminearum* y *Fusarium moniliforme*. Más aún, las proteínas aisladas de semillas de *Mirabilis jalapa*, denominadas Mj-AMP1 y mj-AMP2, evitan la elongación de las hifas de *F. sporotrichoides* y *F. culmorum* a concentraciones de 0.5 a 20 μg .⁽²⁾ En *C. annuum*, a partir de fruto maduro se aisló un gen que codifica para una defensina y otro que codifica una proteína denominada estelacianina, este último se

Figura 11
Aspecto visual en plántulas de jitomate
48 horas después de la infiltración



Aspecto visual de plántulas de tomate rojo 48 h después de haber sido infiltradas con una combinación de *E. carotovora* y agrimicin 500. Plántulas infiltradas en hoja con *E. carotovora*-agrimicin 500 (A), plántulas infiltradas en tallo con (*E. carotovora*-agrimicin 500 (B). Plántula control infiltradas en hojas (C) y tallos (D) con 146 mM de solución salina.

induce en presencia de *X. campestris*.^(11,12) El hecho de que en los extractos proteicos totales de los frutos no se detectó inhibición del crecimiento de los microorganismos analizados podría ser consecuencia de que los microorganismos utilizados en este estudio usan el extracto de fruto como un medio de crecimiento. En este sentido, en *C. annuum* se han aislado dos microorganismos identificados como *Variovorax paradoxus* y *Pseudomonas putida*, los cuales presentaron un aumento en su crecimiento cuando se añadió capsaicina al medio de cultivo de ambos.⁽⁶⁾ Por su parte, Cichewicz y Thorpe⁽³⁾ detectaron que extractos de diferentes tejidos de *Capsicum annuum* promovieron el crecimiento de algunas bacterias patógenicas de plantas y humanos.

Los extractos de plántulas inhibieron escasamente el crecimiento de *X. campestris*. Este no es un resultado raro dado en la naturaleza, en muchas ocasiones las plántulas de algunas semanas de edad ya cuentan con barreras físicas que dificultan su colonización y por ello ya no requieren sintetizar péptidos antimicrobianos. La fracción soluble de extractos de semilla produjeron una inhibición del crecimiento de *X. Campestris* y *P. aeruginosa* a dosis de 150 y 300 µg de proteína. Estos resultados sugieren que la fracción soluble contiene compuestos proteicos con capacidad de inhibición del crecimiento de dichos microorganismos.

Se ha descrito que en las semillas de *C. annuum* hay dos proteínas antimicrobianas que inhiben completamente el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*, y que causan una inhibición parcial sobre el crecimiento de *Candida albicans*. Una de esas proteínas tiene homología con las proteínas de transferencia de lípidos (LTP, de sus siglas en inglés Lipid Transfer Proteins); estas proteínas se encuentran en la pared celular vegetal y en los glioxisomas, en ambos casos implicadas en el metabolismo de lípidos. Adicionalmente, otras LTP aisladas de hojas de *Arabidopsis*, espinaca, cebada, maíz, semillas de rábano y girasol, han mostrado capacidad para inhibir a los patógenos *P. solanacearum*, *C. michiganensis*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride* y *Cercospora beticola*.⁽⁴⁾ Por tanto, era de esperar que los extractos de semillas de *C. chinense* contuvieron algún compuesto proteico con actividad antimicrobiana.

Estos resultados coinciden con varios reportes que describen el aislamiento de proteínas antimicrobianas a partir de hojas, flores, tallos y semillas.^(13,15) Además, Texeira y colaboradores⁽¹⁷⁾ aislaron proteínas catiónicas y aniónicas de extractos de pared celular de *C. Annuum*. Dichas proteínas tuvieron efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas solanacearum* y *Clavibacter michiganensis* sub. *michiganensis*.

La determinación de que la fracción denominada G10P1 mantenía la actividad antibacteriana y que solo contenía un par de polipéptidos de 7.57 y 5.6 kDa, permitió generar un anticuerpo policlonal contra la fracción G10P1. El anticuerpo permitió determinar que el polipéptido de 7.57 kDa se acumula únicamente en la fracción proteica de semilla, pero no en tallo, hoja, raíz, flor o fruto de *C. chinense*. El anticuerpo será una herramienta bioquímica que permitirá realizar diversos estudios de caracterización de la fracción G10P1.

La evaluación en condiciones de invernadero de la actividad antimicrobiana de la fracción G10P1 sobre plántulas de tomate rojo que fueron inoculadas con *Erwinia carotovora*; o con una combinación de *E. carotovora*-fracción G10P1 o con una mezcla de *E. carotovora*-Agrimicin 500 o con solución salina, permitió determinar que en dicha condición la fracción G10P1 no se inhibió la infectividad de *E. carotovora* sobre las plántulas del tomate rojo, dado que las plantas inoculadas con este microorganismo sufrieron maceramiento. Este hecho sugiere que aún se deben realizar experimentos tendientes a optimizar la actividad antimicrobiana de G10P1 cuando se trabaja en condiciones diferentes a las de *in vitro*. En contraste, mezclas de *E. carotovora*-Agrimicin 500 previnieron el maceramiento de las plántulas de tomate, mostrando con ello la efectividad del bactericida agrícola para inhibir la actividad infectiva de *E. carotovora*.

En resumen, los resultados anteriores muestran que las semillas de *C. chinense* contienen péptidos con actividad antimicrobiana. Una fracción denominada G10P1 se purificó en este estudio y en ensayos *in vitro* mostró su efectividad para inhibir el crecimiento de cepas de bacterias fitopatógenas de cultivos agronómicamente importantes. No obstante, cuando en invernadero se evaluó la capacidad de G10P1 para inhibir la infectividad de *Erwinia carotovora* sobre plantas de tomate no se encontró inhibición. La falta de actividad inhibitoria en invernadero no es indicativa de que la fracción G10P1 no sirve sino que sugiere que falta analizar en mayor detalle el comportamiento de esta fracción.

La generación del anticuerpo contra la fracción G10P1 es la primera herramienta específica con la cual se cuenta para realizar una mejor caracterización bioquímica y molecular de dicha fracción.

Conclusiones

Los mejores resultados *in vitro* de la inhibición del crecimiento de las diferentes bacterias fitopatógenas se obtuvieron con el extracto soluble de semillas ya que esta fracción redujo el crecimiento de las bacterias *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas aeruginosa*.

El fraccionamiento del extracto soluble por cromatografía en columna produjo dos fracciones denominadas G10P1 y G10P2; la fracción G10P1 fue la que *in vitro* mostró

una importante actividad antimicrobiana contra *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En condiciones de invernadero la propiedad antimicrobiana de la fracción G10P1 no fue suficiente para prevenir la infección de *Erwinia carotovora* sobre plantas de tomate rojo. La generación del anticuerpo policlonal contra la fracción G10P1 constituye la primera herramienta bioquímica específica que permitirá estudiar dicha fracción.

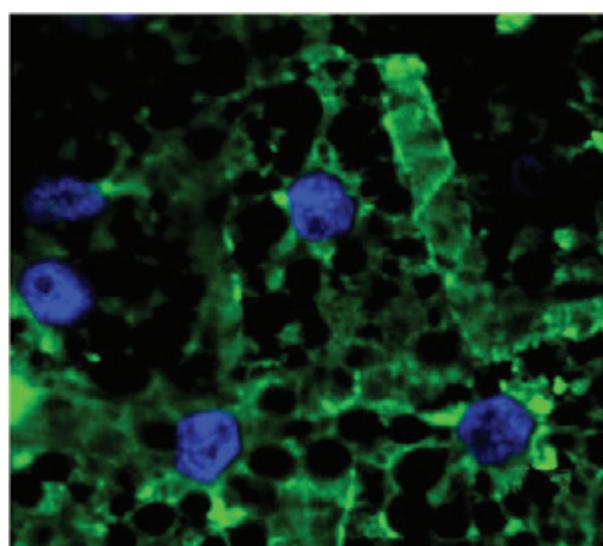
Agradecimientos

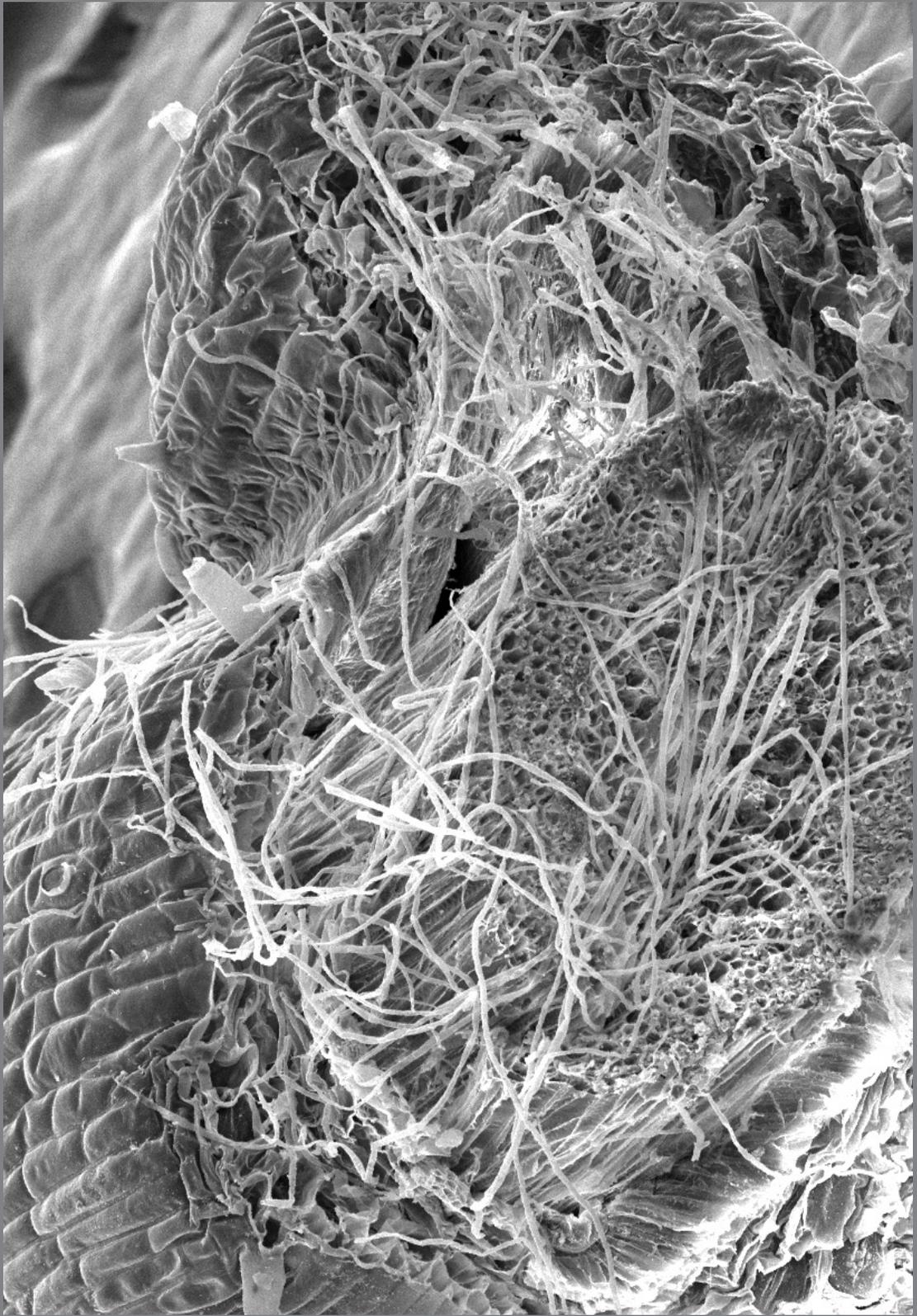
A la Fundación Produce Yucatán A.C. por el apoyo financiero al proyecto FPY 230/0641. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo Núm. 53956 para la formación integral de doctores.

Referencias bibliográficas

- (1) Brito-Argáez L., Moguel-Salazar F., Zamudio F., González-Estrada T., Islas-Flores I. 2009. "Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity". *Asian Journal of Biochemistry* 4(3): 77-87.
- (2) Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Terras F.R.G., Proost P., Van Damme Rees S.B., Vanderleyden J., Broekaert W.F. 1992. "Isolation and characterization of a class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds". *Jour Biol Chem* 267(4): 2228-2233.
- (3) Cichewicz R.H. and Thorpe P.A. 1996. "The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine". *J Ethnopharmacol* 52: 61-70.
- (4) Diz M.S.S., Carvalho A.O., Rodríguez R., Neves-Ferreira A.G.C., Da Cunha M., Alves E.W., Okorokova-Facanha A.L., Oliveira M.A., Perales J., Machado L.T., Gomes-Valdirenne M. 2006. "Antimicrobial peptides from chilli pepper sedes causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells". *Biochim Biophys Acta* 1760: 1323-1332.
- (5) Duvick J.P., Rood T., Rao G.R., Marshak D.R. 1992. "Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays* L.) kernels". *Jour Biol Chem* 267(26): 18814-18820.

- (6) Flagan S.F. and Leadbetter J.R. 2006. "Utilization of capsaicin and vanillylamine as growth substrates by *Capsicum* (hot pepper)- associated bacteria. *Environ. Microbiol* 8 (3): 560-565.
- (7) Grover A. and Gowthaman R. 2003. "Strategies for development of fungus-resistant transgenic plants". *Curr Sci* 84(3): 330-340.
- (8) Hancock R.E., Falla T. and Brown M. 1995. "Cationic bactericidal peptides". *Adv Microbiol Physiol* 37: 135-175.
- (9) Islas-Flores I., Minero-García Y., Andrew J.K. 2005. "Producción de péptidos o proteínas antimicrobianas en plantas". *Ciencia* 56(1) 64-74.
- (10) Kiba A., Nishira M., Nakatsuka T., Yamamura S. 2007. "Pathogenesis related protein 1 homologue is an antifungal protein in *Wasabia japonica* leaves and confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco". *Plant Biotechnol* 24: 247-235.
- (11) Kong Hye Y., Jung Ho W., Lee Sung C., Choi D., Hwang Byung K. 2002. "A gene encoding stellacyanin is induced in *Capsicum annuum* by pathogens, methyl jasmonate, abscisic acid, wounding, drought and salt stress". *Physiol Plant* 115: 550-562.
- (12) Meyer B., Houlne G., Pozueta R.J., Schantz M.L., Schantz R. 1996. "Fruit specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper". *Plant Physiol* 112: 615-622.
- (13) Regente M.C. and De la Canal L. 2000. "Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds". *Physiol Plant* 110: 158-163.
- (14) Saitoh H., Kiba A., Nishihara M., Yamamura S., Suzuki K., Terauchi R. 2001. "Production of antimicrobial defensin in *Nicotiana benthamiana* with potato virus X vector". *Mol Plant-Microbe Interact* 14(2): 111-115.
- (15) Spelbrink R.G., Dilmac N., Allen A., Smith T.J., Shan Dilip M., Hockerman G.H. 2004. "Differential antifungal and calcium channel-blocking activity among structurally related plant defensins". *Plant Physiol* 135: 2055-2067.
- (16) Stephens C., Harrison S.J., Kazan K., Smith T.J., Shan Dilip N., Hockerman G. 2005. "Altered fungal sensitivity to a plant antimicrobial peptide through over-expression of yeast cDNAs". *Curr. Genet.* 47: 194-201.
- (17) Texeira F.R., Lima M.C.O.P., Almeida H.O., Romero R.S., Silva D.J.H., Pereira P.R.G., Fontes E.P.R., Baracat-Pereira M.C. 2006. "Bioprospección of cationic and anionic antimicrobial peptides from bell pepper leaves for inhibition of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* spp michiganensis". *Growth J Phytopathol* 154: 418-421.





El papel de los reguladores del crecimiento vegetal en la defensa del chile habanero contra microorganismos patógenos

Capítulo 15

Rosalía Núñez Pastrana, Miguel David Marfil Santana,
Nallely Dolores Cocom Chan, Carlos Alberto Sánchez Borges,
Adolfo Alberto Guzmán Antonio, Ramón Armando Souza Perera,
José Juan Zúñiga Aguilar*
*Autor responsable: zuniga@cicy.mx



Resumen

El objetivo de este trabajo fue contribuir a determinar los efectos que tienen el etileno (ET), el ácido salicílico (SA) y el jasmonato de metilo (MeJA) durante la interacción de plántulas de chile habanero con *Phytophthora capsici* o *Fusarium oxysporum*. La estrategia experimental consistió en asperjar plántulas con alguno de los tres fitoreguladores y, posteriormente, inocularlas para evaluar la sintomatología que desarrollaban y analizar la expresión de un grupo de genes marcadores de estrés y de defensa de la planta. Los resultados mostraron que el tratamiento con etefón tuvo un efecto diferencial en la defensa de la planta dependiendo del microorganismo patógeno del que se tratara, que indujo un estado de resistencia contra *P. capsici* (sugiriéndose que la expresión del gen PR1 es importante para su establecimiento), y uno de susceptibilidad frente a *F. oxysporum*. Los tratamientos con SA y MeJA no indujeron respuestas de defensa en la planta contra *P. capsici*.

Palabras clave

Fusarium oxysporum, marchitez del chile, *Phytophthora capsici*, reguladores del crecimiento vegetal, resistencia sistémica

Introducción

Los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) son moléculas de señalización que a concentraciones bajas, en el rango de 10 a 100 ng/g, regulan diversos procesos fisiológicos en las plantas, dentro de los que se encuentran el crecimiento y el desarrollo del tejido vegetativo, así como el de las flores y los frutos, la senescencia y abscisión de hojas, flores y frutos, la maduración de frutos y las respuestas frente a diversos tipos de estrés.⁽¹⁾

Durante la interacción planta-patógeno se ha observado que los RCV pueden inducir respuestas de defensa en la planta,⁽²⁾ pero también pueden contribuir a que se establezca la enfermedad o a que ésta se presente con mayor rapidez;⁽³⁾ existen algunos microorganismos que sintetizan moléculas estructuralmente similares a algunas fitohormonas y que tienen la capacidad de manipular el funcionamiento de la célula vegetal,⁽⁴⁾ lo que resulta en una infección exitosa por parte del fitopatógeno. Las fitohormonas más estudiadas durante las respuestas de la planta a estrés biótico han sido el SA, el MeJA y el ET; incluso se considera que el efecto de otras fitohormonas durante la interacción planta-patógeno es a través de la intercomunicación que tienen con las rutas de señalización mediadas por el SA y el MeJA, las cuales generalmente se consideran antagónicas.⁽⁵⁾

En nuestro grupo hemos estudiado la interacción del chile habanero con dos microorganismos patógenos, uno de ellos es el oomiceto *Phytophthora capsici*, que ocasiona pérdidas devastadoras en los cultivos de chile en México y en otros países, y el otro es el hongo *Fusarium oxysporum*, que ocasiona la pudrición y la marchitez del chile.

La estrategia ha consistido en asperjar plántulas de un mes de edad, cultivadas *in vitro* o en invernadero, con SA, MeJA o etefón (compuesto liberador de ET), e inoculándolas con micelio de alguno de los dos patógenos, en las hojas o en la raíz, y evaluando diferentes parámetros durante las interacciones, como la sintomatología que presentaban las plántulas, la expresión de 21 genes que codifican a proteínas con diversas funciones celulares, incluidas las respuestas de defensa, como NPR1 (non-expressor of pathogenesis related genes 1), GST (glutathione S-transferase), PR1 y PR10 (pathogenesis related 1/10), PDF1.2 (plant defensin 1.2), LOX (lipoxygenase), ACO (ACC oxidase) en las hojas, y analizando a nivel microscópico el crecimiento del patógeno en las raíces y tallos de las plántulas.

Resultados

P. capsici infecta las plántulas de chile habanero a través de la raíz o de las hojas e induce la expresión de genes de respuesta a estrés.

La inoculación de la raíz o directamente en las hojas de chile habanero con micelio de *P. capsici* ha sido una buena estrategia para lograr una infección exitosa de las plántulas por parte del oomiceto. Cuando se inocularon dos hojas de la plántula, a los tres días después de la inoculación (di), todas las hojas ya se encontraban marchitas y necrosadas.⁽⁶⁾

Las raíces se inocularon cultivando las plántulas en medio líquido y colocando en el medio un disco de micelio de *P. capsici*. A las 12 h di, se observaron mediante microscopía electrónica de barrido, pequeñas hifas en la raíz, sugiriendo que las zoosporas habían migrado hacia el tejido, habían enquistado y germinado.⁽⁷⁾ A las 24 h, el micelio ya se encontraba cubriendo la coronilla de la raíz y se observaba la presencia de esporas en las lenticelas. Al observar los cortes transversales de la raíz, se apreció que las esporas se encontraban adheridas a las células epidermales y corticales. La

evaluación de la infección a las 48 y las 72 h mostró que la raíz se encontraba totalmente cubierta con micelio de *P. capsici* y el tejido vegetal se encontraba totalmente colapsado y necrosado.⁽⁷⁾

Se evaluó la expresión de genes del hospedante en tejido local (directamente inoculado) y sistémico (distante al tejido inoculado), mediante Northern reverso y PCR en tiempo real. En el tejido local se indujo la expresión de genes como una esterasa, una GST1, una metalotioneína, dos ω -6 desaturasas y dos PR10, demostrándonos que la planta percibe la presencia del oomiceto. A nivel sistémico la inoculación con *P. capsici* indujo la expresión de dos MAPKs.⁽⁸⁾

El etileno indujo la resistencia del chile habanero contra *P. capsici*

El tratamiento con etefón indujo la resistencia en el chile habanero, ya que el marchitamiento y la necrosis originados por el oomiceto se retrasaron o no se presentaron en las plántulas asperjadas con este compuesto. A los tres días di, el 90% de las plántulas testigo presentaban necrosis y marchitez en las hojas inoculadas, mientras que 60% de las plántulas asperjadas con etefón no mostraban ningún síntoma de la enfermedad.⁽⁶⁾

La resistencia inducida por el etefón se presentó a nivel sistémico, ya que cuando se asperjaron las hojas de las plántulas y se inocularon las raíces, se inhibió la migración de las esporas hacia la epidermis de la raíz, se detuvo el avance del patógeno a través de los vasos conductores (xilema y floema) y como consecuencia de ello, se mantuvo la integridad de los tejidos de la raíz y del tallo.⁽⁷⁾

Al analizar la expresión de un grupo de genes, se observó que la aspersión con etefón indujo la expresión de PR1, sugiriéndonos

que su participación es importante durante la resistencia del chile habanero contra *P. capsici*.⁽⁶⁾

Para corroborar que los efectos observados en las plántulas de chile habanero tratadas con etefón se debían a la liberación de ET y a su percepción por las células vegetales, previo a la aspersión con etefón, las plántulas se trataron con nitrato de plata, un compuesto que tiene la capacidad de inhibir la percepción de ET. Los resultados mostraron que las plántulas tratadas con nitrato de plata presentaban una susceptibilidad similar a las plántulas sin tratamiento, indicando que la resistencia observada en las plántulas tratadas con etefón era una respuesta específica del ET.⁽⁶⁾

El ácido salicílico y el jasmonato de metilo no inducen resistencia en chile habanero contra *P. capsici* bajo las condiciones analizadas en este trabajo

Al asperjar las plántulas de chile habanero con MeJA y SA, se observó que las plántulas presentaban los mismos síntomas que las plántulas testigo, es decir, presentaban síntomas de necrosis y marchitamiento a partir de los dos días di.⁽⁹⁾

La evaluación de los genes PDF1.2, LOX y NPR1, mostraron que la inducción en su expresión no se relacionó con un incremento en la resistencia de la planta. Los dos primeros genes se consideran marcadores de la ruta de señalización mediada por el MeJA, y el tercero por el SA. A pesar de que su nivel de expresión fue alto, las plantas fueron susceptibles al ataque por el oomiceto.⁽⁹⁾

La expresión de PDF1.2 se incrementó hasta las 8-24 h di, en las plántulas asperjadas con MeJA e inoculadas con *P. capsici*, posteriormente disminuyó a las 48-72 h di. En los tiempos tempranos de la interacción la

expresión fue mayor cuando las plántulas fueron asperjadas e inoculadas, pero en los tiempos medios, la expresión fue mayor cuando las plántulas fueron únicamente asperjadas con MeJA.⁽⁹⁾ Lo que sugiere que *P. capsici* puede inducir cambios en las rutas de señalización de la planta, que regulan la expresión de PDF1.2

La expresión del gen LOX fue alta cuando las plántulas se asperjaron con MeJA; sin embargo, cuando las plántulas se asperjaron e inocularon con *P. capsici*, su expresión disminuyó en los tiempos tempranos de la interacción (0-4 h di), sugiriendo que el patógeno inhibe la acumulación del transcrito de LOX; sin embargo, el mecanismo es aún desconocido.⁽⁹⁾

La expresión de NPR1 se indujo cuando las plántulas fueron asperjadas con SA e inoculadas con *P. capsici* a las 48-72 h di,⁽⁹⁾ indicándonos que la participación de NPR1 no es determinante para que la planta se defienda contra *P. capsici*; sin embargo, es importante mencionar que los resultados presentados son a nivel génico, y que las regulaciones postranscripcionales, traduccionales y postraduccionales son importantes para regular

la función de las proteínas, y que la función de NPR1 depende de las modificaciones postraduccionales que sufre en la célula.⁽¹⁰⁾

El etileno indujo la susceptibilidad del chile habanero contra *F. oxysporum*

Está bien documentado que los RCV pueden tener efectos contrarios durante el establecimiento de una respuesta de defensa en la planta, dependiendo del patosistema en particular, en estos estudios se pudo determinar que el ET favorece el desarrollo de la marchitez y necrosis en chile habanero inoculado con *F. oxysporum*, los resultados concuerdan con los obtenidos en otra solanácea inoculada con el mismo patógeno,⁽¹¹⁾ donde se observó que plantas mutantes en la percepción del ET eran más tolerantes al hongo.

Los resultados mostraron también que la expresión de un grupo de genes relacionados con las respuestas de la planta a diversos tipos de estrés es importante para que la planta se defienda contra *F. oxysporum* y que el tratamiento con etefón inhibe la expresión de la mayoría de estos genes.⁽¹²⁾

Discusión

La marchitez del chile ocasionada por *P. capsici* es una enfermedad devastadora que se reportó por primera vez en 1922 en Nuevo México,⁽¹³⁾ por un corto periodo se logró controlar la enfermedad mediante el uso de fenilamidas; sin embargo, actualmente existen cepas resistentes a estos compuestos químicos⁽¹⁴⁾ y no existe un control efectivo contra el oomiceto, por lo que estudiar los mecanismos de defensa de la planta resulta una estrategia atractiva que podría permitir manipular estos mecanismos para controlar diversas enfermedades.

El determinar que la inoculación con *P. capsici* induce la expresión de diversos genes de respuesta a estrés en la planta, permite sugerir que se induce una respuesta de defensa; sin embargo, ésta no es suficiente para contrarrestar el ataque.

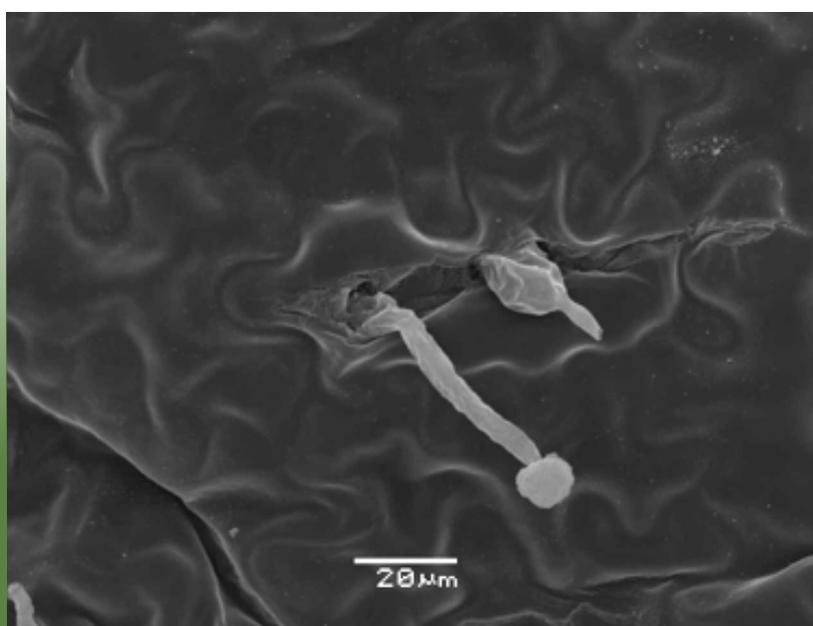
Con los resultados obtenidos podemos sugerir que, de los tres RCV analizados, el ET es el que desempeña un papel importante en el establecimiento de la defensa del chile habanero contra *P. capsici*; sin embargo, no se puede descartar que la regulación

de las rutas de señalización mediadas por los otros RCV sea importante; esto, considerando el alto nivel de intercomunicación que se lleva a cabo en estas rutas.

Debido a que se establece una resistencia sistémica inducida por el ET, el avance del patógeno debería ser bloqueado, aun

cuando éste pueda penetrar los sistemas de defensa constitutivos basales (Figura 1). Los resultados corroboran esta hipótesis, ya que en los tejidos de las plántulas tratadas con etefón prácticamente se eliminaron los síntomas, pero sí se encontró ocasionalmente esporas y micelio en los tejidos más externos de las raíces.⁽⁷⁾

Figura 1
Esporangio de *P. capsici* emergiendo de una hoja de chile habanero tratada con etefón



A los dos días de se observó en el microscopio electrónico de barrido una hoja de chile habanero tratada con etefón e inoculada con *P. capsici*. En la imagen de la Figura 1 se observa cómo se encuentran emergiendo dos esporangios de lo que posiblemente es un estoma.

Al inocular las raíces de chile habanero, a las 12 h de se observaron pequeñas hifas adheridas a la raíz, sugiriendo que previamente hubo una liberación de zoosporas, las cuales enquistaron y germinaron. Es necesario evaluar tiempos más tempranos, para confirmar esta hipótesis.

El hecho de observar que la expresión de dos MAPKs está inducida en las plántulas inoculadas con *P. capsici* y que su expresión se

inhiba mediante el tratamiento con etefón, muestra la posibilidad de que estas proteínas pudieran estar actuando como reguladores negativos del establecimiento de la defensa en chile habanero, considerando que existen reportes que muestran esta actividad.⁽¹⁵⁾

La aspersión con los tres RCV en presencia y ausencia de *P. capsici* mostró resultados diferenciales en la expresión de genes marcadores, estos datos son muy interesantes

ya que nos pueden sugerir que el patógeno tiene la capacidad de manipular las rutas de señalización mediadas por las tres fitohormonas, o alguna de ellas y debido a la compleja intercomunicación que existe entre ellas, se modifica la señalización en el resto; existen reportes que indican que los oomicetos tienen la capacidad de liberar un gran número de moléculas efectoras dentro del hospedante para manipular su metabolismo y de esta manera lograr la infección del tejido.⁽¹⁶⁾

Por otra parte, es sumamente importante escalar los análisis con los RCV en plantas cultivadas en invernadero y posteriormente en campo, para determinar el efecto de estos

tratamientos bajo condiciones ambientales que influyen de manera importante en el establecimiento de cualquier enfermedad (temperatura, humedad, lluvia y viento).

Además, se debe tener en cuenta que el incremento de los niveles de ET puede inducir la resistencia en la planta contra un grupo específico de patógenos, pero puede tener el efecto contrario frente a otros microorganismos, por esta razón se debe determinar en qué estación del año sería más recomendable aplicar el tratamiento, con base en las enfermedades reportadas en estos periodos específicos y considerando que las plantas se encuentran en contacto con una amplia gama de microorganismos todo el tiempo.

Conclusiones

El tratamiento con etefón indujo la resistencia en plántulas de chile habanero inoculadas con *P. capsici*, inhibió la producción o la migración de esporas hacia las raíces.

La resistencia inducida por el tratamiento con etefón fue específica del ET liberado, ya que las plántulas tratadas con nitrato de plata fueron igual de susceptibles que las plántulas sin tratamiento.

Se considera importante la expresión del gen PR1 durante la resistencia inducida contra *P. capsici*, la cual fue regulada por el ET.

El tratamiento con etefón indujo susceptibilidad en chile habanero inoculado con *F. oxysporum*, donde se observó que se inhibió la expresión de la mayoría de los genes de respuesta a estrés analizados.

El SA y el MeJA no inducen resistencia en chile habanero contra *P. capsici* bajo las condiciones analizadas en este trabajo.

Agradecimientos

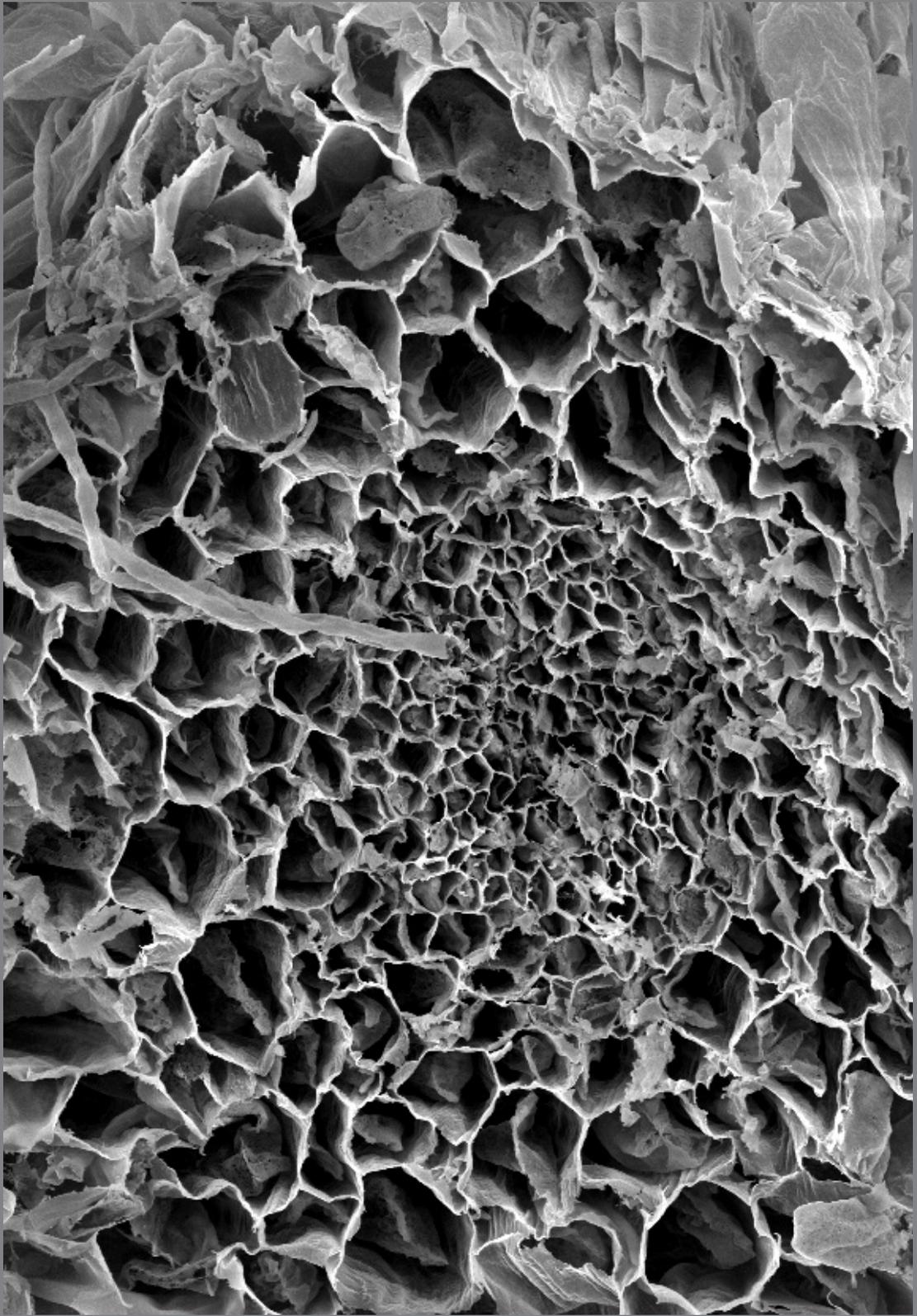
El proyecto fue financiado por el Conacyt. RNP y MDMS agradecen las becas 208245 y el apoyo, respectivamente, otorgadas por el Conacyt.

Referencias bibliográficas

- (1) Kulaeva O.N., Prokoptseva O.S. 2004. "Recent advances in the study of mechanisms of action of phytohormones". *Biochemistry (Mosc)* 69:233-47. DOI:10.1023/B:BIRY.0000022053.73461.cd
- (2) Bari R., Jones J.D.G. 2009. "Role of plant hormones in plant defence responses". *Plant Mol Biol* 69:473-488. DOI:10.1007/s11103-008-9435-0.
- (3) Audenaert K., De Meyer G.B., Höfte M.M. 2002. "Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms". *Plant Physiol* 128:491-501. DOI:10.1104/pp.010605.
- (4) Cui J., Bahrami A.K., Pringle E.G., Hernández-Guzmán G., Bender C.L., Pierce N.E., Ausubel F.M. 2005. "*Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores". *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1791-1796.
- (5) Thaler J.S., Fidantsef A.L., Bostock R.M. 2002. "Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of concentration and timing of elicitation on defense related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato". *J Chem Ecol* 28:1131-1159. DOI:10.1023/A:1016225515936.
- (6) Núñez-Pastrana R., Arcos-Ortega G.F., Souza-Perera R.A., Sánchez-Borges C.A., Nakazawa-Ueji Y.E., García-Villalobos F.J., Guzmán-Antonio A.A., Zúñiga-Aguilar J.J. 2011. "Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper". *Eur J Plant Pathol* 131:669-683. DOI:10.1007/s10658-011-9841-z.
- (7) Cocom-Chan N.D. 2011. "Análisis histológico de la infección de la planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con el oomiceto *Phytophthora capsici*". Tesis profesional, Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.
- (8) Nakazawa-Ueji Y.E., Núñez-Pastrana R., Souza-Perera R.A., Santana-Buzzy N., Zúñiga-Aguilar J.J. 2010. "Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defence-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense*". *Eur J Plant Pathol* 126:403-415. DOI:10.1007/s10658-009-9544-x.
- (9) Sánchez-Borges C.A. 2012. "Papel del ácido salicílico y el ácido jasmónico en la respuesta de defensa contra *Phytophthora capsici* en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Tesis profesional, Instituto Tecnológico de Conkal.
- (10) Pieterse C.M.J., Van Loon L.C. 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7:456-464. DOI:10.1016/j.pbi.2004.05.006.
- (11) Francia D., Demaria D., Calderini O., Ferraris L., Valentino D., Arcioni S., Tamietti G., Cardinale F. 2007. "Wounding induces resistance to pathogens with different lifestyles in tomato: role of ethylene in cross-protection". *Plant Cell Environ.* 30:1357-65. DOI:10.1111/j.1365-3040.2007.01709.x
- (12) Núñez-Pastrana R. 2011. "Efectos del etileno sobre la expresión génica en *Capsicum chinense* durante la interacción planta-patógeno". Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- (13) Leonian L.H. 1922. "Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* species nov". *Phytopathology* 12:401-408.

- ⁽¹⁴⁾ Café-Filho A.C., Ristaino J.B. 2008. "Fitness of isolates of *Phytophthora capsici* resistant to mefenoxam from squash and pepper fields in North Carolina". *Plant Disease* 92:1439-1443. DOI:10.1094/PDIS-92-10-1439.
- ⁽¹⁵⁾ Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. 2000. Arabidopsis *MAP kinase 4* negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103:1111-1120. DOI:10.1016/S0092-8674(00)00213-0.
- ⁽¹⁶⁾ Kamoun S. 2006. "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes". *Annu Rev Phytopathol* 44:41-60. DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.14343





La regulación molecular de las respuestas de defensa del chile habanero contra microorganismos patógenos

Capítulo 16

María Goretty Caamal Chan, Yumi Elena Nakazawa Ueji,
Ramón Armando Souza Perera, José Juan Zúñiga Aguilar*

*Autor responsable: zuniga@cicy.mx



Resumen

Los homogenizados de pared celular de *Phytophthora capsici* afectan eventos bioquímicos relacionados con la defensa en suspensiones celulares de *Capsicum chinense* (e.g, la alcalinización del medio, el establecimiento de una explosión oxidativa, la activación de proteínas PR y MAP cinasas), así como la acumulación de transcritos de genes de diversas rutas metabólicas en las cuales se incluye a las enzimas de la biosíntesis del etileno, proteínas de tipo PR, MAP cinasas, pero la expresión de genes ortólogos de moduladores importantes de la defensa (NPR1 y WRKY) no es afectada durante la infección de plántulas de *C. chinense* con el oomiceto *P. capsici* en. De hecho, son pocos los genes cuya expresión es modificada durante esta interacción, entre los cuales se encuentra un ortólogo de la nitrato reductasa (CcNR), que si bien la inoculación con el oomiceto induce un incremento en sus transcritos, las fitohormonas SA y ET lo hacen con mayor intensidad, pero no así el MeJa. Debido a que al parecer la NR sí puede estar relacionada con la defensa, pero todas las plántulas mueren por la infección, es posible que la expresión de la NR esté siendo reprimida por el oomiceto afectando su participación eficiente en la respuesta de defensa.

Palabras clave

Marchitamiento por *Phytophthora*, homogeneizados fúngicos, respuestas de defensa

Introducción

El oomiceto *P. capsici* Leonian es uno de los más extensos y destructivos patógenos de suelo, el cual tiene un amplio rango de hospederos, entre ellos chile (*Capsicum* sp.).⁽¹⁾ Han sido muchos los estudios para identificar plantas con una estable y durable resistencia a *P. capsici*, se maneja que la edad de la planta está relacionada con la resistencia, se ha observado que plantas maduras pueden ser eficientes en reducir el daño causado por este patógeno.⁽²⁾

Muchos han sido los elementos descritos durante las respuestas de defensa de una planta en diversos patosistemas, por mencionar algunos tenemos a los fitorreguladores (ácido salicílico, ácido jasmónico, y etileno),⁽³⁾ elementos de las rutas de transducción de señales como las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPK),⁽⁴⁾ las proteínas relacionadas con la defensa; en estudios de *Capsicum annum* con *P. capsici* se han identificado varios de estos elementos.

Ya que el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un hospedero susceptible del oomiceto *P. capsici*, se sugiere que este patógeno manipula los sistemas de defensa del hospedante como ya se ha reportado en otros modelos, sin embargo, poco se sabe sobre esta interacción.

Para obtener evidencias de las modificaciones producidas en el hospedero durante el estado temprano de la marchitez, empleamos diversas técnicas bioquímicas y de biología molecular. Si bien se identificaron elementos relacionados con la defensa, en esta interacción la planta muere, lo cual parece indicar manipulación de los sistemas de defensa del hospedante por parte del oomiceto. Estos son los primeros pasos para la comprensión de los eventos celulares que se manifiestan durante la interacción *C. chinense*-*P. capsici*, con el entendimiento de estos procesos podremos plantear la manipulación genética del chile como una estrategia en la generación de resistencia contra esta letal enfermedad.

Resultados

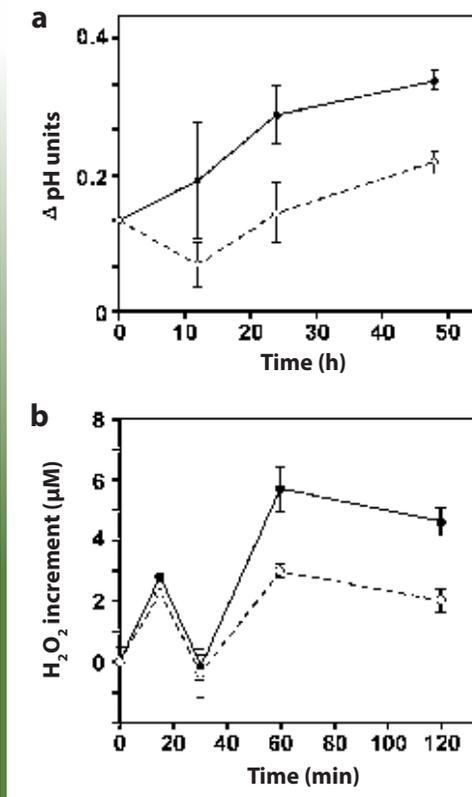
La adición de homogeneizados fúngicos induce una respuesta de defensa

Con el empleo de suspensiones celulares observamos la inducción de eventos relacionados con la defensa contra patógenos al ser inducidas con homogeneizados de micelio de *P. capsici* (MyH).⁽⁵⁾ La adición del elicitor indujo una rápida alcalinización del medio de cultivo, así como la aparición de una doble explosión oxidativa; ambos fenómenos son típicos de las respuestas vegetales de defensa contra patógenos (Figura 1a y 1b).⁽⁶⁾ La elicitación también indujo la activación de enzimas β -1,3-glucanasas (Figura 2). Estas enzimas forman parte de las proteínas relacionadas con la patoogénesis (PR), cuya activación constituye un marcador bioquímico del establecimiento de la

defensa.⁽⁷⁾ Mediante ensayos de cinasa en gel, utilizando la proteína básica de mielina como sustrato, encontramos que la elicitación también produjo la activación de dos proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), de 42 y 44 kDa, respectivamente (Figura 3). Esta activación es rápida y transitoria, lo cual es un comportamiento típico de las MAP cinasas.⁽⁸⁾ Las MAP cinasas constituyen una ruta universal de transducción de señales altamente conservada en organismos eucarióticos,⁽⁹⁾ la cual está constituida por módulos de tres proteínas modificadas por fosforilación sucesiva una a la otra. La activación de esta vía es un indicador de que las células están percibiendo la presencia del patógeno y en principio pueden transducir la señal hacia el núcleo para modificar la expresión génica.⁽¹⁰⁾

Figura 1

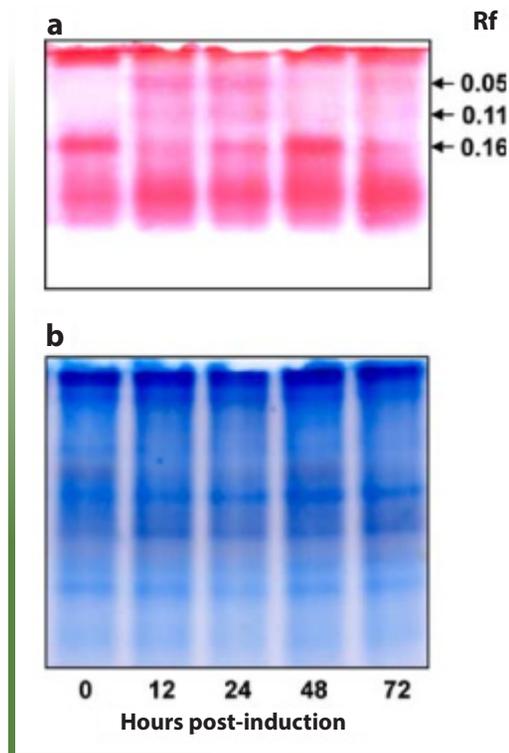
La elicitación de suspensiones celulares produce una explosión oxidativa y la alcalinización del medio



Alícuotas de 10 mL de las suspensiones celulares fueron incubadas con glucosa ($90 \mu g$ glucosa $\cdot mL^{-1}$, O) o una concentración equivalente de homogeneizados de micelio ($90 \mu g$ glucosa $\cdot eq\cdot mL^{-1}$, •). Se midieron los valores de pH (a) y las concentraciones de peróxido de hidrógeno extracelular (b).

Figura 2

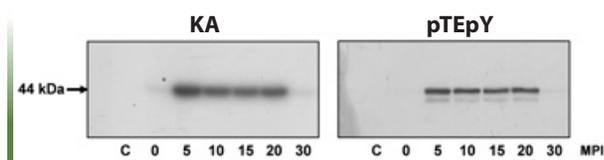
La incubación con homogeneizados de micelio induce actividades de β -1,3-glucanasa



Veinticinco μg de extractos proteicos aislados de suspensiones celulares incubadas por diferentes períodos con homogeneizados fúngicos fueron fraccionados por electroforesis nativa y las actividades de β -1,3-glucanasa fueron medidas. (a) zimografía; (b) gel teñido con Coomassie.

Figura 3

La incubación con homogeneizados de micelio activa dos MAP cinasas



Veinticinco μg de proteína fueron fraccionados por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia (KA) o ausencia (pTEpY) de MBP. La activación de las MAP cinasas fue evaluada por ensayos de cinasa en gel (KA) o mediante anticuerpos dirigidos contra la proteína bisfosforilada (pTEpY). Los números indican los minutos después de la adición de los homogeneizados fúngicos.

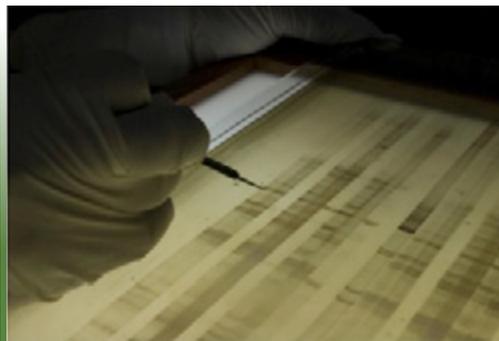
Modificación de la población de transcritos en plántulas de *Capsicum chinense* durante la infección con *Phytophthora capsici*

Para determinar qué procesos podrían estar modificando durante esta interacción de tipo compatible, se analizaron los patrones de expresión génica durante el proceso de infección, empleando la técnica del despliegue diferencial de ARN.⁽¹¹⁾ Esta técnica permite comparar subconjuntos de poblaciones de transcritos provenientes de tejidos diferentes, de forma simultánea en un solo gel de poliacrilamida. Para ello, plántulas de cuatro semanas fueron inoculadas en la raíz con un disco de micelio de *P. capsici*. Para evitar la contaminación del ARN de la planta con el ARN del oomiceto, se analizó la presencia de micelio intracelular, tomando segmentos de tallo ubicados por arriba de la necrosis y cultivándolos en medio de cultivo papa-dextrosa-agar. Se observó que a los tres días después de la inoculación el micelio intracelular se encuentra a 1.5 cm por arriba de la necrosis del tallo. Por lo tanto, para el estudio de la expresión génica se descartó esta región, garantizando que el tejido de hoja se encuentra libre de la presencia de micelio del patógeno.

Al comparar las subpoblaciones de transcritos mediante el fraccionamiento en gels desnaturizantes de poliacrilamida, de los correspondientes ADNc amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se observó que durante la infección se tienen muy pocos cambios de los transcritos a nivel sistémico; es decir, no pudimos encontrar genes expresados de *novo*; por el contrario, solamente se encontró transcritos cuya concentración se incrementó o disminuyó por efecto de la inoculación (Figura 4). Estos ensayos fueron repetidos con diferentes combinaciones de cebadores, tratando de cubrir una extensión mayor de la población de transcritos, obteniendo resultados similares.

Figura 4

Análisis de genes expresados diferencialmente, por medio del "RNA Differential Display"



Las bandas de ADNc correspondientes a genes con expresión diferencial son cortadas del gel de secuenciación para su clonación y caracterización. En la figura se muestran los resultados de la tesis de Doctorado de María Goretty Caamal Chan.

El análisis bioinformático de las secuencias determinó la identidad de los ADNc cuyo patrón de expresión se vieron modificados durante la infección, determinando que pertenecen a genes que codifican proteínas que participan en diferentes procesos metabólicos. Entre estos genes se clonó el que codifica una proteína involucrada en el reciclamiento hacia el sistema endosomal, la proteína Vsp26. Otros ADNc presentaron altos niveles de similitud con secuencias cuyas proteínas participan en el metabolismo del nitrógeno; la asparaginasa y la nitrato reductasa (CcNR). Adicionalmente, se encontraron secuencias que no han sido reportadas en la base de datos.⁽¹¹⁾

De entre los pocos transcritos cuya concentración se incrementó a causa de la inoculación con *P. capsici*, sobresalió uno que codifica a una nitrato reductasa (NR). Mientras que la función más conocida de la NR se relaciona con la asimilación de nitrógeno inorgánico, en la literatura se reporta una función menos conocida, la de producir óxido nítrico (NO) a partir de nitritos.⁽¹²⁾ El NO es uno de los reguladores del crecimiento

vegetal descubiertos más recientemente, teniendo un papel importante en el establecimiento de la defensa vegetal contra microorganismos patógenos.⁽¹³⁾

Para determinar si la NR clonada en este trabajo podía tener una relación con la defensa contra patógenos, se midió el efecto de la adición de ácido salicílico (SA), jasmonato de metilo (MeJA) y el etileno sobre los niveles de transcritos y sobre la actividad enzimática de la NR. Los resultados mostraron que los transcritos de la NR se encuentran en niveles basales en diferentes órganos de la planta de chile habanero, especialmente en las raíces (Figura 5B). No obstante, los transcritos se incrementaron notablemente cuando las hojas fueron asperjadas con SA y Etileno, pero no por MeJA (Figura 5 C).

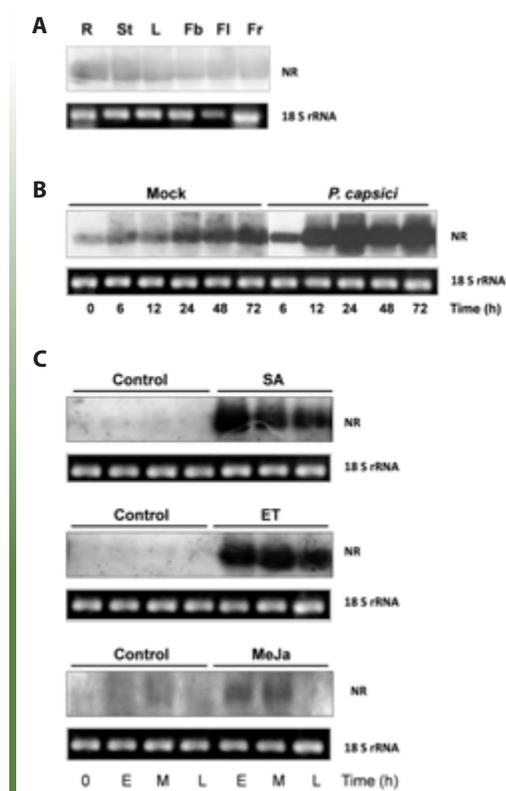
Con el análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de la CcNR, identificamos un dominio de unión para el cofactor NADH; por tanto, analizamos el efecto de la inoculación con el patógeno, así como de la aspersión con las fitohormonas, de la actividad reductora de nitrato a nitrito dependiente de NADH (NR-NADH). Los resultados obtenidos fueron similares a los del análisis de transcritos. La inoculación con el oomiceto induce una activación paulatina de la NR-NADH en función del tiempo durante las primeras 72 h después de la inoculación (Figura 6A). Por otro lado, la NR-NADH se incrementó cuando las plántulas fueron asperjadas con SA y con Et, pero no con MeJA (Figura 6B), de la misma manera en que los transcritos son inducidos por estos fitorreguladores (comparar Figuras 5C y 6B).

Experimentalmente, la especificidad de la actividad de la NR ha sido estudiada mediante la adición de tungstato de sodio (Na_2WO_4),⁽¹⁴⁾ debido a que el Na_2WO_4 funciona como análogo del molibdeno, el cual es el cofactor metálico de la NR. La reducción en la actividad de la NR en las

plantas es causada por la síntesis de una proteína- Na_2WO_4 inactiva.⁽¹⁵⁾ No obstante, se ha reportado que el Na_2WO_4 inhibe a una NR-NADH inducida pero no a una NR-NADH constitutiva; es decir, el tungsteno puede ubicarse en el sitio del molibdeno pero no puede desplazarlo.

Nosotros hicimos el análisis de la actividad de la NR-NADH en plántulas tratadas con tungstato de sodio, para ello inoculamos plántulas de cuatro semanas de edad pretratadas con el competidor, con discos

Figura 5
Expresión de la NR bajo diferentes tratamientos

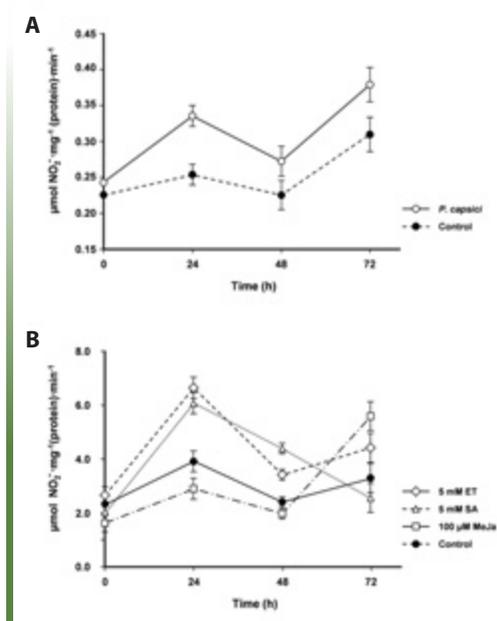


Las poblaciones de ADNc fueron hibridadas con la clona NR marcada con digoxigenina. **A:** niveles de transcritos de NR en diferentes órganos de la planta; **B:** niveles de transcritos de NR en las primeras 72 h de la inoculación con *P. capsici*; **C:** expresión de NR a las 72 h después de la aspersión con SA, ET o MeJA. El transcrito del ARNr 18S fue usado como control interno.

de micelio del oomiceto. Los resultados demostraron que solamente en tiempos tardíos de la infección (72 h) se redujo la actividad de NR-NADH, sugiriendo que es

en estos tiempos cuando se induce una actividad de NR-NADH, la cual probablemente esté relacionada con la defensa contra patógenos.

Figura 6
Actividad de la NR bajo diferentes tratamientos



La actividad de la NR dependiente de NADH fue determinada en extractos proteicos de hoja. A: modificación de la actividad enzimática de la NR durante las primeras 72 h después de la inoculación con *P. capsici*; B: actividad enzimática durante las primeras 72 h después de la aspersión con SA, ET o MeJa. Como control, las plántulas fueron asperjadas con Tween 20 al 0.01% (v/v).

Discusión

Todas las especies del género *Capsicum* son mortalmente susceptibles a la infección causada por el oomiceto *Phytophthora capsici*, una enfermedad conocida como el "Marchitamiento por *Phytophthora*".⁽¹⁶⁾ A pesar de que se han desarrollado numerosas investigaciones para entender el mecanismo de patogenicidad, así como

para generar especies resistentes, hasta la fecha no ha sido posible encontrar respuestas a estas interrogantes.

En el caso de la interacción del chile habanero con *P. capsici*, nuestro grupo ha generado información relacionada con la manipulación que el oomiceto puede ejercer

sobre el establecimiento de la respuesta de defensa en el hospedante. Así, aun a pesar de que el reconocimiento de la presencia del patógeno puede inducir eventos de la defensa, incluyendo proteínas PR y MAPK, es probable que los niveles de la respuesta no alcancen el umbral requerido para generar resistencia. Adicionalmente, el hecho de que las MAPK se activen y esto correlacione positivamente con la muerte de la planta, puede significar que estas proteínas pueden actuar de manera negativa durante el reconocimiento; es decir, podrían estar involucradas en el mecanismo de patogenicidad del oomiceto, más que proteger a la planta en contra de éste.

Por otro lado, el hallazgo de que la inoculación induce la actividad de un nitrato reductasa dependiente de NADH podría significar

que la vía de defensa mediada por el NO se está generando; sin embargo, el hecho de que no hay defensa y las plantas mueren es nuevamente un elemento para considerar que el patógeno manipula esta vía también.

Podemos ver así que la clonación de genes mediante RT-PCR es muy útil cuando se pretende estudiar una proteína o un gen en particular identificado mediante esta metodología. Sobre todo cuando en realidad no se requiere el conocimiento de las secuencias completas, pues las secuencias parciales clonadas se pueden utilizar como sondas para analizar la regulación de la expresión génica.

Agradecimientos

El proyecto P-48837 fue financiado por el Conacyt. YENU y MGCC agradecen las becas 172927 y 204985, respectivamente, otorgada por el Conacyt.

Referencias bibliográficas

- (1) Hausbeck M.K., Lamour K.H. 2004. "Phytophthora capsici on vegetable crops: research progress and management challenges". *Plant Dis* 88:1292-1303.
- (2) Kim Y.J., Hwang B.K., Park K.W. 1989. "Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*". *Plant Dis* 73:745-747.
- (3) Bari R., Jones J.D.G. 2009. "Role of plant hormones in plant defence responses". *Plant Mol Biol* 69:473-488.
- (4) Pitschke A., Schikora A., Hirt H. 2009. "MAPK cascade signaling networks in plant defence". *Curr Op Plant Biol* 12:1-6.
- (5) Nakazawa-Ueji Y.E., Núñez-Pastrana R., Souza-Perera R.A., Santana-Buzzy N., Zúñiga-Aguilar J.J. 2010. "Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defence-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense*". *Eur J Plant Pathol* 126:403-415

- (6) Dixon R.A., Harrison M.J., Lamb C.J. 1994. "Early Events in the Activation of Plant Defense Responses". *Ann Rev Phytopathol* 32:479-501.
- (7) Sels J., Mathys J., De Coninck B.M.A., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. 2008. "Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides". *Plant Physiol Biochem* 46:941-950.
- (8) Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. 2002. "MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity". *Nature* 415:977-983.
- (9) Seger R., Krebs E.G. 1994. "The MAPK signaling cascade". *FASEB J* 9:726-735.
- (10) Khokhlatchev A.V., Canagarajah B., Wilsbacher J., Robinson M., Atkinson M., Goldsmith E., Cobb M.H. 1998. "Phosphorylation of the MAP Kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation". *Cell* 93:605-615.
- (11) Caamal-Chan M.G., Souza-Perera R., Zúñiga-Aguilar J.J. 2010. "Systemic induction of a *Capsicum chinense* nitrate reductase by the infection with *Phytophthora capsici* and defence phytohormones". *Plant Physiol Biochem* 49:1238-1243.
- (12) Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. 2002. "Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*". *J Exp Bot* 53:103-110.
- (13) Wendehenne D., Durner J., Klessig D.F. 2004. "Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses". *Curr Op Plant Biol* 7:449-455.
- (14) Xiong J., Fu G., Yang Y., Zhu C., Tao L. 2012. "Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research?" *J Exp Bot* 63:33-41.
- (15) Heimer Y.M., Wray J.L., Filner P. 1969. "The effect of tungstate on nitrate assimilation in higher plant tissues". *Plant Physiol* 44:1197-1199.
- (16) Leonian L.H. 1922. "Stem and fruit blight of Peppers caused by *Phytophthora capsici*". *Phytopathol* 12:401-408.





Tratamientos de termoterapia en semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) infectadas con virus de ARN

Capítulo 17

Nelly Cristina Aguilar Sánchez, Rosa María Kantún Can, José Tun Suárez,^a Yereni Minero-García y Oscar A. Moreno Valenzuela*

^aInstituto Tecnológico de Conkal

*Autor responsable: oamv@cicy.mx



Resumen

En este trabajo se estimó el porcentaje de transmisión por semilla de tres virus de ARN: Alfalfa mosaic virus (AMV), Tobacco ringspot virus (TRSV) y Tobacco mosaic virus (TMV) en semillas y plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* J.) de tres cultivares, Seminis, Criollo naranja y Criollo Rojo (R4). La proporción de semillas infectadas con los virus fue de 48% y de 60% para los virus TMV y TRSV, respectivamente, y de 12.5% para el AMV, dependiendo del cultivar, determinado mediante la técnica DAS-ELISA. Las semillas fueron sometidas a tratamientos térmicos durante 30 min a 50 °C con la finalidad de eliminar los virus. Posteriormente, fueron germinadas y las plántulas obtenidas se analizaron para los mismos virus mediante DAS-ELISA. Los índices de infección disminuyeron a 17.5% para el TMV, 0.75% para el TRSV y a 0% para el AMV. Las plantas sin presencia de virus de ARN obtenidas se utilizaron para realizar la inoculación del PepGMV, para los estudios sobre interacción planta-patógeno. Los resultados sugieren que el tratamiento térmico puede ser utilizado para erradicar la presencia de virus de ARN en semillas de chile habanero.

Palabras clave

Alfalfa mosaic virus (AMV), Tobacco mosaic virus (TMV), Tobacco ringspot virus (TRSV), ELISA, termoterapia, Pepper golden mosaic virus (PepGMV)

Introducción

La edad de la planta está relacionada con la resistencia al virus; se ha observado que plantas maduras pueden ser eficientes en reducir el daño causado por el patógeno *P. capsici*.

En Yucatán han sido reportadas diversas especies de virus de ARN capaces de infectar chile habanero, como el Alfalfa mosaic virus (AMV), el Tobacco ringspot virus (TRSV), el Tobacco mosaic virus (TMV) y el Tobacco etch virus (TEV).⁽¹⁾ De éstos, el AMV y el TEV son transmitidos por áfidos, el TRSV es transmitido por nemátodos y el TMV de forma mecánica. Además, los virus AMV, TMV y TRSV son también transmitidos por semilla, lo cual representa una fuente de inóculo primario para su diseminación en campos de cultivo libres de estos virus.⁽²⁾

Para controlar la transmisión de estos virus, existen métodos que reducen su impacto en plantas y semillas, como el tratamiento térmico.⁽³⁾ Esta estrategia de control es factible debido a que reduce el impacto del inóculo viral y ayuda a reducir las pérdidas de los cultivos causados por la presencia de diversos patógenos. La obtención de plántulas libres de virus permite la realización de trabajos de investigación, inclusive de interacción planta-patógeno sin el riesgo de obtener datos sesgados debido a la presencia de otros virus en las semillas empleadas.

El Pepper golden mosaic virus (PepGMV) es un miembro de la familia de los geminivirus perteneciente al género *Begomovirus*. Es un virus bipartita (genoma dividido en dos componentes) el cual infecta naturalmente chile, tomate, tabaco y otras solanáceas. Es transmitido por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y se encuentra ampliamente distribuido en México y América Central.⁽⁴⁾ Los síntomas foliares expresados por las plantas infectadas con el PepGMV son mosaicos dorados o amarillamientos, enchinamientos severos y anomalías en las hojas. Además, se presentan acortamientos en los internodos e incremento en la producción de flores, lo que induce senescencia prematura, reducción en tamaño de frutos y calidad de los mismos.⁽⁵⁾

El PepGMV ha sido reportado causando infecciones mixtas junto con el Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV) y más recientemente con el Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) en la Península de Yucatán.^(6,7,8) Además, se han reportado ocasionando infecciones mixtas con virus de otras familias con diferente material genético como diversos virus de ARN.

El objetivo de este trabajo fue realizar tratamientos térmicos a semillas de chile habanero provenientes de diversas accesiones para reducir el porcentaje de infección del AMV, TMV y TRSV para la realización de estudios de interacción PepGMV-*Capsicum chinense* Jacq.

Materiales y métodos

Las semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) utilizadas en este estudio fueron donadas por el Dr. Tomás González Estrada (CICY). Dichas semillas provienen de cuatro diferentes accesiones (lotes) de plantas infectadas con virus naturalmente en el campo.

Detección de virus de ARN en semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Para detectar los niveles de virus en las semillas se realizó la prueba de ELISA en su variante DAS-ELISA.

La extracción de proteína total se realizó en grupos de cuatro semillas, las cuales fueron maceradas con nitrógeno líquido en 1 ml de amortiguador de extracción. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford.⁽⁹⁾

En la prueba se usaron anticuerpos para tres tipos de virus de ARN (AMV, TRSV y TMV) cuya presencia ha sido previamente reportada en semillas de chile habanero en Yucatán.⁽¹⁰⁾ Se utilizaron controles positivos (proteína de la cápside purificada) y negativos, los cuales al igual que los anticuerpos, fueron adquiridos en Agdia, Inc. Cada pozo de la placa para ELISA se sensibilizó con 100 µg de anticuerpo. Los valores de absorbancia de cada muestra se leyeron en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 405 nm. La reacción se consideró positiva cuando la lectura fue mayor al valor promedio más dos veces la desviación estándar de los controles negativos.

Tratamiento térmico en semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Los tratamientos térmicos fueron de 50 °C por 30 min. Aproximadamente 250 semillas fueron desinfectadas con agua estéril, cloro comercial (6%) preparado al 30% y etanol industrial al 70%, colocadas en tubos eppendorf, sumergidas en agua y mantenidas en placas a la temperatura indicada. Se realizaron dos repeticiones por cada grupo de 250 semillas en las accesiones MR5, MR6, MR7 y MR8, lo cual significa material proveniente de fruto rojo.

Determinación de infección de virus de ARN en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Para determinar los índices de transmisión de los virus de ARN en plántulas, aproximadamente 250 semillas de las diferentes accesiones sometidas al tratamiento térmico fueron colocadas en medio MS completo.

Posteriormente, a partir de las plántulas obtenidas se colectaron las hojas para la realización de la prueba DAS-ELISA.

Extracción de ADN total

Se colectó el material vegetal (hoja) y se realizó la extracción del ADN total⁽¹¹⁾ para su utilización en la reacción de PCR para la determinación de la presencia del virus en las plantas provenientes de semillas tratadas.

Inoculación viral por biobalística

Una vez obtenidas las plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con aprox. tres hojas verdaderas, éstas fueron infectadas con el PepGMV por medio de biobalística.⁽¹²⁾ Se inocularon clones infectivos del PepGMV (dímeros de ambos genomas A y B), utilizando 1 µg de partículas de oro a 900 psi de gas helio. Se bombardearon hojas de plantas completas.

Amplificación por PCR para determinar la presencia del PepGMV

La reacción de PCR fue realizada usando los cebadores prAC889 (5'-GGRTTDGARG-CATGHGTACATG) y prAV324 (5'-GCCYATR-TAYAGRAAGCCMAG).⁽¹³⁾ Estos cebadores amplifican un fragmento de 576 bp de la proteína de la cápside de los begomovirus. Se utilizó como control positivo del genoma A del PepGMV clonado en pBluescript. Los productos obtenidos de la reacción de PCR fueron clonados en el vector pGEM-Teasy y enviados a secuenciar a la Universidad de Davis CA. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Edit Sequence (DNASTAR versión 5.08, Madison, WI) y alineadas realizando un análisis en BLAST usando la base de datos del NCBI-GenBank.

Resultados

Infección de virus de ARN en semillas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

La prueba de DAS-ELISA realizada para las semillas de chile habanero indicó la presencia de los virus TMV y TRSV. En el caso del virus AMV no fue detectado en el análisis en semillas de Criollo rojo, pero sí en semillas y plántulas de los cultivares Seminis y Criollo naranja. Del total de las 250 semillas sometidas al tratamiento térmico, los índices de infección fueron para el TMV de 48% y para el TRSV de 24% (Cuadro 1).

Transmisión por semilla de virus de ARN en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Las semillas de chile habanero de los diferentes lotes fueron sometidas a tratamiento térmico, como se indica en la sección de materiales y métodos, y posteriormente fueron germinadas. Se analizó la presencia de virus mediante DAS-ELISA en las plántulas obtenidas y los resultados mostraron que los porcentajes de infección de virus disminuye, encontrándose valores de 17.5% para el TMV y de 0.75% para el TRSV. No se observaron síntomas de infección por la presencia de los virus de ARN en las plantas.

Efectos de los tratamientos térmicos en la germinación de las semillas de chile habanero

Posterior al tratamiento térmico aplicado a las semillas, no se observaron cambios en su capacidad de germinación, al presentarse en 96%, aproximadamente, al germinar 240 semillas de las 250 iniciales de cada experimento. No se observaron cambios en el fenotipo de las plantas de chile obtenidas mediante el tratamiento con termoterapia,

comparadas con el control, así como tampoco en el número de hojas de las plantas. Es importante indicar que el tratamiento térmico es un método adecuado para disminuir la replicación viral en plantas tanto en tejidos como en órganos vegetales, ya que suele producir un porcentaje relativamente alto de plantas libres de virus.

Inoculación del PepGMV en plantas de chile habanero provenientes de semillas sometidas a tratamiento térmico

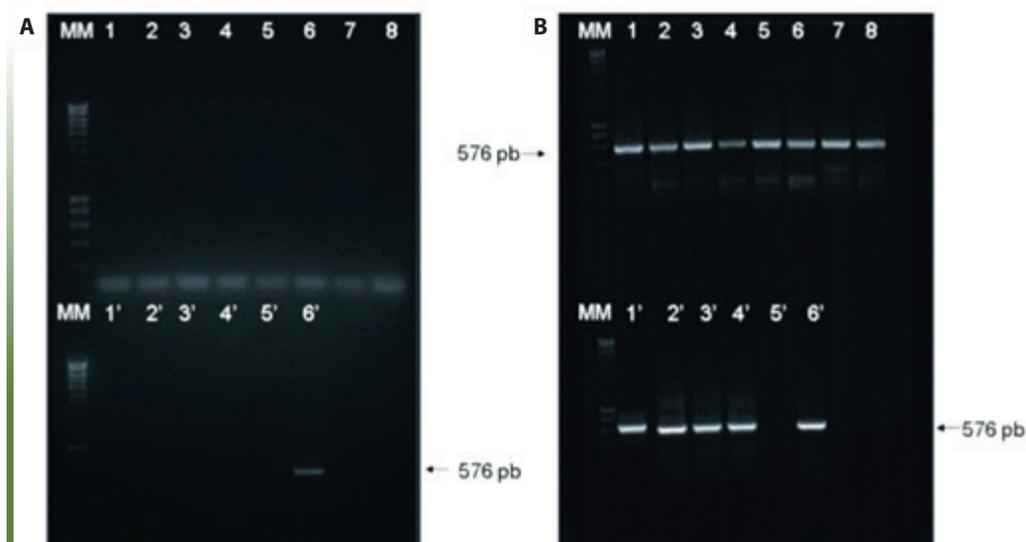
La inoculación de begomovirus por el método de biobalística ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios de interacción planta-patógeno. La eficiencia de la técnica ha permitido realizar investigación a corto plazo en comparación con el uso de métodos tradicionales de infección y manejo de vectores virales, lo cual resulta además muy laborioso.⁽¹⁴⁾ Además, ha permitido la inoculación de clones infectivos de virus en una amplia variedad de plantas, en sus diversas fases de desarrollo.⁽¹⁵⁾ Por lo tanto, por medio de la biobalística fue llevada a cabo la inoculación del PepGMV, utilizando como control del daño mecánico el bombardeo de plantas únicamente con las partículas de oro y sin bombardeo. Fueron inoculadas 48 plantas con el PepGMV; en 25 de las 48 se consiguió infectar con dicho virus. Estos resultados fueron obtenidos mediante la amplificación por PCR de un fragmento de la proteína de la cápside (CP) de los geminivirus (Figura 1) la cual es de aproximadamente 576 pb. Como se puede observar (Figura 1A), los controles negativos no presentaron la amplificación de dicho fragmento a diferencia de las plantas inoculadas (Figura 1B).

Cuadro 1
Determinación de la presencia de TMV, AMV y TRSV
en semillas de chile habanero

LOTE	TMV	AMV	TRSV
MR5	+ -	--	+ -
MR6	+ -	--	+ -
MR7	++	--	+ -
MR8	++	--	--

+ - : Positivo o negativo, cada uno representa el resultado del análisis por DAS-ELISA de cuatro accesiones de chile habanero, donde menos del 50% de las semillas fueron positivas a los diferentes virus de ARN evaluados. La reacción se consideró positiva cuando la lectura fue mayor al valor promedio más dos veces la desviación estándar de los controles negativos. MR5, 6, 7 y 8 son nombres de las accesiones utilizadas.

Figura 1
Amplificación de un fragmento
de la CP del PepGMV



La amplificación se realizó por PCR, usando los cebadores 889-324 que generan un amplicón de 576 pb. A) Resultados de las plantas control bombardeadas con partículas de oro y no bombardeadas. MM: marcador de peso molecular, líneas 1-8, controles bombardeadas con oro, líneas 1-4', líneas 5' y 6', controles negativo (agua) y positivo (TPV) respectivamente. B) Resultados de la amplificación en las plantas infectadas con el PepGMV. MM: marcador de peso molecular, líneas 1-8 y de 1' a 4' plantas inoculadas con el PepGMV y líneas 5' y 6', controles negativo y positivo respectivamente. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio).

Discusión

Previamente se ha reportado la presencia del virus AMV en semillas de frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* J.) en porcentajes de hasta 11%, en diferentes genotipos criollos.⁽²⁾ En este trabajo se encontró que semillas comerciales de Seminis y el cultivar Criollo presentaban un porcentaje similar de infección por el AMV. En un segundo lote de semillas, para el caso del cultivar Criollo rojo (R4) no se logró detectar la presencia del AMV. Las semillas analizadas provienen de diferentes fuentes y fueron obtenidas de cultivos con diferentes grados de infección viral, por lo que los resultados sugieren que las semillas analizadas en este segundo lote provienen de plantas que no estaban infectadas con el AMV. Con respecto del virus TMV, los porcentajes de detección de la frecuencia viral han sido reportados de hasta 94%⁽¹⁶⁾ en algunas solanáceas, incluido chile. En este trabajo, los porcentajes fueron de 18% a 48%, dependiendo del cultivar, en las semillas analizadas. Por último, en el caso del virus TRSV nuestros resultados mostraron un porcentaje de presencia del virus de 24% a 60% para las semillas provenientes de las diferentes accesiones. En reportes previos se ha encontrado un porcentaje entre el 3 y 100% de este virus en 13 especies de plantas.⁽¹⁷⁾ Existen reportes en los cuales no se encontraron muestras positivas a TRSV en semillas extraídas de frutos provenientes de plantas de chile habanero de diversos genotipos con presencia, incluso de síntomas virales, lo que sugiere que virus de otras especies o familias podrían estar infectando a estas plantas.

En general, los porcentajes de transmisión del AMV, TMV y TRSV son variables, dependiendo de la procedencia de las semillas, etapa de infección de la planta donde se formó el fruto, los porcentajes de humedad de la semilla, estado fisiológico de la planta y estado de madurez del fruto entre otros.⁽¹⁸⁾

En plántulas, los porcentajes de frecuencia viral disminuyeron a un 17.5% para el TMV, a menos de 1% para el TRSV y hasta 0% para el AMV. Estos resultados sugieren que el tratamiento térmico en semillas es efectivo para eliminar para la presencia de virus de ARN en semillas de chile habanero. Dichos resultados son similares a los porcentajes de la transmisión de virus de semilla a plántulas, después de ser sometidas a tratamientos térmicos, los cuales han sido reportados del 1 al 30%.⁽¹⁹⁾

La germinación de las semillas de chile habanero sometidas al tratamiento térmico no mostraron cambios con respecto de las semillas control, ya que éstas germinaron aproximadamente a los 10 días después de la siembra y las plantas presentaron hojas cotiledonarias y desarrollaron hojas verdaderas aproximadamente a los 15 días en el mismo número que las plantas control. Nuestros resultados indican que el tratamiento térmico de 50 °C aplicado en semillas de chile habanero es un método alternativo para disminuir la replicación viral, a pesar de que en algunas otras especies puede inducir efectos negativos en la germinación, crecimiento y desarrollo de las plántulas.⁽²⁰⁾

La obtención de plántulas libres de virus permite la realización de trabajos de investigación, incluyendo estudios de interacción planta-patógeno, eliminando la influencia en la respuesta de la planta de la presencia de virus en semilla. En nuestro caso, estos resultados fueron de gran importancia debido al interés de realizar investigación en dicha área acerca de la interacción entre virus de ADN y un cultivo de suma importancia como el chile habanero. Por lo tanto, una vez conseguido nuestro primer objetivo se procedió a llevar a cabo la inoculación del PepGMV

en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. libres de virus. La infección del PepGMV en las plantas presentó una eficiencia de 50%, ya que únicamente 24 de 48 plantas fueron positivas a la infección del PepGMV. Lo anterior, podría deberse a una baja eficiencia de la técnica o debido a que se ha reportado tolerancia a begomovirus en plantas de *Capsicum chinense* Jacq.⁽²¹⁾ Por el contrario, la especie *Capsicum annuum* ha sido reportada como altamente

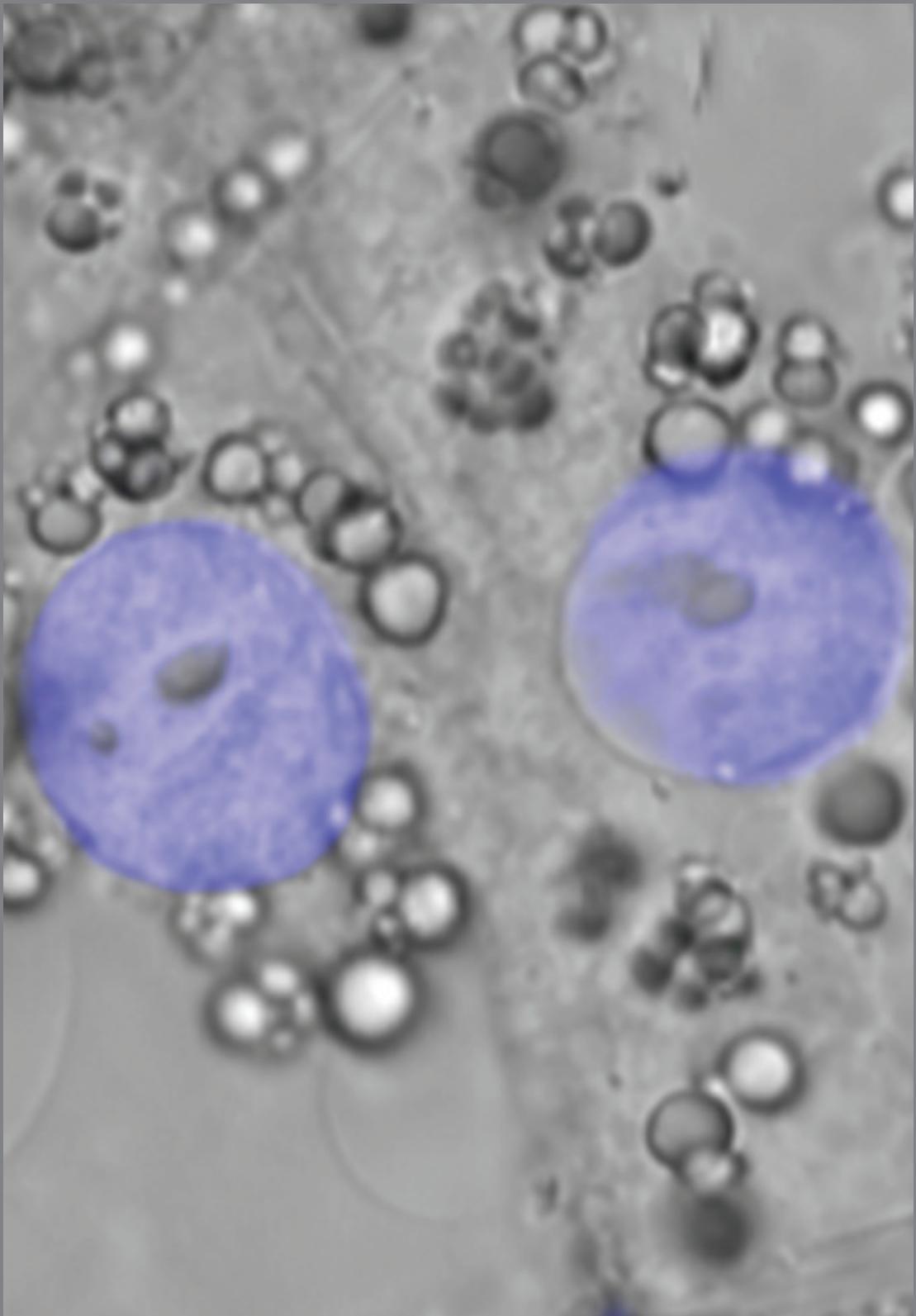
susceptible a la infección por begomovirus,⁽²¹⁾ por lo tanto en nuestro grupo de trabajo se realizó la inoculación de plantas de *Capsicum annuum* var. Anaheim para confirmar la eficiencia de la técnica. Pacheco⁽²²⁾ confirmó la infección del 100% de las plantas inoculadas con el PepGMV. Los resultados sugieren que las accesiones analizadas presentan tolerancia a la infección del PepGMV.

Referencias bibliográficas

- (1) Kantún R. 2008. "Tratamientos térmicos para eliminar virus transmitidos por semilla en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico Agropecuario de Conkal 28-32.
- (2) Gutiérrez O., Zaldívar J., Gutiérrez J. 2006. "Virus fitopatógenos asociados a la semilla de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México". Memorias del Congreso XXXIII Congreso Nacional de Fitopatología, VIII Congreso Internacional de Fitopatología.
- (3) Bauer M. 1991. *Fitopatología* 383-385.
- (4) Ascencio J., Monsalve Z., Pruna M., Díaz R., Rivera R. 2000. "Los geminivirus". *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17:113-127.
- (5) Brown J., Idris A., Torres I., Banks G., Wyatt S. 2001. "The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses". *Arch of Virol* 146:1581 -1598.
- (6) Méndez J., Rivera R., Fauquet C., De la Torre R. 2001. "*Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus* are geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico". *Plant Dis* 85:1291-1291.
- (7) Méndez J., Torres I., Fauquet C., Rivera R. 2003. "Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*". *Phytopathology* 93:270-277.
- (8) Torres I., Garzón J., Brown J., Becerra A., Rivera R. 1996. "Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States". *Phytopathology* 86:1186-1192.
- (9) Bradford M.M. 1976. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- (10) Tun J. 2006. "Transmisión por semilla y respuesta del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) al *Alfalfa mosaic virus* (AMV)". Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados.
- (11) Echevarría I., Sánchez L., Hernández C., Rivera R., Moreno O. 2005. "A simple and efficient method for isolation of ADN in high mucilaginous plant tissue". *Molecular Biotechnology* 31:129-136.

- ⁽¹²⁾ Hernández C., Idris A., Carnevali G., Brown J., Moreno O. 2007. *Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico* 35:825-833.
- ⁽¹³⁾ _____ 2007. "Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the Squash leaf curl virus clade". *Plant Pathology* 56:763-770.
- ⁽¹⁴⁾ Ramsell J., Owusu A. 2008. "The use of biolistic inoculation of cassava mosaic begomoviruses in screening cassava cultivars from Ghana for resistance/susceptibility to cassava mosaic disease". *African Journal of Biotechnology* 7:2353-2358.
- ⁽¹⁵⁾ Carrillo T., Lozoya E., Rivera R. 2006. "Symptom Remission and Specific Resistance of Pepper Plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*". *Virology* 97:51-59.
- ⁽¹⁶⁾ Smith I., Dunes J., Lolliot R., Phillips D., Richer S. 1992. *Manual de enfermedades de las plantas* 33-102.
- ⁽¹⁷⁾ Sutic D., Ford R., Tosié M. 1999. *Handbook of Plant Virus Disease*. CRC Press LLC 553-554.
- ⁽¹⁸⁾ Johansen E., Edwards M., Hampton R. 1994. "Seed transmission of viruses: Current Perspectives". *Phytopathology* 32: 363-386.
- ⁽¹⁹⁾ Agrios G. 1998. *Fitopatología* 2:648-725.
- ⁽²⁰⁾ Bonilla E., Cardozo C., García M. 2006. "Determinación de la condición fisiológica de la semilla de *Capsicum* spp. y efecto del método de secado para su almacenamiento". *Acta Agronómica* 2053: 201-202.
- ⁽²¹⁾ León M. 2004. "Determinación de la expresión genética diferencial en plantas de *Capsicum chinense* Jacq BG-3821, resistentes a infecciones mixtas causadas por los geminivirus PHV y PepGMV". Tesis de Maestría.
- ⁽²²⁾ Pacheco H. 2009. *Datos no reportados*.





Variación intragenómica de la región ITS1-RNAr 5.8S-ITS2 en *Capsicum chinense* Jacq.

Capítulo 18

Josefina Inés Maldonado Borges, Oscar Alberto Moreno Valenzuela, Lucila Aurelia Sánchez Cach, Rosa María Escobedo Gracia-Medrano*

*Autor responsable: escobedo@cicy.mx



Resumen

El estudio molecular en *Capsicum chinense* Jacq., para seis accesiones de tipos raciales que cubren una amplia variación morfológica, mostró la existencia de variación intragenómica debida al polimorfismo en longitud y composición de nucleótidos de la región que se transcribe (ITS1-5.8S RNAr -ITS2) del ADN ribosomal nuclear (ADNr). Se identificaron al menos dos parálogos divergentes por accesión y entre éstos se reconocieron secuencias no-funcionales putativas de pseudogenes mediante el análisis de cambios en contenido de bases GC, estructuras secundarias y patrón de sustitución de nucleótidos de la región codificante (RNAr 5.8S) y la presencia de copias variables de ITS1 con motivos estructurales que las distingue. La presencia de parálogos divergentes en los taxa puede afectar la reconstrucción filogenética, las evidencias en *C. chinense* sugieren que debe extenderse su tipificación a otras especies del género para estudiar las tendencias evolutivas del grupo, en particular para identificar híbridos putativos entre miembros del complejo *C. annum-chinense*.

Palabras clave

Chile habanero, RNAr, ITSs, pseudogenes, copias variables

Introducción

En *Capsicum* las tendencias evolutivas aún no son claras; sumado a eso su taxonomía es compleja. Uno de sus principales problemas es la delimitación de especies y sus relaciones, ya que muchas de ellas muestran características morfológicas similares que dificultan su identificación.⁽¹⁾ Los intentos para inferir las relaciones filogenéticas en especies cercanas como *C. frutescens*, *C. annum* y *C. chinense* aún no están claramente resueltas.^(2,3)

El ADN-ribosomal nuclear (ADNr) del cistron 45S en plantas terrestres, excepto briofitas, consiste de los genes 18S, 5.8S y 26S y sus espaciadores internos que se

transcriben 1 y 2 (ITS), repetido en tándem varios cientos a miles de copias. Cada parólogo está separado por un espaciador intergénico (IGS), las repeticiones en tándem se localizan en uno o más loci en uno o varios cromosomas no-homólogos de un genoma. La información de estas secuencias ha servido en diversos estudios evolutivos.^(4,5,6,7,8) Con información de ITSs se ha resuelto la filogenia de diversos organismos por debajo del nivel genérico, por ello se consideran un marcador candidato para inferir las relaciones dentro de las solanáceas.^(5,9,10)

A pesar de ser buena fuente de información evolutiva, el polimorfismo intragenómico del gen 5.8S DNAr e ITSs puede incluir copias no-funcionales de pseudogenes, que dificultan la reconstrucción filogenética.^(11,12,13) En este trabajo se realizan los análisis para reconocerlos y, en su caso, excluirllos del análisis y recuperar el árbol filogenético correcto.

Resultados

En la Figura 1 se presentan algunas de las características morfológicas de las plantas, flores y frutos de las seis accesiones de *C. chinense* bajo estudio, así como las zonas de colecta.

Utilizando los cebadores ITS4 e ITS5,⁽¹⁴⁾ se amplificó un fragmento de ca. 750 pb que comprende el extremo final del gen 18S hasta el extremo inicial del gen 26S, e incluye los ITS1 y ITS2 así como al gen completo para el ARNr 5.8S de *C. chinense* (Figura 2).

En total, se obtuvieron y analizaron las secuencias de 30 clonas de las accesiones seleccionadas (Cuadro 1), se eliminaron los nucleótidos (nts) correspondientes a los genes 18S y 26S, observándose la variación en la longitud de los fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 recuperados, con un rango que va desde 538 hasta 640 pb.

Las diferencias en la tasa de sustitución de nts promedio de la región del ARNr 5.8S permite discriminar de entre los parálogos del ADNr. Para el análisis de pseudogenes putativos se utilizó el método de dos parámetros de Kimura (MEGA-Versión 4). Se

corroboró la existencia de variación intragenómica a nivel individual e intraespecífico para las accesiones (Cuadro 1). El 83% de las accesiones presentó variación en sus secuencias como: I) diferencias en longitud (inserciones, pérdidas, duplicaciones) II) composición de nucleótidos (transiciones y transversiones). La accesión YU33 (con 7 clonas) presentó la variación intraindividual mayor, mientras que las 5 clonas de la accesión YU7 fueron idénticas. El rango de variación intraespecífica (entre accesiones) para las 30 clonas fue 0.2 a 5.1 %.

Utilizando los valores de porcentaje de identidad, se seleccionaron de 2 a 3 secuencias divergentes por accesión para los análisis posteriores, en las accesiones donde solamente se tenía una clona, dicha secuencia fue utilizada.

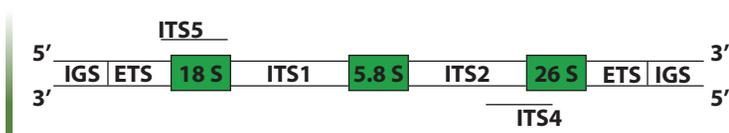
El polimorfismo intragenómico y la presencia de pseudogenes putativos se determinó analizando el contenido de GC y el plegamiento de estructuras secundarias de las regiones codificantes (ADNr 5.8S).

Figura 1
Características de las accesiones de *C. chinense* utilizadas en este trabajo



Se señala la clave de la accesión, el color del fruto y la zona de colecta.

Figura 2
Amplificación de secuencias de ITSs en *C. chinense*



Se señalan los cebadores ITS4 e ITS5 empleados para la amplificación de las secuencias de los ITSs (ITS1 e ITS2).

Cuadro 1
Variación intragenómica en secuencias de *C. chinense*

CLAVE	No. DE CLONAS	RANGO DE VARIACIÓN ITS1-ADNr 5.8S-ITS2	
		INTRAINDIVIDUAL (%)	INTRAESPECÍFICA (%)
YU1	7	0.2 – 0.3	
YU2	5	0.2 -0.7	
YU6	1	--- - ---	
YU7	5	0.0 – 0.0	0.5 – 5.1
YU33	7	0.2 – 1.3	
PE1	5	0.2 – 0.7	30 CLONAS

Se señala el número de clonas para cada accesión y el rango de variación intraindividual e intraespecífica.

Análisis de las secuencias de la región codificante (ARNr 5.8S)

Las secuencias del ADNr 5.8S de *C. chinense* se encuentran altamente conservadas en longitud (164 pb) y en composición de bases. El contenido de GC para dicha región es de 54.8%, los valores inferiores son considerados posibles pseudogenes (clonas: YU1-1, YU1-6, YU2-4, YU2-6, YU6-1, YU33-2, PE1-4 y PE1-9) (Figura 2). En algunas accesiones (YU1-6, YU6-1, YU33-2) se observó la pérdida de 13 pb del nucleótido 143 al 157.

En la región central del ADNr 5.8S de todas las secuencias de *C. chinense* se encontró el motivo 5GAATTGCAGAATCC, que permite descartar problemas de contaminación en preparaciones de ITSs de plantas y el cual se ubica en una región del tallo mayor A de la estructura secundaria del gen (Figura 3, imagen central).

También en la Figura 3 se demuestra que las secuencias de *C. chinense* que perdieron 13 pb tuvieron una estructura secundaria

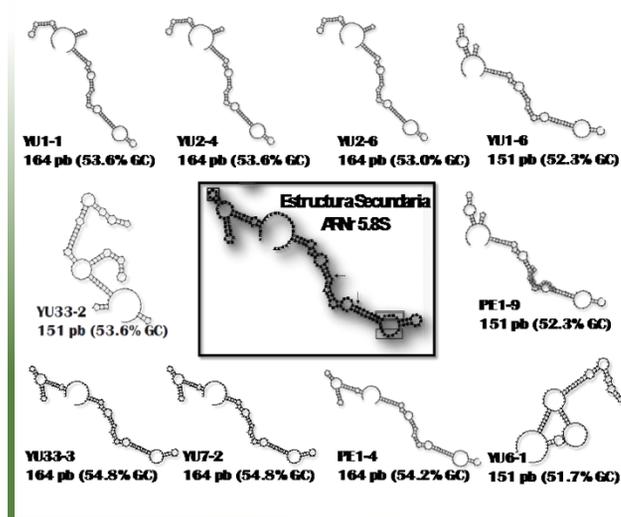
diferente al modelo reportado para el ARNr 5.8S de diferentes especies (*Nicotiana rustica*, *Lilium cestroides*, *Canella winterana*, entre otras) y fueron consideradas pseudogenes (YU33-2 y YU6-1).

Del análisis del patrón de sustitución de nts del gen 5.8S, se fijaron valores superiores a 0.0133 (2 pb) para pseudogenes putativos. La comparación incluyó 150 sitios, los resultados indican que la mayoría de las secuencias incluyó más de dos cambios (parálogos divergentes); excepto las secuencias YU7-2 y YU33-3, cuya estructura secundaria corresponde con el modelo reportado para este gen en otras especies (genes parálogos).

Análisis de las secuencias de los espaciadores (ITSs)

Las secuencias del ITS1 de *C. chinense* fueron variables en longitud, de 233 a 250 pb. En el alineamiento se observó que algunas secuencias presentaban pérdidas, inserciones, duplicaciones, transiciones y/o transversiones que afectan el papel estructural de este

Figura 3
Estructuras secundarias y contenido de G+C del ARNr 5.8S de diferentes clonas de *C. chinense*



En el recuadro central se señala la estructura secundaria modelo y algunas regiones importantes para la transcripción del ADNr 5.8S. El motivo 5'GAATTGCAGAATCC se señala con flechas.

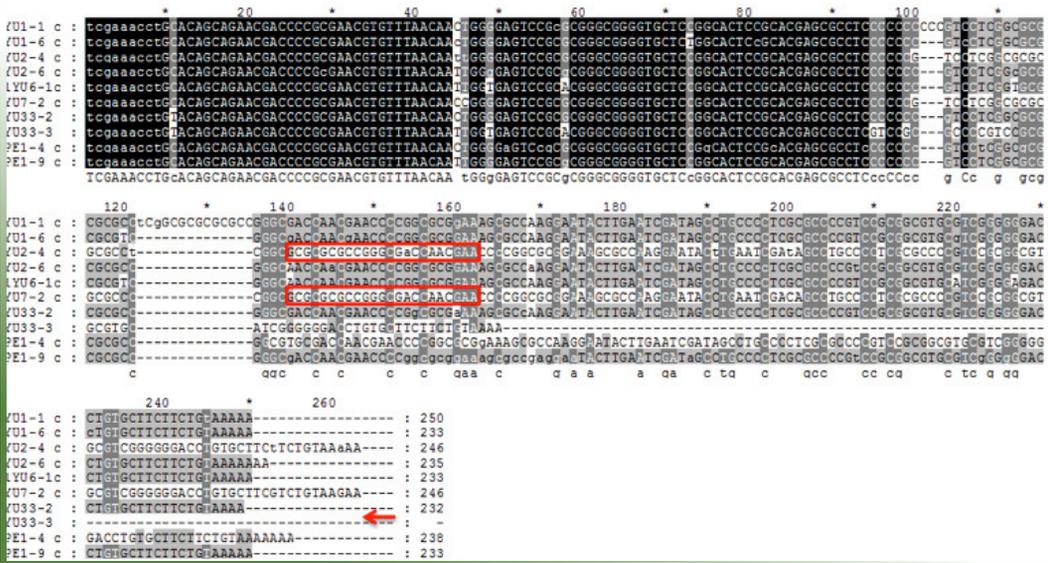
espaciador (copias variables). Solamente las secuencias YU2-4 y YU7-2 tuvieron en su región central, del nucleótido 137 al 158, un motivo relacionado con la transcripción de genes ribosomales. Los principales cambios observados consistieron en transiciones y transversiones, en algunos casos pérdidas de fragmentos de diferente longitud; por ejemplo, la secuencia YU33-3 no presentó 92 pb (Figura 4).

El motivo relacionado con transcripción también ha sido encontrado en otras especies como *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (Figura 5).

Se observó una longitud conservada de 226 pb para todas las secuencias del ITS2 de *C. chinense*, con pocos cambios en la composición de sus bases (únicamente transiciones). En las secuencias de *Capsicum chinense*,

Figura 4

Alineamiento de secuencias del ITS1 de diferentes accesiones de *C. chinense*



Con un recuadro rojo se señala un motivo relacionado con la transcripción de genes ribosomales. Con una flecha se indica la pérdida de un fragmento de 92 pb.

Figura 5

Estructura del motivo conservado en la región central del ITS1 de diferentes especies de plantas

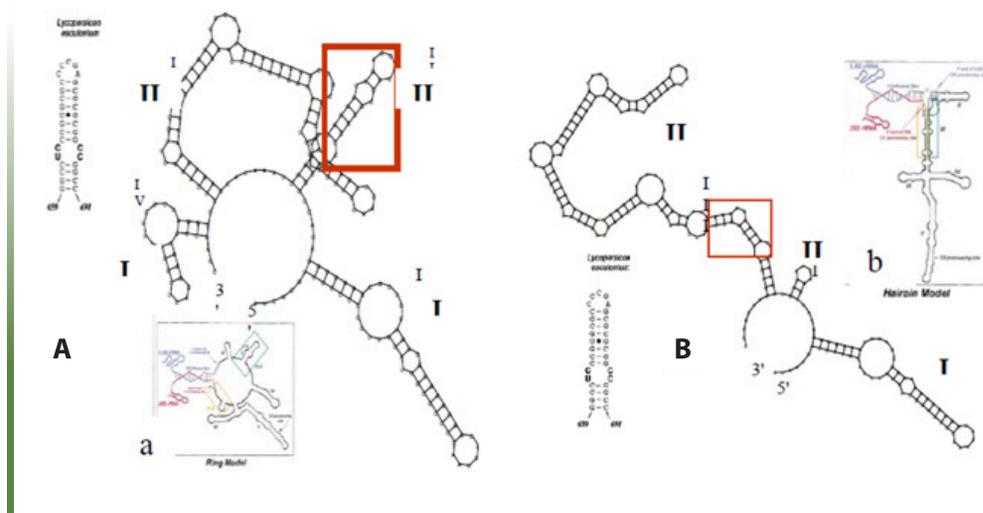


A: *Arabidopsis thaliana*; B: *Oryza sativa*; C: *Capsicum chinense*.

Solanum lycopersicum, *Vicia faba*, *Cucumis melo*, *Daucus carota*, entre otras, se encuentra un motivo conservado en la hélice II de su estructura secundaria. Asimismo, en el ITS2 de *Saccharomyces cerevisiae* se reportan dos modelos conformacionales para su

estructura secundaria; el modelo en anillo y el modelo en horquilla. Todas las secuencias del ITS2 de *C. chinense* adoptaron un plegamiento que corresponde al modelo en horquilla (Figura 6).

Figura 6
**Estructuras conformacionales del ITS2
de secuencias de *C. chinense***



Modelo en anillo (A) y modelo en horquilla (B) en los recuadros a y b se señalan ambos modelos en *S. cerevisiae*. En un rectángulo se resalta el motivo conservado en ambas estructuras.

Discusión

En este trabajo se confirmó la presencia de polimorfismo intragenómico en la región ITS1-5.8S-ITS2 de *Capsicum chinense*, la longitud varía de 538 hasta 640 pb. Los reportes indican longitudes mayores en otras especies del género (680 a 750 pb).⁽¹⁵⁾ Se encontró variación intraindividual en las clonas de una misma accesión de chile habanero; no obstante, se tienen datos que señalan que esta variación es aún mayor entre accesiones de *C. baccatum*. La variación intraespecífica fue del rango 0.2 a 5.1%; sin embargo, el polimorfismo es mayor en otra especie (*C. pubescens*).⁽¹⁶⁾

Debido a que valores altos de polimorfismo intraindividual e intraespecífico reflejan la presencia de pseudogenes, su existencia se confirmó por la disminución en contenido de GC, los cambios en las estructuras secundarias^(12,17) y sustituciones de nucleótidos de la región codificante, al igual que por motivos estructurales en ambos espaciadores.^(9,18,19) La existencia de numerosas secuencias de pseudogenes putativos fue evidente al comparar el contenido de GC del ADNr 5.8S encontrándose valores inferiores a 54.8%, el plegamiento de estructuras secundarias mostró que solamente dos secuencias (YU7-2, YU33-3) lo hacen correctamente. Las

accesiones de *C. chinense* que perdieron 13 pb, del nucleótido 143 al 157, presentaron una estructura secundaria diferente a los reportes. Asimismo, todas las secuencias exhibieron el motivo 5'GAATTGCAGAATCC, que confirma su identidad vegetal y ausencia de contaminación.⁽¹⁷⁾

Los pseudogenes se caracterizan por una acelerada velocidad de evolución y la dificultad de construir una estructura secundaria apropiada, relacionada con cambios en las regiones codificantes.⁽¹²⁾ En el caso de las secuencias espaciadoras (ITSs), el correcto plegamiento resulta en estructuras secundarias importantes para la transcripción de genes ribosomales; a pesar de no ser codificantes, pueden acumular sustituciones que reducen su estabilidad estructural; sin embargo, no es apropiado considerarlas pseudogenes sino copias variables.^(11,20)

En nuestro caso, la mayoría de las secuencias ITS1 de *C. chinense* resultaron ser copias variables. La longitud y composición de bases nucleotídicas del ITS1 en *C. chinense* fue ampliamente variable (233 a 250 pb),

el motivo conservado GGCGCGGAAAGC-GCCAAGGAA,⁽¹⁸⁾ clave en el procesamiento del transcrito del ADNr, se encontró únicamente en la región central del ITS1 de dos secuencias de las clonas YU2-4 y YU7-2. En cuanto a las secuencias del ITS2, la longitud es conservada (226 pb) y solo presentaron algunas transiciones. La información de ambos espaciadores difiere a los reportes previos en chiles.⁽¹⁵⁾

La existencia de pseudogenes del gen 5.8S y copias variables de ITSs en accesiones de *C. chinense* sugieren una evolución concertada incompleta dentro del género. Al incluir secuencias funcionales y pseudogenes en análisis filogenéticos, los soportes estadísticos disminuyen y las relaciones interespecíficas se hacen incongruentes.^(11,21) Al realizar el análisis únicamente con secuencias funcionales, los soportes estadísticos de los mismos incrementan (datos no presentados aquí), lo cual es importante para la correcta determinación de las relaciones filogenéticas en este y otros géneros de solanáceas y para esclarecer las relaciones del complejo *C. annum-C. chinense*.

Conclusiones

- El análisis del contenido de GC, el plegamiento de estructuras secundarias y del patrón de sustitución de nucleótidos en el ADNr 5.8S permitió la detección de probables pseudogenes.
- La presencia de motivos conservados en las secuencias de los espaciadores de los genes ribosomales (ITSs) permitió la detección de copias variables únicamente en el ITS1.
- El ITS2 se encuentra mejor conservado que el ITS1, tanto en longitud como en composición de nucleótidos.
- La detección de pseudogenes putativos y copias variables en secuencias de genes ribosomales permite una mejor resolución de las relaciones de parentesco durante la reconstrucción filogenética.

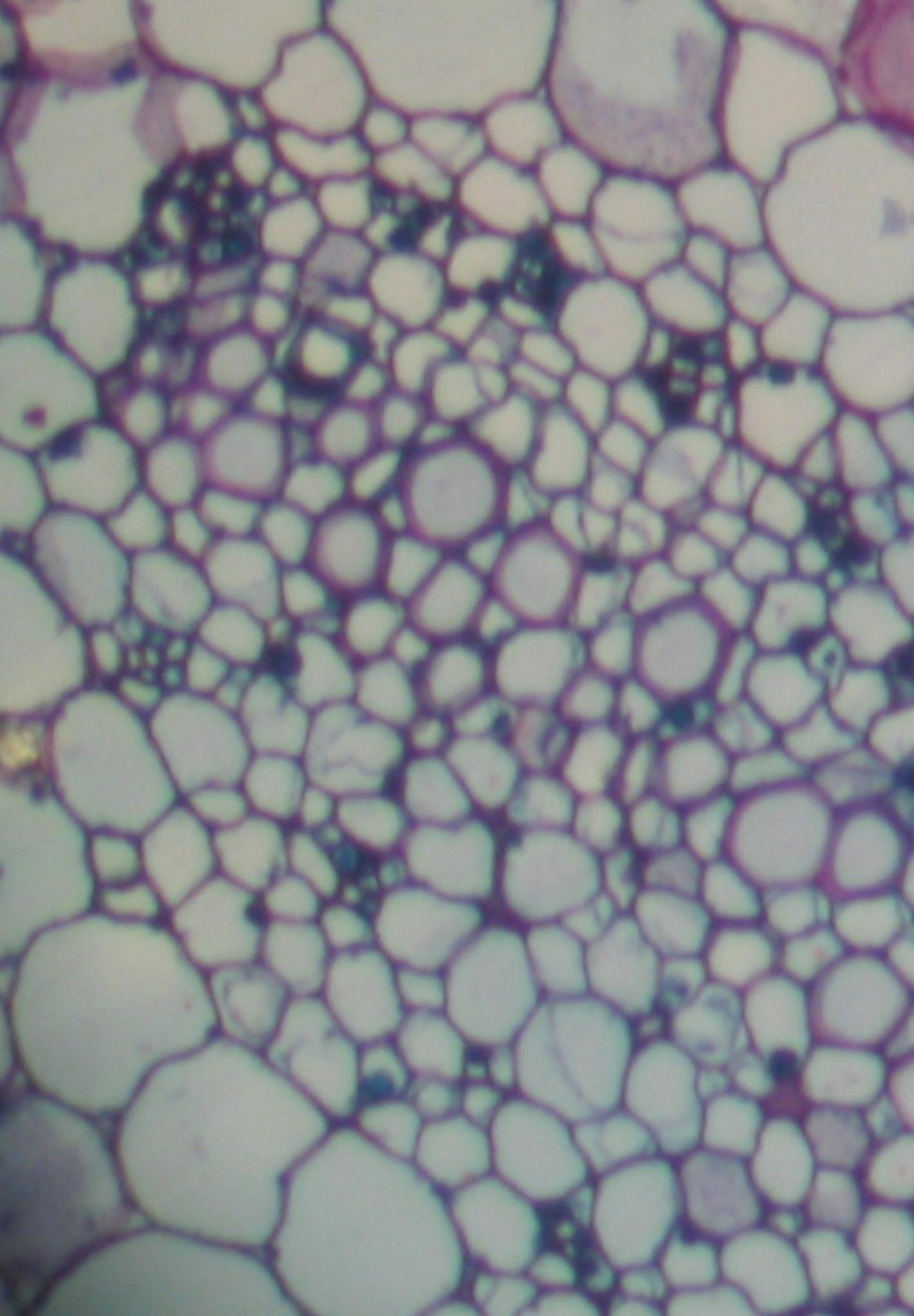
Agradecimientos

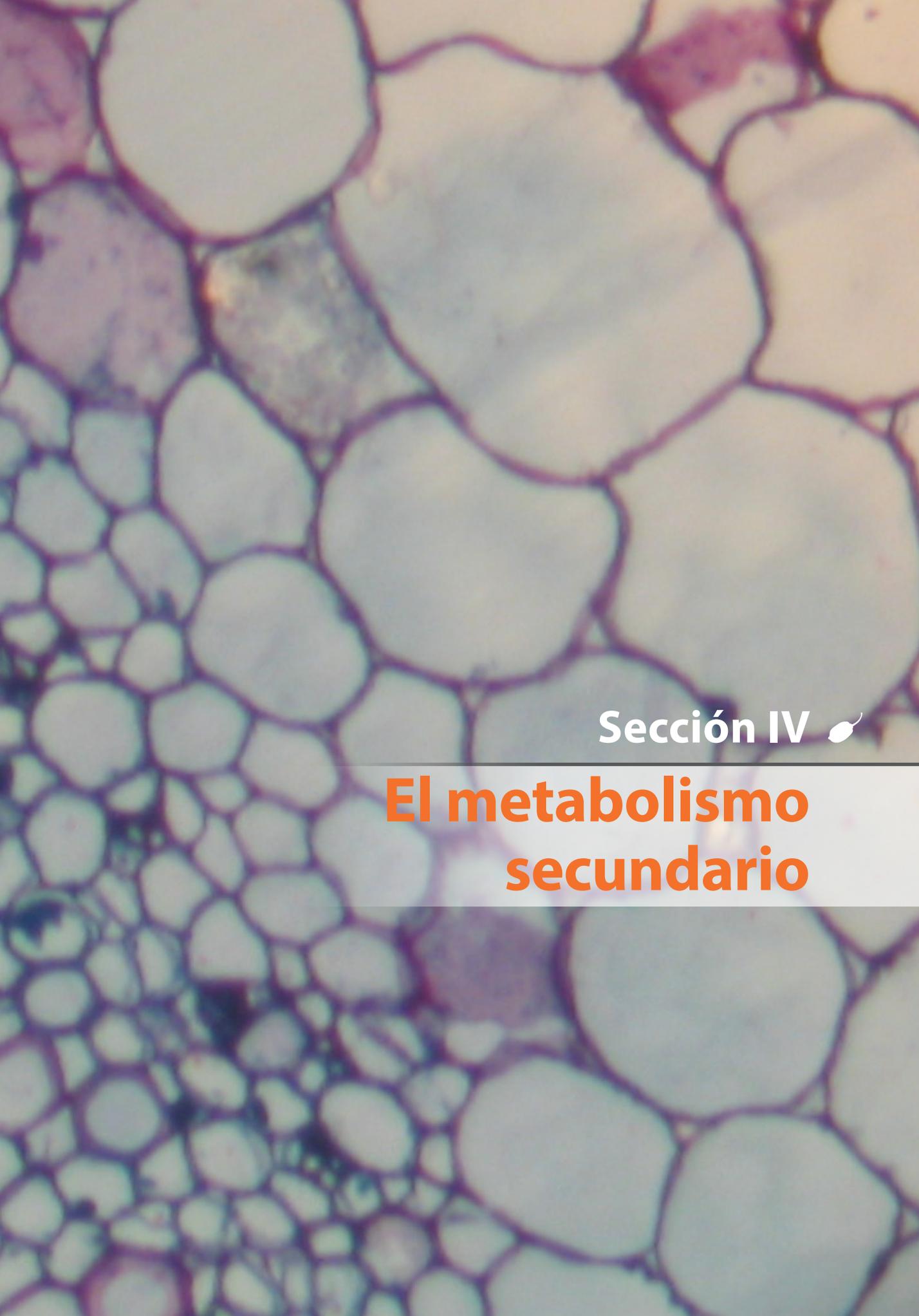
Este trabajo formó parte del proyecto "Androgénesis *in vitro* encaminada a la obtención de líneas di-haploides (DH) de genotipos de chile" con apoyo Fiscal (RME). La realización de este trabajo también fue posible gracias al apoyo económico otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de maestría (195131) para Josefina Inés Maldonado Borges. Se agradece al Ing. Fernando Contreras por su apoyo del trabajo de vivero.

Referencias bibliográficas

- (1) Walsh B., Hoot S. 2001. "Phylogenetic relationship of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpB-rbcL spacer region and nuclear *waxy* introns". *Int. J. Plant Sci.* 162(6):1409-1418.
- (2) Loaiza F., Ritland K., Laborde C., Tanksley S. 1989. "Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (Solanaceae) in Mexico". *Plant Syst. Evol.* 165:159-188.
- (3) Hernández S., Dávila P., Oyama K. 1999. "Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*". *Bol. Soc. Bot.* 64:65-84.
- (4) Xiao L., Möller M., Zhu H. 2010. "High nrDNA ITS polymorphism in the ancient extant seed plant *Cycas*: Incomplete concerted evolution and the origin of pseudogenes". *Mol Phylogen. Evol.* 55 (1): 168-77.
- (5) Baldwin B., Sanderson M., Porter J., Wojciechowski M., Campbel C., Donoghue M. 1995. "The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a variable source of evidence of angiosperm phylogeny". *Ann. Miss. Bot. Garden.* 82:247-277.
- (6) Soltis D., Soltis P., Doyle J. 1998. "Molecular evolution of 18S rDNA in angiosperms: implications for character weighting in phylogenetic". In: Kluwer Academic Publishers, *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, Boston pp. 188-248.
- (7) Savolainen V., Chase M. 2003. "A decade of progress in plant molecular phylogenetics". *Trends in Genetics* 19 (12):717-727.
- (8) Hajibabaei M., Singer G., Hebert P., Hickey D. 2007. "DNA barcoding: how its complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics". *Trends in Genetics* 23(4):167-172.
- (9) Mai J., Coleman A. 1997. "The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants". *J. Mol. Evol.* 44: 258-271.
- (10) Hughes K., Petersen R., Johnson J., Moncalvo J., Vilgalys R., Redhead S., Thomas T., McGhee L. 2000. "Infrageneric phylogeny of *Collybias* s.str. based on sequences of ribosomal ITS and LSU regions". *Mycol. Res.* 105:164-172.
- (11) Buckler E., Ippolito A., Holtsford T. 1997. "The Evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications". *Genetics* 145:821-832.
- (12) Razafimandimbison S., Kellogg E., Birgitta B. 2004. "Recent Origin and Phylogenetic Utility of Divergent ITS Putative Pseudogenes: A Case Study from *Nauclea* (*Rubiaceae*)". *Syst. Biol.* 53(2):177-192.

- ⁽¹³⁾ Roselló J., Lázaro A., Cosín R., Molins A. 2007. "A phylogeographic split in *Buxus balearica* (*Buxaceae*) as evidenced by nuclear ribosomal markers: when ITS paralogues are welcome". *J. Mol. Evol.* 64:143-157.
- ⁽¹⁴⁾ Marshall J., Knapp S., Davey M., Power J., Cocking E., Bennett M., Cox A. 2001. "Molecular systematics of Solanum section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA región". *Theor. Appl. Genet.* 103:1216–1222.
- ⁽¹⁵⁾ Ryzhova N., Goryunova A., Tomilov A., Kochieva E. 2002. "Two types of rDNA internal transcribed spacers (ITS) in the *Capsicum* genome". *Doklady Biol. Sci.* 387:539-541.
- ⁽¹⁶⁾ Maldonado B.J. 2007. Filogenia molecular en *Capsicum*. Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- ⁽¹⁷⁾ Jobes D., Thien L. 1997. "A conserved motif in the 5.8S ribosomal RNA (rRNA) gene is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer (ITS) sequences". *Plant Mol. Biol.* 15:326-334.
- ⁽¹⁸⁾ Liu J., Schardl C. 1994. "A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes". *Plant Mol. Biol.* 26:775-778.
- ⁽¹⁹⁾ Colette A., Greer C., Peculis B. 2002. *Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast.* *RNA* 8:786-797.
- ⁽²⁰⁾ Gernandt D., Liston A. 1999. "Internal transcribed spacer region evolution In *Larix* and *Pseudotsuga* (*Pinaceae*)". *Amer. J. Bot.* 86 (5):711–723.
- ⁽²¹⁾ Bailey C., Carr T., Harris S., Hughes C. 2003. "Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes". *Mol. Phylogen. Evol.* 29:435-455.



A microscopic image of a plant stem cross-section. The image shows large, thin-walled parenchyma cells in the cortex and a vascular bundle in the center. The vascular bundle contains xylem on the inner side and phloem on the outer side. The cells are stained with a purple dye, likely iodine, which highlights the cell walls and some internal structures.

Sección IV 

El metabolismo secundario



Estudios sobre metabolismo nitrogenado en placentas de *Capsicum chinense* Jacq.

Capítulo 19

María de Lourdes Miranda-Ham,* Lizbeth Castro-Concha,
Wendy Ancona-Escalante, Fray M. Baas-Espinola
y Carolina Roca-Mézquita
*Autor responsable: mirham@cicy.mx



Resumen

Aunque la capacidad anabólica de las placentas de los frutos del género *Capsicum* ha sido ampliamente demostrada en lo que se refiere a la síntesis de capsaicinoides, no existen estudios sobre el origen de los intermediarios que darán lugar a estos compuestos, responsables de su carácter picante. Haciendo uso de un sistema experimental novedoso, el cultivo *in vitro* de placentas enteras recubiertas con alginato de calcio, se demostró que a partir del nitrógeno inorgánico en el medio, el tejido placentario es capaz de sintetizar aminoácidos que darán lugar a los precursores de los capsaicinoides.

Palabras clave

Metabolismo nitrogenado, placentas, capsaicinoides

Introducción

Además de su participación en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, las plantas pueden utilizar el nitrógeno para la síntesis de un gran número de metabolitos secundarios como los alcaloides y ciertas amidas. En los frutos del chile (género *Capsicum*), específicamente en la placenta, se acumula un grupo de compuestos nitrogenados, conocido como capsaicinoides, que le confieren su característico sabor picante. Debido a su localización y a los efectos que producen, se ha propuesto que los capsaicinoides participan en la defensa de las semillas contra depredadores.⁽¹⁾ La acumulación de capsaicinoides, mayoritariamente representados por la capsaicina y la dihidrocapsaicina, es sensible a diferentes condiciones ambientales, incluyendo la disponibilidad de nitrógeno en el suelo.^(2,3)

Por otro lado, las placentas aisladas de chile son capaces de permanecer metabólicamente activas y viables por largos periodos, cuando se cultivan en un medio con sales minerales de nitrógeno como única fuente, manteniendo su capacidad

de síntesis de capsaicina.⁽⁴⁾ Estos datos sugieren que aun en estas condiciones de disponibilidad de nitrógeno, el tejido puede suministrar aminoácidos para la formación de metabolitos nitrogenados no esenciales, manteniéndose viable.^(4,5) De este modo, es posible pensar que el tejido placentario posee las enzimas necesarias para incorporar el nitrógeno inorgánico en aminoácidos, incluyendo la fenilalanina.

Más aún, con la identificación y aislamiento de un total de 13 genes involucrados en el proceso, se ha logrado establecer que la expresión de éstos es específica para la placenta y que antecede por unas horas, a la acumulación de capsaicina.⁽⁶⁾ En este tejido, la capsaicina se acumula en las vacuolas de las células de la epidermis que llegan a formar ampollas llenas de este compuesto.⁽⁷⁾ De hecho, parte del complejo enzimático para la formación de la cadena lateral acilo de la capsaicina está localizada precisamente en las células epidermales de la placenta.⁽⁸⁾

Las placentas inmovilizadas en espuma de poliuretano tienen una mayor capacidad que las células inmovilizadas en el mismo material,⁽⁹⁾ aunque no hay diferencias en la capacidad de acumulación de capsaicina entre placentas libres o inmovilizadas.⁽¹⁰⁾ Las placentas inmovilizadas también responden a la inducción con hongos fúngicos o jasmonato, aumentando la acumulación de capsaicina. Además, la adición de ácido ferúlico a placentas cultivadas *in vitro* duplica la acumulación de capsaicina; sin embargo, el añadir ácido cafeico, que antecede al ferúlico en la ruta de síntesis, no tuvo ningún efecto, al igual que la de valina.^(9,11) Estos datos indican que la capacidad de síntesis de capsaicina en estos tejidos puede ser modificada por las condiciones del cultivo, sugiriendo una interacción entre tejido y medio.

En cultivos celulares, el exceso de fenilalanina, ya sea suministrado exógenamente^(4,12) o producida intracelularmente,⁽¹³⁾ puede canalizarse hacia la síntesis de capsaicoides, y esto se correlaciona con un aumento en la actividad de la PAL.⁽¹³⁾ Al igual que en plantas, también en cultivos de células en suspensión, la composición nitrogenada del medio tiene efectos sobre el contenido de capsaicina, lo que sugiere una relación entre la disponibilidad de nitrógeno y la síntesis de capsaicina.⁽¹⁴⁾

No obstante lo anterior, no existen trabajos sobre el posible origen de la fenilalanina utilizada en las placentas para la síntesis de la capsaicina; es decir, no hay reportes sobre si ésta se forma en el mismo tejido o si es importada a partir de otros. De hecho, aparte de los estudios sobre la síntesis de capsaicina, existe poca información acerca del metabolismo primario en el tejido placentario y dicha información se relaciona principalmente con el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos en tomate⁽¹⁵⁾ y en chile,⁽¹⁶⁾ respectivamente.

Tanto en plantas como en cultivos *in vitro* existe una relación entre el contenido de capsaicina y la disponibilidad de nitrógeno. De este modo, la eficiencia celular en el uso del nitrógeno puede reflejarse directamente en la capacidad de síntesis de fenilalanina, y puesto que en chile la disponibilidad de este aminoácido promueve la acumulación de capsaicina, es posible que exista una relación entre la asimilación del nitrógeno, la síntesis de fenilalanina y la de capsaicina.

Este estudio ha propuesto analizar el metabolismo nitrogenado y su posible relación con la síntesis de fenilalanina y de capsaicina en placentas aisladas y recubiertas de alginato de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), una de las especies de mayor picor por su elevado contenido de capsaicina. El objetivo principal es estudiar estos tres procesos en placentas con el fin de establecer si están relacionados y el nivel en que lo están. En este punto, se debe mencionar que para que ocurra la síntesis de alcaloides derivados del triptofano en *Catharanthus roseus* es necesario que se activen de manera coordinada las enzimas que participan en la formación del triptofano y en su canalización hacia la síntesis de dichos alcaloides. Este proceso es controlado mediante la participación de proteínas regulatorias, llamadas ORCA.^[17] Es posible que mecanismos regulatorios similares operen sobre la síntesis de otros metabolitos secundarios, como la capsaicina.

Resultados

Se estableció un cultivo *in vitro* de placentas recubiertas de alginato, capaz de mantenerse viable y metabólicamente activo durante 7-9 días (Figuras 1 y 2). Este cultivo representa un modelo ventajoso para el estudio de diferentes procesos bioquímicos en el tejido placentario, pues es un sistema cerrado que permite controlar de manera más estricta las condiciones ambientales y de suministro de nutrientes y precursores que en plantas completas. Si bien el uso de suspensiones celulares también permite este control, la capacidad biosintética en éstas es muy limitada en comparación con la de la placenta íntegra.

El sistema se caracterizó mediante la medición del pH y la conductividad, parámetros indirectos que permiten establecer que un cultivo está creciendo cuando se trata de células en suspensión; sin embargo, en este caso se utilizaron como indicadores de que había un flujo activo entre las placentas y el medio de cultivo.

El recubrimiento de las placentas permitió preservar su integridad, pues se sabe que al poner cualquier tejido vegetal en un medio líquido éste tenderá a disgregarse

y/o a liberar células individuales, por lo que la capa de alginato de calcio previno este fenómeno.

Figura 1

Planta de chile habanero de la variedad Chak k'an-iik utilizada para los estudios de metabolismo nitrogenado



Adicionalmente, mediante microscopía electrónica de barrido, se determinó que al inicio del ciclo de cultivo, las vesículas en las que se acumulan los capsaicinoides están presentes en un número adecuado y sin daño visible en las placentas recubiertas, lo que sugiere que el proceso de recubrimiento no produjo daños mayores a la estructura del tejido. No obstante, hacia el final del periodo de cultivo, estas vesículas pierden su integridad, permitiendo que estos metabolitos sean liberados al medio de cultivo.

Haciendo uso de este modelo experimental novedoso, en nuestro grupo se ha demostrado que las enzimas involucradas en la reducción del nitrato hasta amonio (nitrato reductasa, NR y nitrito reductasa, NiR),^(18,19) así como aquellas encargadas de la asimilación del amonio a moléculas orgánicas (ciclo de la glutamino sintetasa/glutamato sintasa, GS/GOGAT y la glutamato deshidrogenasa, GDH),⁽²⁰⁾ se encuentran funcionales en las placentas de chile habanero, así como que la ruta preferencial de asimilación de amonio es el ciclo GS/GOGAT, al igual que ocurre en la mayoría de especies vegetales. El hecho que la placenta sea capaz de incorporar nitrógeno inorgánico en estos primeros aminoácidos, que dan lugar a muchos más, abre la puerta a la posibilidad de que también pueda soportar la síntesis completa de capsaicinoides a partir de nitrógeno inorgánico.

Una vez que se estableció que las placentas tienen la capacidad de producir sus propios aminoácidos a partir de fuentes minerales, se propusieron dos estrategias para establecer la posible relación del metabolismo primario del nitrógeno con la síntesis de capsaicinoides. La primera implicaba el uso de inductores probados del metabolismo secundario, el ácido salicílico (AS) y el jasmonato de metilo (MeJa), para aumentar el contenido de capsaicinoides en las placentas, y así analizar si estos aumentos mostraban algún tipo de

relación con las enzimas del metabolismo nitrogenado. En la segunda, se varió el contenido total del nitrógeno disponible, factor que tiene una influencia directa sobre las enzimas a estudiar, y entonces observar si había efecto sobre el contenido de capsaicinoides.

En el primer caso se demostró que había aumento en el contenido de capsaicinoides cuando se les adicionaban a las placentas, ya fuera AS o MeJa; sin embargo, no se detectaron variaciones significativas en las actividades de las enzimas de la asimilación primaria del nitrógeno que pudieran correlacionarse con esos incrementos. Mientras que en el segundo caso, al someter las placentas a una concentración limitante de nitrógeno total, se apreció también un aumento en la acumulación de capsaicinoides, pero una disminución en las actividades de estas enzimas. Esto parece indicar que no existe una relación directa entre el proceso de asimilación primaria del nitrógeno y la síntesis de capsaicinoides, y sugiere un posible reciclado o redireccionamiento de los aminoácidos u otras moléculas nitrogenadas contenidos en el tejido hacia la síntesis de capsaicina. En este sentido es de notarse que aun cuando no hay aumentos significativos en las actividades de las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno, las pozas de nitrato, amonio y aminoácidos permanecen constantes, lo que permitiría entonces que las placentas tengan disponibles los precursores para la síntesis de capsaicinoides.^(21,22)

Una vez establecido que un aumento en la síntesis de capsaicina podría ocurrir sin aumentar la asimilación primaria del nitrógeno, se analizaron las enzimas involucradas directamente en la formación de precursores, concretamente las enzimas encargadas de la síntesis de fenilalanina, que es un precursor directo de los capsaicinoides. Se pudo medir por primera vez en tejido placentario la actividad de la corismato

mutasa (CM), una enzima que es una llave de flujo entre la vía del shikimato y aquellas que darán lugar, por un lado, al triptófano, y por el otro, a la fenilalanina y la tirosina. Se observó que durante la maduración del fruto hay dos etapas en las que la actividad de la CM es crucial para aumentar el contenido de aminoácidos, lo que redundará en un aumento en la acumulación de capsaicinoides en las placentas.⁽²³⁾

Se determinó también que hay un aumento gradual de la actividad de PAL durante los primeros tres estadios de desarrollo de los frutos de chile habanero teniendo la máxima actividad específica a los 20 días post-antesis. A partir del estadios posteriores (25-30 días post-antesis) se presentó una disminución de la actividad de PAL, hasta alcanzar los niveles más bajos en los frutos totalmente maduros.

Puesto que nuestro interés se ha centrado en analizar la capacidad metabólica del

tejido placentario, en una primera etapa nos hemos enfocado en los valores de actividad enzimática. Sin embargo, dado que estas enzimas despliegan complejos mecanismos regulatorios que incluyen controles transcripcionales, también se incluyeron este tipo de estudios.

Debe mencionarse que hubo de realizarse estudios que no se tenían contemplados en la propuesta original, pues se tuvo que estudiar en primera instancia la ontogenia de los frutos para determinar la mejor edad fisiológica para poder escindir las placentas y llevarlas al cultivo *in vitro*. Los resultados indicaron que la edad ideal era entre 25-30 días post-antesis, pues es en este estadio cuando las placentas presentan una mayor acumulación de capsaicinoides, por lo que las enzimas involucradas en la síntesis de los precursores deberían estar funcionando a capacidad.

Figura 2

A. Corte longitudinal de un fruto de chile habanero
B. Cultivo *in vitro* de placentas



Dado que se carecía de referentes sobre el metabolismo nitrogenado en chile habanero o en placentas de otras especies, se compararon los valores de actividad enzimática encontrados en las placentas con los que se determinaron en hojas y raíces de plantas jóvenes y maduras de chile habanero. También se analizaron los valores en las placentas de frutos durante el proceso natural de maduración. Estos últimos datos permitieron diferenciar el tipo de proceso que ocurre en las placentas recubiertas en cultivo con aquellos que se dan producto del desarrollo, maduración y senescencia propios del fruto.

Finalmente, se tiene evidencia de que las placentas de chile habanero tienen una

gran concentración tanto de ácido ascórbico como de glutatión reducido, que permiten un sesgo del balance redox celular hacia un estado reductor que facilita los procesos anabólicos. Este hallazgo, entonces, daría lugar a la existencia del poder reductor necesario para el funcionamiento de las enzimas que requieren NADH o NADPH como cofactores.⁽²⁴⁾

La obtención de estos datos han permitido darle un marco más integral a los resultados de las enzimas para tratar de explicar cómo las placentas de chile habanero utilizan el nitrógeno que se les suministra en el medio de cultivo para la síntesis de capsaicinoides.

Discusión

Para alcanzar los objetivos propuestos se utilizó como sistema experimental el cultivo *in vitro* de placentas recubiertas con una película de alginato. Este proceso de recubrimiento, por el cual el tejido es aislado físicamente por medio de una barrera semipermeable, permitió que las placentas se mantuvieran viables y metabólicamente activas hasta un periodo de hasta cinco días después de su establecimiento.⁽²⁰⁾ Este sistema experimental, por un lado posee las ventajas del sistema *in vitro*, es decir, condiciones controladas, permitiendo conservar cierto grado de organización, que es muy importante para la biosíntesis de los metabolitos secundarios.⁽²⁵⁾

Las placentas son capaces de reducir el nitrato a amonio^(18,19) para incorporarlo a una forma orgánica como glutamato y glutamina.⁽²⁰⁾ El amonio es la principal fuente de nitrógeno para este tipo de tejido, al menos bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, para poder establecer si había una relación entre las enzimas de asimilación primaria y

la síntesis de capsaicinoides se desarrolló una estrategia para activar la síntesis de capsaicinoides de dos formas diferentes: primero, con la inducción del metabolismo secundario, y segundo, con la modificación de la cantidad total de nitrógeno que repercutiría sobre las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno.

Tanto el AS y el MeJa son capaces de provocar un aumento en la acumulación de los capsaicinoides, tanto en células en suspensión de *C. chinense*⁽²⁶⁾ como en placentas de *C. annum*⁽²⁷⁾ y se ha demostrado que el uso de diferentes cantidades de nitrógeno afecta la síntesis de capsaicinoides.⁽³⁾

Los resultados mostraron que a pesar de que el AS y el MeJa indujeron un aumento en la acumulación de los capsaicinoides, las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo primario del nitrógeno no se vieron afectadas por los tratamientos de inducción. De este modo, en las condiciones ensayadas la activación del metabolismo

secundario no requiere de la activación del metabolismo básico.

Es posible que los efectos tanto del AS como del MeJa ocurran sobre la actividad de las enzimas que se encuentren cercanas a la síntesis de los precursores (fenilalanina), como la corismato mutasa o la arogenato deshidratasa, o bien, solo sobre aquellas enzimas directamente involucradas con la síntesis de los capsaicinoides.

Por otro lado, al evaluar el efecto de la disminución en la cantidad total de N en el medio de cultivo, se presentó un incremento sobre la acumulación de capsaicinoides, sin que hubiera cambios importantes en las actividades de las enzimas de asimilación

de amonio. Este aumento se dio incluso sin la modificación en los niveles de las pozas de aminoácidos o amonio.

Los datos sugieren que bajo las condiciones evaluadas no existe una relación directa entre los dos procesos, pues aunque hay una disminución de las actividades de las enzimas de asimilación de amonio, las placentas fueron capaces de acumular una elevada cantidad de capsaicinoides.

Hasta ahora, este es el primer reporte de un trabajo de esta naturaleza en *Capsicum chinense*, en donde se describe el papel de las enzimas involucradas en la asimilación primaria del nitrógeno en relación con la síntesis de los capsaicinoides.

Conclusiones

Las placentas inmovilizadas de chile habanero han demostrado ser un buen modelo para el estudio del metabolismo primario de nitrógeno. Hoy por hoy, en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que este tejido es capaz de incorporar este elemento de una forma inorgánica a una orgánica, es decir, que en las placentas se encuentran funcionales las enzimas NR, NiR, GS/GOGAT-NADH y GDH-NAD(H). Además, también se reportó la funcionalidad de una enzima más que participa de manera importante en la síntesis del precursor fenilalanina: la corismato mutasa.

El jasmonato de metilo y el ácido salicílico indujeron un aumento en la acumulación de los capsaicinoides (tanto capsaicina como dihidrocapsaicina) en el cultivo de placentas; sin embargo, estos dos inductores no demostraron tener un efecto directo sobre las actividades de las enzimas involucradas en el metabolismo primario del nitrógeno.

Una disminución en la concentración de nitrógeno total del medio de cultivo repercute en una disminución de la actividad de las enzimas de asimilación de amonio; no obstante, la cantidad de capsaicinoides encontrada en el tejido placentario se ve aumentada.

Los tratamientos con jasmonato de metilo y ácido salicílico sobre las placentas no modificaron las pozas endógenas de aminoácidos y amonio, ocurriendo lo contrario cuando hubo una disminución en la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. De este modo, el aumento en la síntesis de capsaicinoides no requiere, al menos en las condiciones ensayadas, la asimilación primaria de nitrógeno, probablemente porque los inductores promueven la transformación de intermediarios tardíos. Con este trabajo se amplía la visión integral del metabolismo nitrogenado que se encuentra asociado a la síntesis de los capsaicinoides y que de alguna manera provee de los precursores necesarios para que ésta ocurra.

Agradecimientos

Se agradece la asesoría técnica del Ing. Fernando Contreras para el establecimiento de las plantas de chile en los invernaderos del CICY, y de los Ing. Eduardo Balam y Miguel Canché para la obtención de material vegetal. Los resultados presentados formaron parte del proyecto "Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en placentas de chile habanero y su relación con la síntesis de fenilalanina y capsaicina" financiado por el Conacyt (Proyecto 50879Z).

Referencias bibliográficas

- (1) García-Galindo H.S., Ortega J., García M.E., Martínez C. 1995. "La capsaicina, el principio pungente del chile: su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos". *Ciencia* 46: 84-102.
- (2) Johnson C.D., Decoteau D.R. 1996. "Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeño pepper plant growth, pod yield and pungency". *HortScience* 31: 1119-1121.
- (3) Monforte-González M., Guzmán A., Uuh F., Vázquez-Flota F. 2010. "Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.)". *J Sci Food Agric* 90: 764-768.
- (4) Lindsey K., Yeoman M.M. 1984. "The synthetic potential of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum*". *Planta* 162: 495-501.
- (5) Suzuki T., Kawada T., Iwai K. 1981. "Biosynthesis of acyl moieties of capsaicin and its analogues from valine and leucine in *Capsicum* fruits". *Plant Cell Physiol* 22: 23-32.
- (6) Stewart C., Kang B-C., Liu K., Mazourek M., Moore S.L., Yoo E.Y., Kim B-D., Paran I., Jahn M.M. 2005. "The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase". *Plant J* 42: 675-688.
- (7) Zamsky E., Shoham O., Palevitch D., Levy A. 1987. "Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars". *Bot Gaz* 148: 1-6.
- (8) Aluru M.R., Mazourek M., Landry L.G., Curry J., Jahn M.M., O'Connell M.A. 2003. "Differential expression of fatty acid synthase genes, Acl, Fat and Kas, in *Capsicum* fruit". *J Exp Bot* 54: 1655-1664.
- (9) Johnson T.S., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. 1990. "In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium". *Plant Sci* 70: 223-229.
- (10) Johnson T.S., Ravishankar G.A., Dhanaraj S. 1995. "Pungency threshold of capsaicin produced by *in vitro* culture of placental tissues of *Capsicum frutescens* Mill". *Food Biotechnol* 9: 167-173.
- (11) Johnson T.S., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. 1996. "Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*". *Plant Cell Tiss Org Cult* 44: 117-121.
- (12) Hall R.D., Yeoman M.M. 1991. "The influence of intracellular pools of phenylalanine derivatives upon the synthesis of capsaicin by immobilized cell cultures of the chilli pepper, *Capsicum frutescens*". *Planta* 185: 72-80.

- (13) Salgado-Garciglia R., Ochoa-Alejo N. 1990. "Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annuum* L.)". *Plant Cell Rep* 8: 617-620.
- (14) Lindsey K. 1985. "Manipulation by nutrient limitation of the biosynthetic activity of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*". *Planta* 165: 126-133.
- (15) Obidalla-Ali H., Fernie A.R., Kossman J., Lloyd J.R. 2004. "Developmental analysis of carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fruits". *Physiol Plantarum* 120: 196-204.
- (16) Liu K., Jiang H., Moore S.L., Watkins C.B., Jahn M.M. 2006. "Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*". *Planta* 223: 672-683.
- (17) Van der Fits L., Memelink J. 2001. "The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element". *Plant J* 25: 43-53.
- (18) Baas-Espinola F.M. 2009. Cuantificación de la enzima nitrato reductasa en placentas inmovilizadas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán.
- (19) Roca-Mézquita C. (2009) Estudio de la enzima nitrito reductasa en un cultivo in vitro de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán.
- (20) Ancona-Escalante W.R. 2009. Estudio de las enzimas de asimilación de amonio en un cultivo in vitro de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- (21) Baas Espinola F.M. 2011. Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio bajo condiciones de inducción y diferentes contenidos de nitrógeno en placentas inmovilizadas in vitro de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría, CICY.
- (22) Roca Mézquita C. 2011. Efecto de la fuente nitrogenada y de inductores sobre la actividad de las enzimas nitrito y nitrato reductasas en placentas de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Maestría, CICY.
- (23) Couoh-Nic J.A. 2011. Estudio de la corismato mutasa en placentas de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.
- (24) Castro-Concha L.A., Canche-Chuc I., Miranda-Ham M.L. 2011. Determination of antioxidants in fruit tissues from three accessions of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), *J Mex Chem Soc* (En prensa).
- (25) Verpoorte R., Van Der Heijden R., Ten Hoopen H.J., Memelink J. 1999. "Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathway for the production of fine chemicals". *Biotechnol Lett* 21: 467-479.
- (26) Gutiérrez-Carbajal M.G., Monforte-González M., Miranda-Ham M.L., Godoy-Hernández G., Vázquez-Flota F. 2010. "Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate". *Biol Plantarum* 54: 430-434.
- (27) Sudha G., Ravishankar G.A. 2003. "Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill". *Curr Sci* 85: 1212-1217.



Inmovilización de placentas de *Capsicum chinense* Jacq.

Capítulo 20

María de Lourdes Miranda-Ham,* Lizbeth Castro-Concha,
Wendy Ancona-Escalante, Fray M. Baas-Espinola
y Carolina Roca-Mézquita
*Autor responsable: mirham@cicy.mx



Resumen

Las placentas de casi todas las bayas constituyen solamente un medio de soporte para las semillas en los frutos maduros. Sin embargo, en el chile habanero este tejido presenta una gran concentración de capsaicinoides, lo que le da su picor característico. Al poner las placentas en un medio líquido pierden su diferenciación y, por tanto, la capacidad de síntesis de estos metabolitos. Aquí se presenta el desarrollo de un sistema experimental que permitió iniciar los estudios del metabolismo primario del nitrógeno en este interesante tejido.

Palabras clave

Inmovilización, tejidos, placentas

Introducción

Uno de los problemas para la producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* es la asociación que frecuentemente ocurre entre la organización celular y la capacidad de síntesis.⁽¹⁾ Para superar esta limitante se han propuesto diferentes estrategias, entre ellas el cultivo de tejidos y órganos completos, como brotes y raíces. No obstante, el mantenimiento de los tejidos organizados en estos sistemas es complicado, ya que en los medios líquidos la agitación puede llegar a dañarlos, o su inmersión podría conducir a su disgregación. Por otro lado, el mantenimiento en medios semisólidos consume mucho tiempo, tanto en el manejo como para la proliferación de la biomasa. La inmovilización de tejidos en una matriz permeable permite mantener los tejidos íntegros, así como facilitar su manipulación.

La inmovilización de células o tejidos implica la unión o su incorporación en un sistema de fase sólida o semisólida específica que permite el flujo de nutrientes del medio hacia el tejido, así como de desechos en el sentido inverso. Además, este soporte debe permitir el intercambio de sustratos, productos, inhibidores,

etcétera, manteniendo al mismo tiempo la separación entre la biomasa catalítica y la fase que contiene los sustratos y productos.⁽¹⁾

Las células o tejidos inmovilizados pueden mantenerse funcionales; no obstante, su crecimiento y desarrollo se detienen, al igual que otros procesos morfogénéticos.

La utilización de células inmovilizadas ha sido considerado un método eficaz para aumentar la producción de metabolitos, como por ejemplo: la producción de hidroxitirosol por *Pseudomonas aeruginosa*, β -galactosidasa por *Streptomyces griseoloalbus*, etanol por *Zymomonas mobilis* y capsaicina por células de *Capsicum annuum*^(2,3,4,5) ya que permite su empleo por largos periodos de tiempo, aumentando la estabilidad de las mismas y permitiendo ventajas al configurar reactores, entre las que se incluyen un rápido control de pH y temperatura.

Otros usos prácticos se ejemplifican con la inmovilización de algas para la producción de energía no contaminante y biosensores para medir la toxicidad de las sustancias en efluentes y tratamiento de aguas,⁽⁶⁾ así como en tratamientos dermatológicos.⁽⁷⁾ También se usa para la elaboración de semillas artificiales que, al imitar la estructura de una semilla natural, está formada por un aislado de tejido meristemático totipotente, es decir, con potencial para diferenciarse y producir una planta completa, recubierto por un agente gelificante, capaz de formar una matriz o cápsula de gel hidratado, que pueda contener materiales bioactivos.⁽⁸⁾

Una parte crítica del proceso de inmovilización de un tejido consiste en la formación de la matriz en que éste estará contenido. El tipo de inmovilización que recibirá el tejido dependerá del arreglo espacial alcanzado por las moléculas que conforman la matriz que lo envuelve. En el caso que ahora se presenta se utilizó el entrecruzamiento de moléculas matriciales, como son el alginato, el agar, la agarosa y la poliacrilamida.⁽⁹⁾

El alginato es un polisacárido que se obtiene de algunas Phaeophyceas (algas pardas, como el sargazo), entre las que se encuentran *Laminaria hyperborea*. Este compuesto está formado por dos tipos de monosacáridos, ambos con un grupo ácido: el ácido glucorónico y el ácido manurónico. En presencia de calcio, el alginato puede formar una estructura sólida conocida como "caja de huevos". En esta estructura, la cual posee una irreversibilidad térmica, los iones de calcio se sitúan como puentes entre los grupos con carga negativa del ácido glucorónico.⁽¹⁾

La encapsulación de células en esferas de alginato-calcio puede conferirles cierta protección durante las diversas fases del sistema experimental, como por ejemplo: a la toxicidad química o al estrés osmótico.⁽¹⁰⁾

Durante muchos años, el alginato ha sido utilizado en la industria alimenticia como agente espesante, gelificante y estabilizante coloidal. También ha encontrado aplicaciones en el entrapamiento y la liberación controlada de drogas, y en el cultivo de tejidos vegetales, debido a sus propiedades, como son: un ambiente acuoso relativamente inerte dentro de la matriz, un proceso de encapsulación

que ocurre a temperatura ambiente y que no requiere de disolventes orgánicos tóxicos, un alto grado de porosidad que permite una alta velocidad de difusión para macromoléculas, entre otras ventajas.⁽¹⁾

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema de cultivo de tejidos placentarios de chile habanero inmovilizados en una matriz de alginato de calcio. Este sistema permite el control de las condiciones ambientales, las ventajas del cultivo de células *in vitro*, como con la elevada capacidad biosintética de los tejidos organizados, y ha permitido analizar de manera individual el efecto de algunos factores, como la disponibilidad de nitrógeno, en el proceso de síntesis de capsaicina.

Resultados

El cultivo *in vitro* de placentas inmovilizadas (Figura 1) se parece a los cultivos primarios de tejidos animales en el hecho de que en ambos no se presenta una multiplicación acelerada de tejido; sin embargo, se conserva el nivel de diferenciación. En el caso de las placentas, es importante mantener este nivel de complejidad tisular para que se manifieste la acumulación de capsaicinoides.

Figura 1
**Placentas inmovilizadas
de *Capsicum chinense* Jacq.**



Secciones de aprox. 25 mm² de tejido de placenta de chile habanero se incluyeron en una matriz de alginato de calcio.

Existen hoy en día variadas metodologías para la inmovilización de microorganismos y enzimas; en contraste, en lo referente a

tejidos vegetales, aún se están refinando las técnicas.

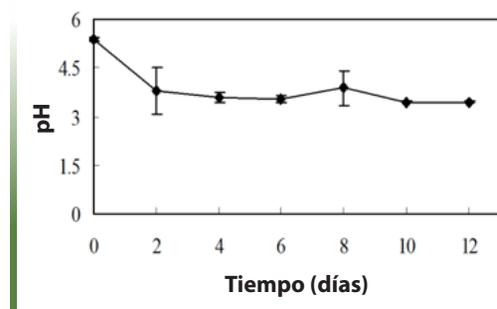
Es importante hacer notar que las matrices utilizadas para este fin deberán proveer de condiciones apropiadas para que la encapsulación se lleve a cabo con un mínimo de daño al tejido, no ser tóxicas y deberán presentar suficiente permeabilidad para dejar entrar los nutrimentos y a su vez, permitir la salida de desechos o compuestos de excreción. El alginato posee estas características y además, su matriz de tipo gel es a la vez resistente a la manipulación, pero gentil con el tejido. Por otro lado, su punto de fusión es relativamente bajo, lo que permite mantenerlo en fase líquida aun en temperaturas cercanas a los 40 °C, minimizando el daño por calor a los tejidos que se incorporen en ella.

Una vez inmovilizadas las placentas de chile habanero en las cápsulas de alginato, se cultivaron en medio MS. Para ello, la composición salina del medio se ensayó en diferentes fuerzas iónicas (datos no mostrados). Con base en estos ensayos se determinó que el medio MS a su fuerza iónica normal y a una densidad de inóculo de 50 cápsulas en 40 ml del medio contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, eran los adecuados.

En estas condiciones, se procedió a realizar la caracterización de este cultivo, tomando en cuenta algunos de los parámetros usuales para la determinación del crecimiento y la viabilidad (Figuras 2-5). Es importante hacer notar que se eligieron parámetros indirectos no destructivos, como la medición del pH y de la conductividad del medio de cultivo, pues resulta fundamental mantener las cápsulas viables y en óptimas condiciones.

Con respecto del pH del medio residual, se presentó un descenso brusco del valor inicial (5.0) en los primeros dos días, pero a partir de ese momento, los valores se mantuvieron entre 3.5 y 4 unidades hasta el final del periodo de cultivo (Figura 2). Estos cambios se asocian con los mecanismos de toma de nutrimentos del medio.

Figura 2
Valores de pH obtenidos del cultivo de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. durante 12 días.

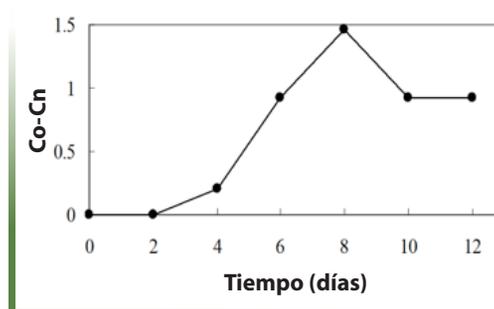


Promedio de tres repeticiones con su correspondiente desviación estándar.

Por su parte, la conductividad disminuyó de forma paulatina durante los primeros ocho días, pues las células van tomando los nutrimentos del medio. Cuando se graficaron las diferencias de conductividad, es decir, la conductividad del día inicial (C_0) menos la conductividad a evaluar (C_n), se obtuvo una curva similar a la de crecimiento. En la Figura 3 se puede observar que el

tejido encapsulado entró en una fase estacionaria aproximadamente en el día 8 del ciclo de cultivo. Se debe mencionar que se ha encontrado una buena correlación lineal entre el descenso en la conductividad del medio de cultivo y el aumento en peso seco en los cultivos.⁽¹¹⁾

Figura 3
Diferencia de conductividad eléctrica en un cultivo de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. durante 12 días



Promedio de tres repeticiones con su correspondiente desviación estándar.

Otra de las características que se debe analizar en este tipo de cultivos es la toma de nutrimentos del medio. En el presente estudio se enfocó a los azúcares añadidos al medio, esto es, a la sacarosa. Se observó una disminución en su concentración en el medio que mostró un curso temporal similar a los dos parámetros anteriores: a partir del octavo día, se presentó una meseta en la toma de este metabolito (Figura 4).

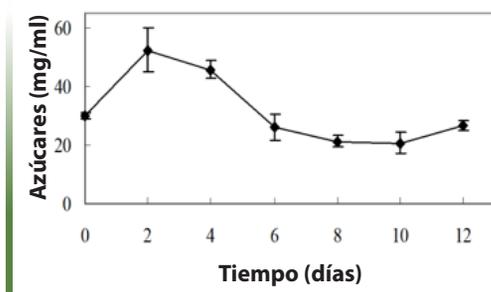
De los datos anteriores se puede concluir que se obtuvo un cultivo de placentas inmovilizadas de chile habanero que estaban metabólicamente activas. Además, se procedió a comprobar su viabilidad por medio de una prueba cualitativa.⁽¹²⁾ La viabilidad se estimó después de 5, 10, 15 y 20 días de cultivo mediante la exclusión de azul de tripano, un colorante vital. Las células que mantienen la integridad de sus membranas no toman el colorante, por lo

que permanecen sin teñir a diferencia de las células muertas que adquieren una coloración azul. Se observó que el tejido de la placenta inmovilizada en alginato seguía vivo al final del ciclo de cultivo (Figura 5).

De este modo, queda demostrado que los tejidos encapsulados en este polímero permanecen viables durante periodos largos de incubación.⁽¹³⁾

Figura 4

Concentración de azúcares totales en un cultivo de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq. durante 12 días



Promedio de tres repeticiones con su correspondiente desviación estándar.

Figura 5

Viabilidad de las placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq.



A la izquierda se muestran los controles negativos, en los que las placentas se hirvieron durante 20 minutos, mientras que a la derecha se observan las placentas que han permanecido 20 días en cultivo.

Conclusiones

Existen muy pocos estudios sobre el metabolismo primario del tejido placentario y ninguno sobre lo que ocurre con el metabolismo nitrogenado, desde su asimilación hasta la síntesis de aminoácidos. El cultivo

in vitro de placentas inmovilizadas nos provee de un modelo ideal para su estudio, pues tiene la capacidad de formar metabolitos secundarios nitrogenados.

Agradecimientos

Se agradece la asesoría técnica del Ing. Fernando Contreras para el establecimiento de las plantas de chile en los invernaderos del CICY, y de los Ings. Eduardo Balam y Miguel Canché para la obtención de material vegetal. Los resultados presentados formaron parte del proyecto "Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno en placentas de chile habanero y su relación con la síntesis de fenilalanina y capsaicina" financiado por el Conacyt (Proyecto 50879Z).

Referencias bibliográficas

- (1) Hurtado D., Merino E. 1987. *Cultivo de tejidos vegetales*. Ed. Trillas. México, D.F.
- (2) Bouallagui Z., Sayadi S. 2006. "Production of high hydroxytyrosol yields via tyrosol conversion by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized resting cells". *Agric Food Chem* 54: 9906-9911.
- (3) Anisha G., Prema P. 2007. "Cell immobilization technique for the enhanced production of β -galactosidase by *Streptomyces griseoloalbus*". *Bioresource Technol* 99:3325- 3330.
- (4) Matiz A., Torres C., Raúl A.P. 2002. Producción de etanol con células inmovilizadas de *Zymomonas mobilis* spp. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. [En línea]. Disponible en: www.javeriana.edu.co
- (5) Johnson T.S., Ravishankar G.A., Venkataraman L.V. 1990. "In vitro capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium". *Plant Sci* 70:223-229.
- (6) Moreno I. 2007. "Microalgae immobilization: Current techniques and uses". *Bioresource Technol* 99:3949-3964.
- (7) Rodríguez-Limós A.C., Bregni C., De Los Santos Carvallido C. 2003. "Alginate microspheres for dermatopharmaceutical use". *Ars Pharmaceutica* 44:215-224.
- (8) López Encina C. 2008. Semillas artificiales. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros40/semillas.html>
- (9) Endress R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Heilderberg.
- (10) Qiaochun W., Avihai P. 2006. "Cryopreservation of embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification". In: Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (eds) *Plant cell culture protocols*, 2nd edn. Humana Press, Totowa, pp. 318.
- (11) Godoy-Hernández G., Vázquez-Flota F. 2006. "Growth measurements". In: Loyola-Vargas V.M., Vázquez-Flota F. (eds) *Plant cell culture protocols*, 2nd edn. Humana Press, Totowa, pp. 51-58.
- (12) Castro-Concha L., Escobedo R.M., Miranda-Ham M.L. 2011. "Measurement of cell viability". In: Loyola- Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. (eds) *Plant cell culture protocols*, 3rd edn. Humana Press, Totowa.
- (13) Sheu T.Y., Marshall R.T. 1993. "Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate". *J Food Sci* 58:557-561.





mix

Patrones proteicos de proteínas extracelulares en cultivos hidropónicos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Capítulo 21

Heidy Guadalupe Martínez Sánchez, Rosa María Galaz Ávalos,
Víctor M. Loyola-Vargas*

*Autor responsable: vmloyola@cicy.mx



Resumen

Se sabe que las raíces de las plantas secretan moléculas de baja y alta masa molecular. Entre estas últimas se encuentran las proteínas. Conocer la secreción de las raíces es central para entender la interacción de las plantas con su medio ambiente, particularmente con los diferentes organismos que se encuentran en el suelo. Por ello, en este estudio se analizó la secreción de proteínas por las raíces de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en un sistema hidropónico bajo condiciones de inducción y no inducción con jasmonato de metilo. En el exudado de las plantas testigo se determinaron 90 proteínas, en tanto que con el tratamiento de etanol y de jasmonato de metilo se determinaron 94 y 81 proteínas, respectivamente. En este capítulo se hace un análisis de los resultados obtenidos y de las posibles funciones e implicaciones que tiene la secreción de proteínas por las raíces de las plantas.

Palabras clave

Capsicum chinense, hidroponía, jasmonatos, proteínas

Introducción

Las plantas, al ser sésiles, han desarrollado extraordinarios mecanismos de adaptación, entre los más importantes se encuentran las respuestas a las condiciones medio ambientales, su interacción con otras plantas y con los animales, ya que algunos de éstos son una fuerte presión de selección para las plantas, que no solo afecta su sobrevivencia, sino también su reproducción y crecimiento, así como la estructura dinámica de las poblaciones y de las comunidades vegetales.

Las plantas, en el curso de la evolución, han desarrollado diversos mecanismos para contrarrestar los efectos del herbivorismo, así como para interaccionar con sus vecinas. Entre estos mecanismos, la secreción de moléculas pequeñas y proteínas juega un importante papel.

La mayoría de los agentes alelopáticos conocidos son exudados radiculares.⁽¹⁾ Factores tales como la edad de la planta, su nutrición y los factores medio ambientales influyen cualitativa y cuantitativamente en la liberación de sustancias por las raíces.

Entre los principales exudados se tienen aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos, carbohidratos y proteínas, entre otros.^(1,2) Algunas de estas moléculas se secretan en respuesta a la presencia de ácido jasmónico (AJ) y de jasmonato de metilo (JM) que la planta produce cuando es atacada por herbívoros.⁽³⁾

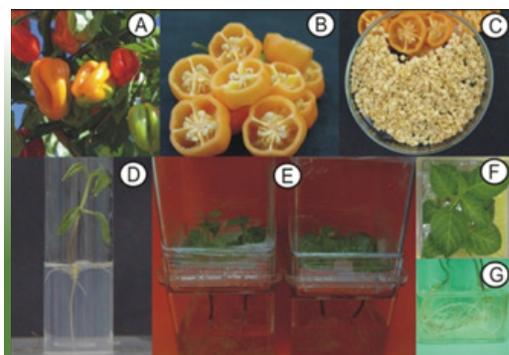
Los jasmonatos median varios eventos en las células vegetales, tales como la respuesta de defensa, la floración y la senescencia, la maduración de los frutos, la maduración del polen y el crecimiento de la raíz. La estructura del JM, un componente de la esencia del jazmín (*Jasminum grandiflora*), fue elucidada por Demole et al.⁽⁴⁾ Más tarde se descubrió que cuando se aplica JM a plantas de jitomate se induce la biosíntesis de inhibidores de proteasas, así como en las plantas circundantes.⁽⁵⁾

La finalidad de este trabajo fue establecer un sistema de cultivo hidropónico y determinar si cultivos de *C. chinense* secretan proteínas al medio de cultivo en dicho sistema, tanto en presencia como ausencia de JM.

Resultados

Como primer paso en esta investigación se generaron cultivos hidropónicos de *C. chinense* (Figura 1).

Figura 1
Obtención de los cultivos hidropónicos de *C. chinense*



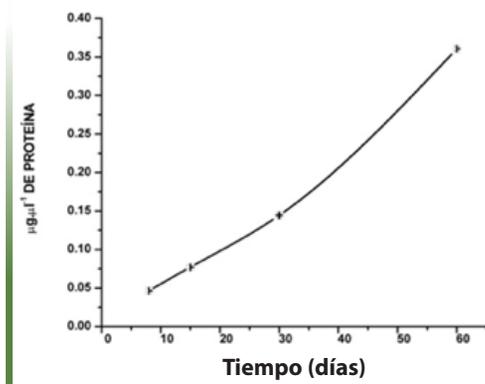
(A) Planta con frutos. (B) Frutos maduros. (C) Semillas. (D) Plántula de chile habanero obtenida en medio de cultivo semisólido. (E-G) Plantas en cultivo hidropónico.

Después de 60 días en el sistema hidropónico, las plantas alcanzaron una altura de entre 13 y 15 cm y secretaron una importante cantidad de proteína. Para el tratamiento con JM (250 μ M) por 72 horas se utilizaron plantas de esta edad.

Las proteínas secretadas por las plantas de chile habanero en hidroponía durante un curso temporal de 60 días de cultivo aumentaron conforme avanzó la edad de los cultivos (Figura 2).

El análisis electroforético en dos dimensiones de las proteínas secretadas por raíces de los cultivos hidropónicos muestra que la mayoría de las proteínas secretadas se encuentra en el rango de masa molecular de entre 45 y 100 kDa. El número de proteínas en los exudados de las plantas sin tratar es del orden de 90 proteínas (Figura 3). Para

Figura 2

Contenido de proteínas secretadas por cultivos hidropónicos de chile habanero

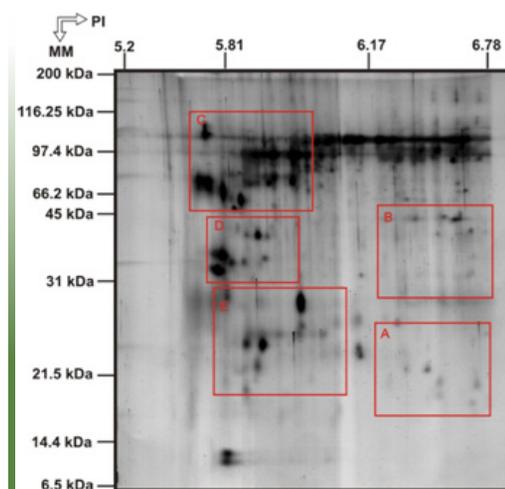
analizar mejor las diferencias existentes en las proteínas en los diferentes tratamientos, se seleccionaron cinco áreas dentro de cada uno de los gels. Éstas serán las áreas que se muestran en las siguientes figuras, en lugar de los gels completos.

Puesto que el JM se disuelve en etanol, se realizó un tratamiento con solo etanol para eliminar del análisis aquellas proteínas que son inducidas por solo el disolvente.

En la Figura 4 se muestra la comparación de los patrones proteicos, de las regiones marcadas con los Cuadros A y B de la Figura 3, en la que se puede observar que hay proteínas que desaparecen o aparecen, en tanto que hay otras proteínas que intensifican o disminuyen su concentración.

En el panel A de la Figura 4 se muestra la presencia diferencial de proteínas en los dos tratamientos. Las proteínas presentes en este rango tienen una masa molecular de alrededor de 21.5 kDa y un pI menor a 6.78. Se observa que las proteínas número 1, 3, 4, 6-12 están presentes en el gel testigo y no así las número 2, 5, 13 y 14. De las proteínas que aparecen, cinco de ellas tienen un alto nivel de expresión (1, 7-10)

Figura 3

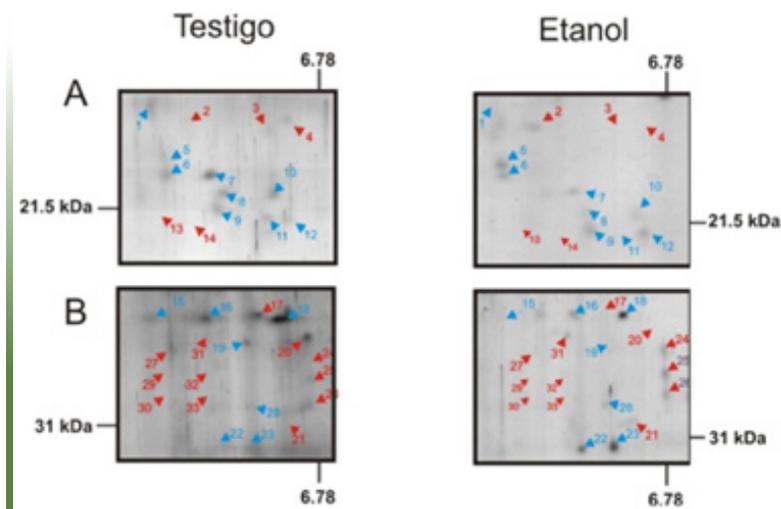
Electroforesis de 2D de los exudados radiculares en cultivos hidropónicos de *C. chinense*

Se cargaron 180 µg de proteína.

y otras cinco presentan un bajo nivel de expresión (3, 4, 6, 11 y 12). En el gel con las muestras tratadas con etanol están presentes las proteínas número 2, 5-10 y 12, y no así las proteínas número 1, 3, 4, 11, 13 y 14. En el caso de las proteínas número 2 y 12, éstas presentan una mayor concentración en relación con el testigo sin etanol, mientras que las proteínas número 5-10 disminuyen su concentración con el tratamiento de etanol (Figura 4A).

En la Figura 4B se muestra la presencia diferencial de proteínas en los dos tratamientos. Las proteínas presentes en este rango tienen una masa molecular de alrededor de 31 kDa y un pI menor a 6.78. La proteína número 18 aparece constitutivamente en los dos tratamientos en prácticamente la misma cantidad; en cambio, las proteínas número 17, 20, 27, 29, 30, 32 y 33 presentes en el testigo desaparecen en el tratamiento con etanol. Lo contrario sucede para las proteínas 21, 24, 25, 26, 31.

Figura 4
**Comparación del patrón proteico
 en las regiones A y B**



El panel del lado izquierdo corresponde al testigo y el del lado derecho al tratamiento con etanol.

Mientras que las proteínas número 15, 16, 19 y 28 disminuyen en el tratamiento con etanol. Las proteínas número 22 y 23 aumentan cuando las muestras son tratadas con etanol.

En Figura 5C se muestra la presencia diferencial de proteínas en los dos tratamientos. Las proteínas presentes en este rango tienen una masa molecular elevada y un *pH* mayor a 5.81. En esta zona del gel podemos contar 25 proteínas, de las cuales solo tres proteínas, las número 43-45, desaparecen con el tratamiento de etanol (Figura 5C; panel derecho). Las otras 22 proteínas aumentan o disminuyen con el tratamiento.

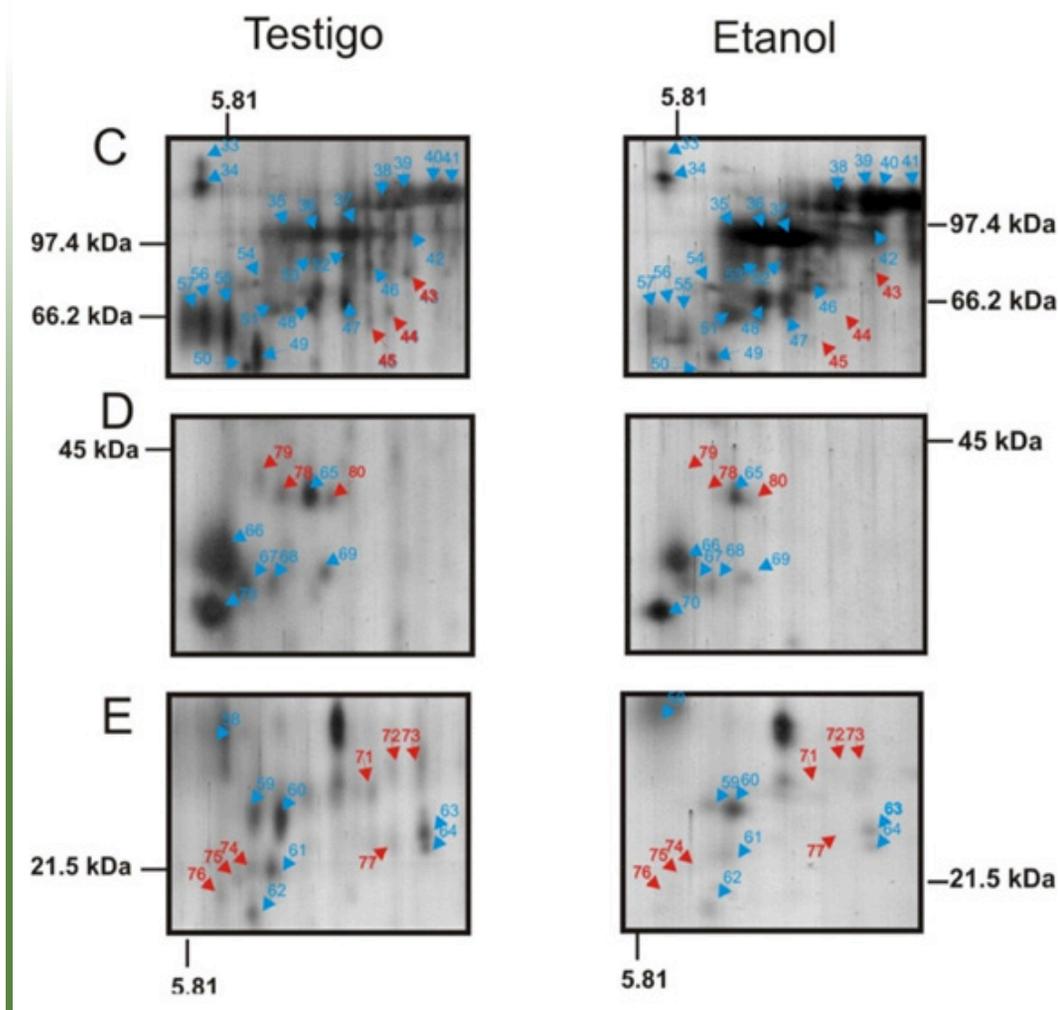
En la Figura 5D se muestran las nueve proteínas de entre 45 y 30 kDa y un *pH* mayor a 5.81 que se determinaron. De éstas, tres desaparecen con el tratamiento de etanol, las proteínas 78-80 (Figura 5D; panel derecho). Mientras que las otras seis solo cambian de concentración. En la zona de menor masa molecular se pueden contar

14 proteínas (Figura 5E). De éstas, la mitad de ellas, las proteínas 71-77, están presentes en el testigo pero no en las muestras tratadas con etanol. Las otras siete proteínas, las proteínas con los números 59-64, disminuyen con el tratamiento de etanol.

Para determinar el efecto del JM en la secreción de proteínas por las raíces de plántulas de *C. chinense* cultivadas en un sistema hidropónico se agregó MJ hasta una concentración de 250 μ M y se analizaron las proteínas en el medio de cultivo.

Como se puede observar en la Figura 6A, cuando se realiza el análisis comparativo entre las muestras testigo y la tratadas con JM, la concentración de las proteínas aumenta en la mayoría de ellas. Este aumento se puede dividir en tres niveles. Las proteínas número 1, 12-14 aumentan ligeramente con el tratamiento con JM cuando se les compara con el testigo (Figura 6A). Las proteínas 27, 29-33 aumentan en forma moderada, en tanto que las proteínas 18, 24-26 (Figura 6B) aumentan

Figura 5
**Comparación del patrón proteico
 en las regiones C, D y E**



El panel del lado izquierdo corresponde al testigo y el del lado derecho al tratamiento con etanol.

dramáticamente, muy especialmente las tres últimas. Por otro lado, las proteínas 17 y 20 desaparecen con el tratamiento de JM.

En la Figura 6C se pueden determinar 25 proteínas con una masa molecular entre 66.2 y 97.4 kDa. Tres de ellas se inducen debido a la presencia del JM, las proteínas 43-45 (Figura 6C; panel derecho). Otras proteínas aumentan de forma importante,

como las proteínas 35-37, 48, 49, 50, 55, 56 y 57 (Figura 6C; panel derecho).

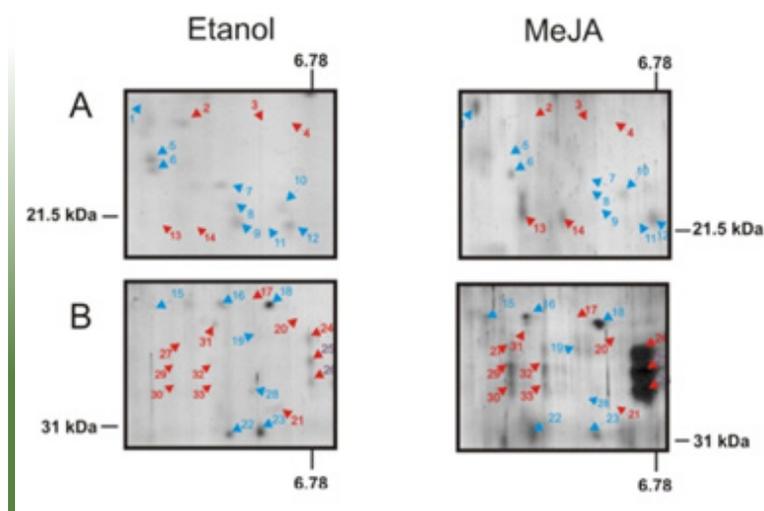
De forma importante también hay proteínas que disminuyen en su concentración con el tratamiento de JM, entre ellas las número 35-38, 41, 42. Cuando se analizan las proteínas con masa molecular entre 60-100 kDa y a un pI mayor a 5.81 se puede observar que las proteínas 78-80 son

inducidas por el tratamiento de JM (Figura 7D; panel derecho). Las otras seis proteínas que aparecen en gel (65-70) prácticamente no cambian con el tratamiento.

Al comparar el área E en ambos geles en los cuales se expresan proteínas con una masa molecular de entre 30 y 20 kDa y un pH/

mayor a 5.81, se observan diferencias muy notables en las proteínas número 58-64 las que aumentan de forma importante con el tratamiento de JM. Otras proteínas como las número 71-77 solo aparece con el tratamiento de JM (Figura 7E; panel derecho).

Figura 6
Comparación del patrón proteico
en las regiones A y B



El panel del lado izquierdo corresponde al testigo y el del lado derecho al tratamiento con etanol.

Discusión

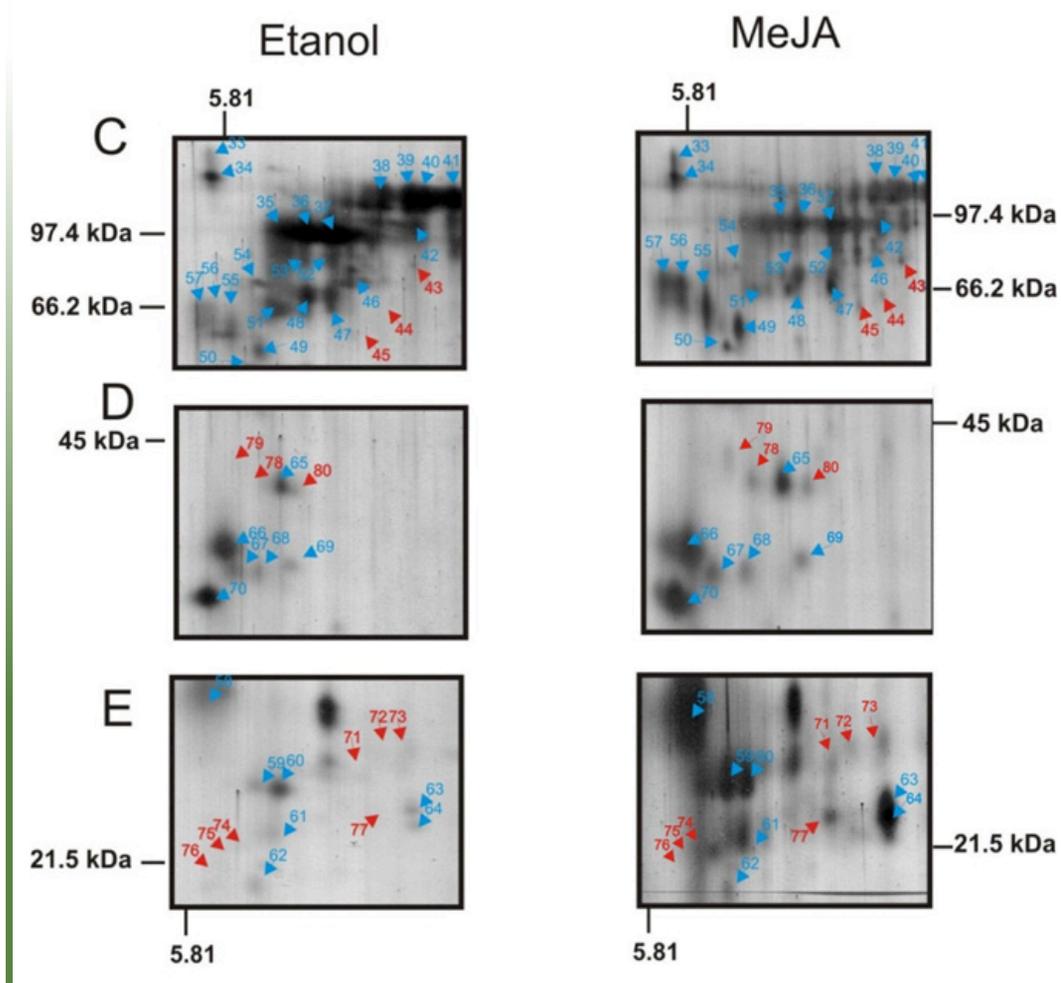
El sistema hidropónico desarrollado para el cultivo de las plantas de *C. chinense* permitió la recolección de las proteínas que secretan las raíces de las plantas en cultivo. También se puede ver que este sistema podría servir para estudiar las diferentes interacciones de las raíces de las plantas de chile habanero con los microorganismos de su entorno, principalmente los hongos micorrízicos.

La secreción de proteínas por las raíces de las plantas en la naturaleza juega una importante función.⁽¹⁾ Entre las proteínas

secretadas más estudiadas en los exudados radicales se encuentran las lectinas.⁽⁶⁾ Las lectinas son un grupo diverso de glucoproteínas que han sido determinadas en sistemas duales, tales como la defensa contra algunos patógenos y en el reconocimiento de sistemas simbióticos compatibles.^(7,8)

Otro grupo de proteínas abundantes en los exudados de la raíz son las proteínas relacionadas con patogenicidad (PRP). Entre éstas, las más comunes son las quitinasas, la osmotina y las proteínas similares a taumatina.^(6,9,10) La defensa no es el único

Figura 7
**Comparación del patrón proteico
 en las regiones C, D y E**



El panel del lado izquierdo corresponde al testigo y el del lado derecho al tratamiento con jasmonato de metilo.

fenómeno biológico en el que está involucrada la secreción de proteínas por las raíces, sino también en el proceso denominado quimotaxis.⁽¹¹⁾

Algunos de los procesos mencionados en los párrafos anteriores son mediados por JM.^(12,13) De ahí la relevancia de la cinética de cambio de las proteínas secretadas por las raíces en respuesta a este regulador del crecimiento.

El efecto del tratamiento con JM se puede resumir en que existe un grupo importante de proteínas que son secretadas al medio de cultivo en respuesta al tratamiento con JM, mientras que en su ausencia no lo hacen; en tanto que un grupo de proteínas, aún mayor, aumenta de forma importante su secreción al medio de cultivo en su presencia. Solo unas pocas proteínas dejan de ser secretadas por las raíces cuando las raíces son tratadas con JM.

Es posible que con base en su masa molecular y su pI/ que varias de estas proteínas pertenezcan al grupo de proteínas relacionadas con patogenicidad.

Cuando una planta es atacada por plagas que se alimentan de las hojas de las plantas, éstas responden encendiendo la vía de síntesis del ácido octadecanoico, cuyo producto más importante es el AJ y su éster, el JM. Estos compuestos tienen entre otras dos importantes funciones, una es servir como respuesta al ataque de las plagas y segunda emitir una señal de alarma, la cual lleva a una respuesta sistémica.

En la siguiente etapa de esta investigación será importante determinar si otros de los reguladores del crecimiento, que también están involucrados en la respuesta inmune de las plantas, tales como ácido salicílico y óxido nítrico, son capaces de inducir la secreción de proteínas específicas por las raíces.

De igual importancia será la identificación de las proteínas que forman el proteo-secreto de *C. chinense* bajo las condiciones estudiadas, con el fin de estar en posibilidades de determinar si existe una relación entre las proteínas secretadas por las raíces y su probable función en los mecanismos de defensa.

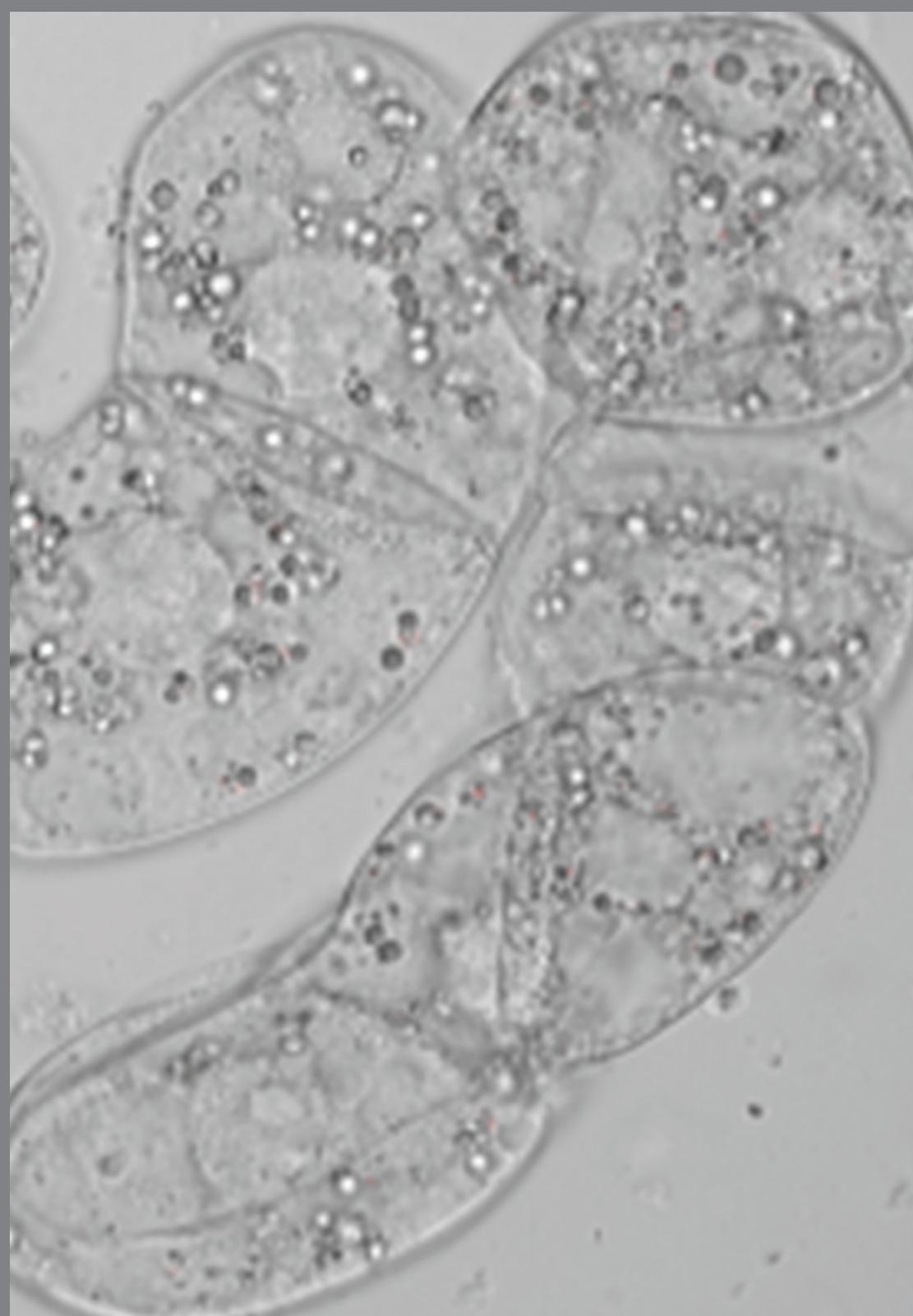
Conclusiones

En este trabajo se muestra que es posible cultivar *C. chinense* en un sistema hidropónico que permite coleccionar los exudados de sus raíces. También se determinó que los exudados radiculares obtenidos de los cultivos hidropónicos contienen proteínas extracelulares. La evaluación del patrón proteico en los diferentes tratamientos muestra importantes diferencias, tanto en la intensidad de la expresión de las proteínas, como en la secreción de nuevas proteínas o la inhibición en dicha secreción.

Referencias bibliográficas

- (1) De-la-Peña C., Badri D.V., Loyola-Vargas V.M. 2012. "Plant root secretions and their interactions with neighbors". In: Baluska F., Vivanco J. (eds) *Secretions and exudates in biological systems*. En prensa.
- (2) Bais H.P., Loyola-Vargas V.M., Flores H.E., Vivanco J.M. 2001. "Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs". In: *Vitro Cell Dev Biol -Plant* 37:730-741. DOI:10.1007/s11627-001-0122-y.
- (3) Rakwal R., Komatsu S. 2000. "Role of jasmonate in the rice (*Oryza sativa* L.) self-defense mechanism using proteome analysis". *Electrophoresis* 21:2492-2500. DOI:10.1002/1522-2683(20000701)21:12<2492::AID-ELPS2492>3.0.CO;2-2.
- (4) Demole E., Lederer E., Mercier D. 1962. "Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin". *Helvet Chim Acta* 45:675-685. DOI:10.1002/hlca.19620450233.
- (5) Farmer E.E., Ryan C.A. 1990. "Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves". *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87:7713-7716.

- (6) De-la-Peña C., Lei Z., Watson B.S., Sumner L.W., Vivanco J.M. 2008. "Root-microbe communication through protein secretion". *J Biol Chem* 283:25247-25255. DOI:10.1074/jbc.M801967200.
- (7) De Hoff P., Brill L., Hirsch A. 2009. "Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense". *Mol Gen Gen* 282:1-15. DOI:10.1007/s00438-009-0460-8.
- (8) Sharon N., Lis H. 2004. "History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules". *Glycobiol* 14:53R-62R. DOI:10.1093/glycob/cwh122.
- (9) Basu U., Jennafer L., Whittal R.M., Stephens J.L., Wang Y., Zaiane O., Taylor G. 2006. "Extracellular proteomes of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots: analysis and comparison by MudPIT and LC-MS/MS". *Plant Soil* 286:357-376. DOI:10.1007/s11104-006-9048-9.
- (10) Nóbrega F.M., Santos I.S., Cunha M.D., Carvalho A.O., Gomes V.M. 2005. "Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein". *Plant Soil* 272:223-232. DOI:10.1007/s11104.
- (11) Currier W.W., Strobel G.A. 1977. "Chemotaxis of rhizobium spp. to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots". *Science* 196:434-436. DOI:10.1126/science.196.4288.434.
- (12) Spoel S.H., Dong X. 2008. "Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses". *Cell Host & Microbe* 3:348-351. DOI:10.1016/j.chom.2008.05.009.
- (13) Vasyukova N., Ozeretskovskaya O. 2009. "Jasmonate-dependent defense signaling in plant tissues". *Russ J Plant Physiol* 56:581-590. DOI:10.1134/S102144370905001X.



El uso de los cultivos *in vitro* para el estudio de la síntesis de capsaicina en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Capítulo 22

Felipe Vázquez-Flota,* María Guadalupe Gutiérrez-Carbajal,
Miriam Monforte-González

*Autor responsable: felipe@cicy.mx



Resumen

La capsaicina, que le confiere el característico picor a los chiles, consiste en un núcleo vainilloide, la vainillina, unido mediante un enlace amida a una cadena lateral acilo. La vainillina se deriva de la fenilalanina, mientras que la cadena lateral proviene de la valina o isoleucina. La formación de vainillina involucra la producción de ácido ferúlico, el acortamiento del grupo propenoico de éste y una transaminación. Para la cadena lateral se requiere una desaminación y su posterior alargamiento. Ambos productos se unen mediante la capsicinoide sintasa. Los capsasicoideos se sintetizan en las placentas, el tejido que sostiene las semillas y el proceso es sensible a múltiples factores ambientales. Esto dificulta analizar los efectos de diferentes condiciones sobre el proceso. Por ello, el uso de sistemas que permitan el control de tales condiciones, como los cultivos de suspensiones celulares, representa una alternativa. No obstante, la capacidad de síntesis de metabolitos secundarios generalmente se pierde o reduce en suspensiones celulares. En el laboratorio hemos desarrollado estrategias para sostener esta capacidad, incluyendo el uso de inductores (ácido salicílico y jasmonato de metilo). En este capítulo los resultados obtenidos con cultivos de chile habanero se comparan con los de cultivos de otras especies.

Palabras clave

Capsaicina, *Capsicum chinense*, cultivos *in vitro*, jasmonatos, salicilatos

Introducción

La capsaicina, el principio picante del chile, se forma a partir de la fenilalanina de acuerdo con la ruta mostrada en la Figura 1.^(1,2) La fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la primera reacción, convirtiendo este aminoácido en ácido cinámico, que, subsecuentemente, se transforma en los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico por la acción ordenada de la cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H), cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H) y cafeato O-metiltransferasa (COMT). La transformación de ácido ferúlico en vainillina requiere un acortamiento de la cadena propenoico.⁽¹⁾ La vainillina es

transaminada, dando lugar a la vainillilamina, en una reacción que utiliza el ácido g-aminobutírico como donador de grupos amino.⁽³⁾ Finalmente, la vainillilamina se condensa con el ácido 8-metil-6-nonenico CoA, derivado de la valina, por acción de la capsaicinoide sintasa, (CS; Figura 1), produciendo capsaicina.⁽²⁾

Los cultivos *in vitro* contienen todas las enzimas necesarias para la síntesis de capsaicina.⁽⁴⁾ No obstante, se ha encontrado una baja producción de estos compuestos en relación con los frutos.⁽⁵⁾

Algunas estrategias para aumentar la producción de capsaicina en cultivos *in vitro* incluyen la manipulación de la composición del medio y la adición de precursores.⁽⁴⁾ Otras estrategias se refieren al diseño de esquemas para la inmovilización de células en soportes inertes,^(5,6) la modificación de las condiciones de cultivo,⁽⁷⁾ y exposición a inductores del metabolismo secundario como homogenados fúngicos⁽⁸⁾ y mediadores químicos, que incluyen al ácido salicílico (AS) y a los jasmonatos (JA), entre otros.^(2,10)

Con el fin de contar con un sistema para el estudio de los factores que controlan la síntesis de capsaicoides a nivel celular en chile habanero, el objetivo de este trabajo fue establecer un sistema de cultivo *in vitro* de esta especie y desarrollar una metodología de inducción de la síntesis de capsaicina.

Resultados

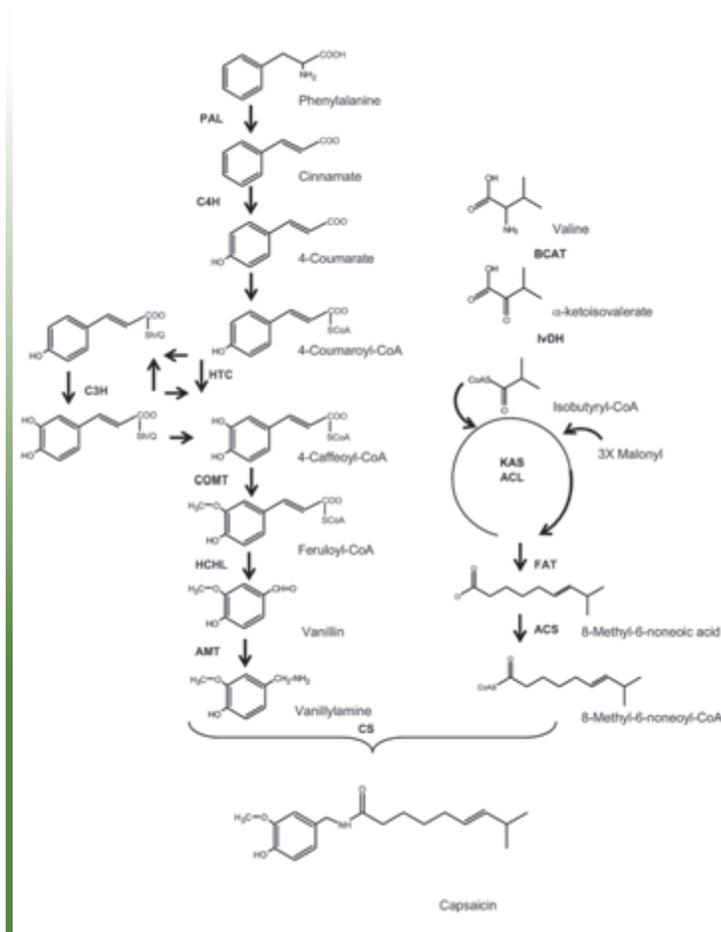
Para la obtención del cultivo de células en suspensión se usaron callos de *C. chinense* provenientes de hipocotilos de la variedad criolla de fruto color naranja.⁽¹¹⁾ Los callos se han mantenido en el medio de Murashige y Skoog (MS), a pH 5.6, con 30 g/L de sacarosa, 1.0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2.2 g/L de Gel-Rite⁽¹¹⁾, a 25 °C, bajo luz continua y con resiembras cada 21 días.

La suspensión se generó transfiriendo entre uno y dos gramos de callo de doce días a medios líquidos, bajo iluminación continua, con agitación (100 RPM), y con resiembras cada catorce días. Dos gramos (peso fresco) se inocularon en 50 mL de medio y los cultivos se mantuvieron durante de 32 días colectando muestras cada dos días. Los datos así obtenidos se graficaron para caracterizar la curva crecimiento (Figura 2).

El cultivo mostró ganancia de peso fresco casi de inmediato y continuó creciendo hasta el día 26. No obstante, después de 14 días se observó un ligero oscurecimiento.

Por otro lado, durante los primeros días del ciclo de cultivo, la acumulación de capsaicoides se mantuvo debajo del límite de detección (25 ppm), comenzándose a detectar a partir del doceavo día, cuando el cultivo se encontraba en la parte media de la etapa de crecimiento lineal (Figura 2). La máxima acumulación de capsaicoides ocurrió a los 14 días y comenzó a disminuir unos días más tarde, coincidiendo con el inicio del oscurecimiento de los cultivos. La acumulación de capsaicina se mantuvo en valores muy bajos una vez que el cultivo alcanzó la fase estacionaria (Figura 2).

Figura 1
**Ruta propuesta para la biosíntesis
 de los capsaicinodes en el género *Capsicum***



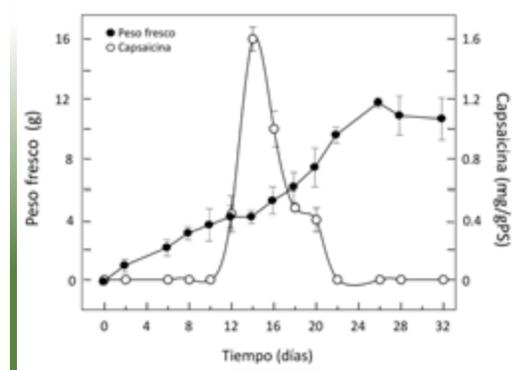
pAMT, aminotransferasa de la vainillina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados, IvDH, isovalerato deshidrogenasa; KAS, α-ceto acil sintasa; ACL proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS capsaicinoide sintasa. Las flechas punteadas representan reacciones por caracterizar. Otras abreviaturas, definidas en el texto.

Dado que las variaciones en las cantidades de capsaicina pudieron deberse a la excreción del compuesto, el medio de cultivo residual fue analizado, resultando negativo a lo largo de todo el ciclo. De este modo, es posible que esta disminución haya sido consecuencia de su metabolismo. En este sentido, en frutos de *C. annum* se ha observado un aumento en la actividad de las peroxidases, que coincide con la disminu-

ción del contenido de capsaicina, y que podrían participar en su oxidación.⁽¹²⁾ Es común que los cultivos *in vitro* de *Capsicum* presenten una alta actividad de peroxidases en las etapas tardías del ciclo.⁽²⁾ Por ello, es posible que esta disminución en esta línea celular sea consecuencia de su oxidación. Es importante mencionar que, en comparación con frutos, las suspensiones celulares tuvieron cantidades muy bajas

de capsaicina (Cuadro 1). Esto coincide con cultivos de otras especies como *C. annuum* y *C. frutescens*.^(1,2,4,6) No obstante, la presencia de capsaicina en estos cultivos demuestra que poseen la maquinaria biosintética completa y pueden ser utilizados para los estudios propuestos.

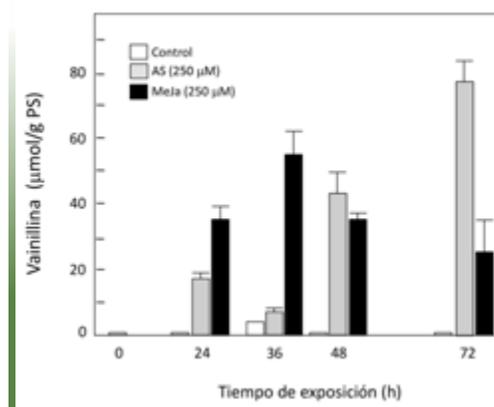
Figura 2
Ciclo de cultivo y contenido de capsaicinoides en suspensiones celulares de *C. chinense*



Promedio de tres repeticiones con la desviación estándar.

Aunque también se analizó el contenido de intermediarios biosintéticos a lo largo del ciclo de cultivo, éstos no se pudieron detectar, con excepción de la vainillina (Figuras 3 y 4).

Figura 3
Curso temporal de la acumulación de vainillina



Cultivos en suspensión de *C. chinense* fueron expuestos a ácido salicílico (AS), jasmonato de metilo (MeJa) o agua (Control) durante 72 h. Promedio de tres repeticiones con las desviaciones estándar.

Cuadro 1
Contenido de capsaicina en diferentes tejidos de *C. chinense*

Tejido	Contenido de capsaicina		
	mg ¹	mmoles ¹	USC ²
Placenta	24-72	0.08-0.24	360-1080
Semilla	3-8	0.01-0.03	45-123
Pericarpio	0.7-6	< 0.018	10-83
Suspensión celular	< 0.4	< 0.002	< 6

1) Por gramo de peso seco

2) Unidades Scoville de Calor; 1 ppm equivale a 15 USC

Inducción de la síntesis de capsaicina

La acumulación de capsaicina es particularmente sensible a las condiciones del medio ambiente. Cultivares del mismo genotipo pueden variar hasta en 50%

del contenido, dependiendo de las variaciones ambientales⁽²⁾ y la sequía puede modificar las actividades de las enzimas biosintéticas.⁽¹³⁾ Más aún, en cultivos en

suspensión de *C. frutescens* la aplicación de AS y JA resultaron en la acumulación de capsaicina.⁽⁹⁾ Por ello, se aplicaron estos compuestos en dosis de 250 μM y se evaluaron los efectos sobre los niveles de capsaicina y de vainillina en células expuestas por periodos de 0, 24, 36, 48 y 72 h.

En los cultivos expuestos a AS, la acumulación de vainillina no se vio modificada, respecto de los controles, durante las primeras 36 h (Figura 3). Sin embargo, a partir de ese punto se observó una rápida acumulación que llegó a sus valores máximos a las 72 horas (Figura 3).

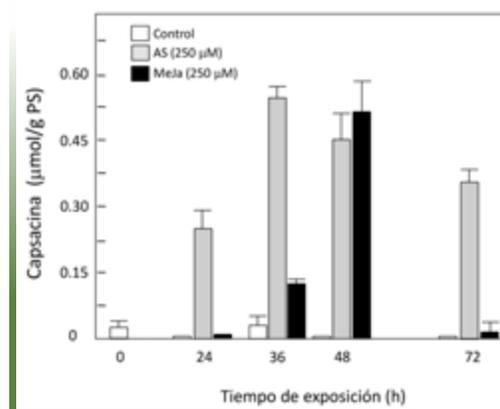
Por su parte, el contenido de capsaicina aumentó dentro de las primeras 24 h (Figura 4) y continuó aumentando hasta las 36 h para mantenerse en niveles de entre 0.5 y 0.6 $\mu\text{moles/gPS}$ hasta el final del experimento (Figura 4).

En cultivos de *C. frutescens*, la exposición a una concentración de 200 μM de AS resultó en un incremento de hasta 200% respecto de los controles.⁽⁹⁾ Estos datos coinciden en cuanto a la eficiencia del AS como inductor de la síntesis de capsaicina, aun en diferentes especies. Se deben enfatizar las diferencias en el curso de la acumulación de vainillina y capsaicina en los cultivos expuestos AS (Figuras 3 y 4).

Como ya se indicó, el tratamiento con el inductor no afectó la acumulación de la vainillina durante las primeras 36 horas (Figura 3), pero sí produjo una rápida acumulación de capsaicina (Figura 4).

Una posible explicación para esto es que el AS indujo la transformación de la vainillina en capsaicina, impidiendo la acumulación del primero. El disparo en la acumulación de la vainillina, después de 36 h, podría sugerir la necesidad del intermediario para mantener los niveles de síntesis (Figuras 3

Figura 4
Curso temporal de la acumulación de capsaicinoides



Cultivos en suspensión de *C. chinense* fueron expuestos a ácido salicílico (AS), jasmonato de metilo (MeJa) o agua (Control) durante 72 h. Promedio de tres repeticiones con las desviaciones estándar.

y 4). Sin embargo, los niveles de vainillina en este experimento fueron dos órdenes de magnitud superiores a los de capsaicina, lo que sugiere que este intermediario no fue limitante.

En los cultivos expuestos JA, la acumulación de vainillina ocurrió de manera continua durante las primeras 36 h, disminuyendo ligeramente hasta el final del experimento. En los cultivos no expuestos, no se detectó la acumulación significativa de este compuesto (Figura 3). La acumulación de capsaicina no se observó sino hasta después de 36 h, alcanzando su máximo a las 48 h para después caer a niveles indetectables. Los máximos niveles de capsaicina fueron similares a los observados en los cultivos tratados con AS (Figura 4). En cultivos de *C. frutescens*, la exposición a una concentración de 50 nM de MeJa no produjo ningún efecto sobre la acumulación de capsaicina, aun después de 15 días de tratamiento continuo.⁽⁹⁾

De este modo, si bien ambos inductores tuvieron un efecto sobre la acumulación de la capsaicina en los cultivos de *C. chinense*, éstos requirieron un tiempo mayor de exposición al JA que al AS (Figura 4). Este resultado fue inverso al observado sobre la vainillina (Figura 3).

Para obtener mayor información sobre el metabolismo de la capsaicina, se analizaron algunas de las enzimas biosintéticas. Se seleccionaron PAL, por ser la que canaliza los precursores del metabolismo primario, y COMT, ya que se ha sugerido como limitante en cultivos *in vitro*.⁽⁵⁾ La actividad de la PAL no se vio modificada por el tratamiento con ninguno de los inductores durante las primeras 24 h, sin embargo, ambos compuestos previnieron la disminución que ocurrió en los cultivos no expuestos (Figura 5).

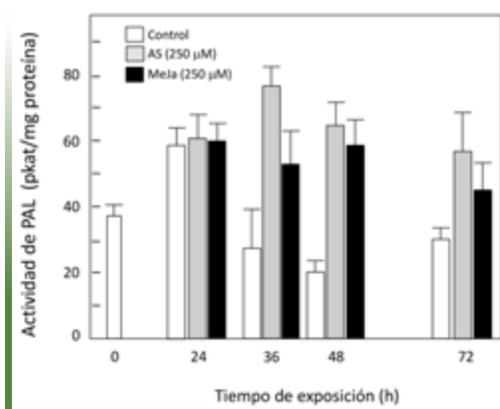
En *C. chinense*, PAL está codificada por una pequeña familia de genes de tres o cuatro miembros^(14,15) y se ha observado una mayor acumulación de los transcritos en los tejidos placentarios de los genotipos de

mayor pungencia, particularmente en las etapas previas a la acumulación de capsaicina.⁽⁵⁾ De este modo, es probable que la mayor actividad de esta enzima en los cultivos expuestos a los inductores haya sido consecuencia de una activación transcripcional, ya sea de solo uno, o bien, de todos los integrantes de la familia génica; sin embargo, es necesario analizar los niveles de los transcritos correspondientes.

La actividad de la COMT se mantuvo entre 20 y 30 pkat/mg proteína a lo largo del experimento en los cultivos no expuestos (Figura 6). Como resultado de la exposición a ambos inductores esta actividad aumentó a valores entre 40 y 60 pkat/mg durante las primeras 24 h (Figura 6). Esos niveles se mantuvieron prácticamente sin cambio a lo largo del experimento, excepto en el último punto (72 h) en los cultivos expuestos al ácido salicílico en donde se observó un aumento significativo (Figura 6).

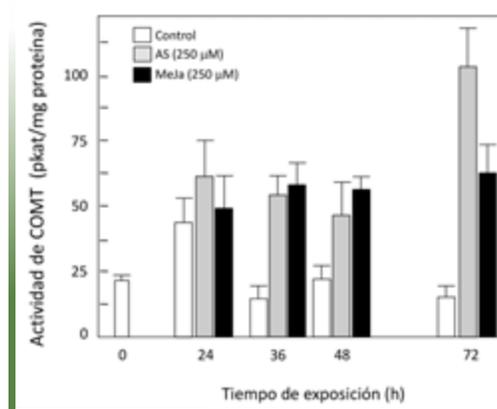
Al igual que la PAL, la COMT en *C. chinense* está codificada por una familia de genes de dos o tres miembros cuyos transcritos

Figura 5
Curso temporal de la actividad enzimática de PAL



Cultivos en suspensión de *C. chinense* fueron expuestos a ácido salicílico (AS), jasmonato de metilo (MeJa) o agua (Control) durante 72 h. Promedio de tres repeticiones con las desviaciones estándar.

Figura 6
Curso temporal de la actividad enzimática de COMT



Cultivos en suspensión de *C. chinense* fueron expuestos a ácido salicílico (AS), jasmonato de metilo (MeJa) o agua (Control) durante 72 h. Promedio de tres repeticiones con las desviaciones estándar.

se acumulan preferentemente en la placenta de los frutos de genotipos de mayor pungencia, previamente a la máxima acumulación de los capsaicina.⁽¹⁴⁾ En otras especies, la familia de genes para la COMT está regulada de manera diferencial en respuesta a diversos factores ambientales, por el estado de desarrollo y de manera tejida específica.⁽¹⁶⁾ Más aún, como parte de la respuesta de defensa al ataque de patógenos o herbívoros, esta enzima resulta activada a nivel transcripcional, lo que conduce a la acumulación de ácido ferúlico que, además de ser un precursor

de la síntesis de capsaicinoides en chile, participa en la formación de la lignina, necesaria para el reforzamiento de la pared celular.⁽¹⁶⁾

De este modo, y dado el papel tanto de AS como de JA en la mediación de la respuesta a diferentes tipos de estrés, nuestros datos sugieren que en los cultivos de *C. chinense* ambos tratamientos llevaron al incremento en la actividad de esta enzima, pero no es posible establecer la relación precisa de este aumento en la actividad con las variaciones en las contenidos de vainillina y capsaicinoides.

Discusión

El objetivo del presente trabajo consistió en el desarrollo de una metodología de inducción de la síntesis de capsaicina en cultivos *in vitro* de *C. chinense*. Como primera etapa, fue necesario obtener una suspensión bien disgregada y con un crecimiento adecuado. Dicha suspensión se generó a partir de un cultivo de callos, utilizando el medio de la misma composición de sales. La capacidad de síntesis de capsaicina en esta línea celular fue menor que la de placenta de frutos de chile habanero, pero sus máximos valores fueron similares a los mínimos observados en el pericarpio (Cuadro 1). Comparada con líneas celulares de *C. annum*^(4,5) y de *C. frutescens*,⁽⁹⁾ la suspensión de chile habanero tuvo valores similares. La aplicación de los dos inductores probados, ácido salicílico (SA) y jasmonato de metilo (JA) en dosis de 250 μ M, resultó en la inducción de la acumulación de capsaicina y de sus precursores, si bien siguiendo diferentes patrones de respuesta. El ácido salicílico produjo un rápido efecto sobre la acumulación de capsaicina, mientras que sus efectos sobre la acumulación del precursor vainillina requirieron un mayor tiempo de exposición. Esta situación fue inversa a la observada en los cultivos

expuestos JA (Figuras 3 y 4). El efecto de AS sobre la acumulación de los capsaicina ha sido reportado en cultivos de *C. frutescens*.⁽⁹⁾ Si bien en el mismo trabajo se comenta sobre un efecto positivo de la exposición a JA, las diferencias no fueron significativas. Además de la especie, los tiempos de exposición a los inductores ensayados, fueron mayores que los probados en el cultivo de *C. chinense*.⁽⁹⁾ En todo caso, la inducción con ambos compuestos, aumentó el contenido de capsaicina más de 10 veces respecto de los controles.

Se debe hacer notar que las diferencias entre los niveles acumulados de vainillina en los cultivos inducidos fueron cerca de 100 veces mayores que los de capsaicina, sugiriendo que ese precursor no es limitante para la formación de capsaicina.

Ambos tratamientos de inducción tuvieron un efecto positivo sobre la actividad enzimática de PAL; sin embargo, dichos efectos se relacionaron principalmente con el mantenimiento de los niveles iniciales de actividad a lo largo del experimento, más que con su aumento (Figura 5). No obstante la coincidencia

de la actividad de PAL con la acumulación de capsaicina en los cultivos tratados, no es posible establecer una relación entre estos dos eventos, ya que la activación de la síntesis de los fenilpropanoides es una respuesta común a las condiciones de estrés, que son mediadas por el AS y los JA.⁽¹⁶⁾ En frutos de *C. chinense*, los niveles de transcritos para PAL aumentan durante el desarrollo del mismo, alcanzando su máximo poco antes de la máxima acumulación de capsaicina.⁽¹⁴⁾ Más aún, la mayor disponibilidad de fenilalanina en cultivos celulares, ya sea por suministro externo, o por selección de líneas sobreproductoras, resulta en una mayor acumulación de capsaicina.^(4,6) Estas observaciones sugieren que una mayor actividad de PAL podría conducir a un aumento en la síntesis de capsaicina. No obstante, en células de *C. frutescens* inmovilizadas y suplementadas con fenilalanina, no encontró relación entre las actividades de PAL y Ca4OH y la acumulación de capsaicina.⁽⁴⁾ En este sentido, los diferentes intermediarios de la síntesis de capsaicina los son también para la síntesis de otros compuestos, como lignina (derivado del cumarato o del ácido ferúlico), flavonoides (del ácido cafeíco) y otros compuestos fenólicos (de la vainillina o del ácido cinámico) y se tiene evidencia de una competencia entre esas vías y la síntesis de capsaicina.^(2,4,6)

Por su parte, la actividad COMT sí aumentó en respuesta a los inductores, presentándose este efecto en la misma medida y al mismo tiempo de exposición para ambos tratamientos (Figura 6). En callos de *C. annuum* cv. Tampiqueño 74, la actividad de esta enzima parece ser uno de los pasos limitantes para la síntesis de capsaicina.⁽⁵⁾ El producto de esta enzima es el ácido ferúlico, precursor de la vainillina, que aumentó de manera notable en los cultivos expuestos a ambos tratamientos (Figura 3). Al menos parte de este aumento pudo resultar de la mayor actividad de esta enzima.

Como ya se comentó, las diferencias entre los niveles de acumulación de vainillina y capsaicina (Figuras 3 y 4), sugieren que los pasos que limitan la formación de la capsaicina en los cultivos de *C. chinense* operan después de la acumulación del compuesto fenólico. Así, es posible sugerir tres puntos limitantes; la conversión de vainillina en vainillilamina, catalizada por la AMT, la condensación de ésta con el 8-metil-6-nonenico, catalizada por CS, así como la disponibilidad de este compuesto.

En cultivos de *C. frutescens* inducidos con JA, el uso de inhibidores se ha establecido importancia de la síntesis del componente acil graso en el proceso.⁽¹⁷⁾

Por otro lado, la baja actividad de CS en cultivos *in vitro* de *C. annuum* es una de las limitantes para la acumulación de capsaicina.⁽⁵⁾ En cultivos de *C. frutescens*, el tratamiento con AS, pero no con JA, resultó en la activación de la CS.⁽⁹⁾ Estos datos apoyan la propuesta de Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta⁽⁵⁾ de que esta enzima representa un paso limitante para la acumulación de capsaicina en cultivos *in vitro*. Respecto de la posible limitante que se establecería por la carencia de la cadena de ácido graso en cultivos inmovilizados de *C. frutescens*, la adición de intermediarios de su síntesis resultó en un aumento de más de 50 veces en el contenido de capsaicina.⁽⁸⁾

La síntesis de capsaicina y su regulación son sensibles al nivel de organización celular. La capsaicina se acumula en estructuras especializadas formadas en la epidermis de la placenta⁽¹⁸⁾ que no están presentes en los cultivos en suspensión.

De este modo, si bien la evidencia de la literatura sugiere que la principal limitante para la formación de capsaicina en nuestros cultivos de *C. chinense* se encuentra a

nivel de la CS, no es posible descartar ninguna de las otras dos posibilidades. Más aún, se han identificado dos genes como posibles factores transcripcionales de la síntesis de capsaicina (β -ZIP),⁽¹⁵⁾ aunque no

se ha demostrado si interactúan, directa o indirectamente, con los promotores de los genes estructurales y cuya participación precisa no se ha definido.

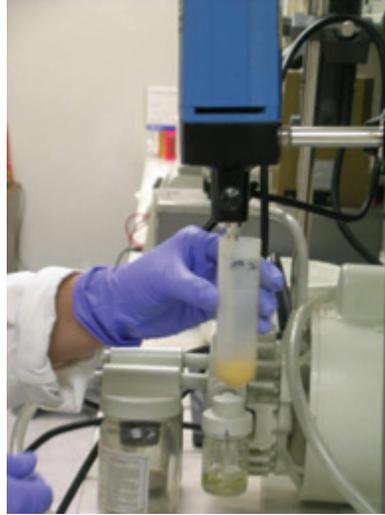
Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con fondos de la Fundación Produce Yucatán (31-2004-0504 y 31-2004-0635) y de Conacyt (Ciencia Básica, P1-60746). Se agradece la colaboración de los I.A.F. Fernando Contreras Martín, Eduardo Balam Uc y Adolfo Guzmán Antonio y de la Q.B.B. Fátima Medina Lara en el mantenimiento de las plantas y los cultivos *in vitro*.

Referencias bibliográficas

- (1) Aza-González C., Núñez-Palenius H.G., Ochoa-Alejo N. 2011. "Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.)". *Plant Cell Rep.* 30: 695-706.
- (2) Vázquez-Flota F., Miranda-Ham M.L., Monforte-González M., Gutiérrez-Carbajal M.G., Velázquez-García C., Nieto-Pelayo Y. 2007. "La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile". *Rev Fitotec Mex* 30: 353-360.
- (3) Lang Y., Kisaka H., Sugiyama R., Nomura K., Morita A., Watanabe T., Tanaka Y., Yazawa S., Miwa T. 2009. "Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet". *Plant J* 59: 953-961.
- (4) Ochoa-Alejo N., Ramírez-Malagón R. 2001. "In vitro chili pepper biotechnology". *In Vitro Cell Dev Biol -Plant* 37:701-729.
- (5) Ochoa-Alejo A., Gómez-Peralta J.E. 1993. "Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruit of chili pepper (*Capsicum annuum* L.)". *J Plant Physiol* 141: 147-152.
- (6) Kothari S.L., Joshi A., Kachhwaha S., Ochoa-Alejo N. 2010. "Chilli peppers—a review on tissue culture and transgenesis". *Biotechnol Adv* 28:35-48.
- (7) Weathers P., Modh F., Cheetham R.D. 1992. "Light inhibits the formation of capsaicin from *Capsicum* callus". *Planta Med* 58: 278-279.
- (8) Holden M., Yeoman M. 1988. "The effects of fungal elicitation on secondary metabolism in cell cultures of *Capsicum frutescens*". In: Robins R.J. and Rhodes M.J.C. (eds.), *Manipulating secondary metabolism in culture*, Cambridge University Press, Cambridge. 67-72.

- (9) Sudha G., Ravishankar G. 2003. "Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill". *Curr Sci.* 85: 1212-1217.
- (10) Maleck K., Dietrich R. 1999. "Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies?" *Trends Plant Sci.* 4:1360-1385.
- (11) Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M.C., Zapata-Castillo P.Y., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O., Miranda-Ham M.L. 2005. "Regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis". *HortScience* 40: 1829-1831.
- (12) Contreras-Padilla M., Yahia E.M. 1998. "Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity". *J Agric Food Chem* 46: 2075-2079.
- (13) Sung Y., Yu-Yun C., Ni-Lim T. 2005. "Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits". *Bot Bull Acad Sin.* 46: 35-42.
- (14) Curry J., Aluru M., Mendoza M., Nevarez J., Melendrez M., O'Connell M. 1999. "Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum spp.*". *Plant Sci.* 148: 47-57.
- (15) Blum E., Mazourek M., O'Connell M., Curry J., Thorup T., Liu K., Jahn M., Paran I. 2003. "Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*". *Theor Appl Genet* 108: 79-86.
- (16) Dixon R., Paiva N. 1995. "Stress-induced phenylpropanoid metabolism". *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- (17) Prasad B.C.N., Gururaj H.B., Kumar V., Giridhar P., Ravishankar G.A. 2006. "Valine pathway is more crucial than phenylpropanoid pathway in regulating capsaicin biosynthesis in *Capsicum frutescens* Mill". *J Agric Food Chem.* 54: 6660-6666
- (18) Zamski E., Shoham O., Palevitch D., Levy A. 1987. "Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars". *Bot Gaz* 148:1-6.





Estudio de la señalización fosfolipídica en la regulación de la producción de vainillina inducida por el ácido salicílico en suspensiones celulares de *Capsicum chinense* Jacq.

Capítulo 23

Beatriz Adriana Rodas-Junco y S.M. Teresa Hernández-Sotomayor*

*Autor responsable: ths@cicy.mx



Resumen

La vía de transducción de señales fosfolipídica involucra la generación de segundos mensajeros a través de enzimas como la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa D (PLD). Los segundos mensajeros generados podrían estar involucrados en la respuesta al ácido salicílico (AS). El AS es reconocido como un inductor del metabolismo secundario en el género *Capsicum*. Este trabajo tiene el objetivo de entender cómo la señalización fosfolipídica regula la producción de vainillina inducida por el AS en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq. Por lo anterior, se empleó a la neomicina (un inhibidor de la enzima PLC) y se evaluó el contenido de la vainillina en suspensiones celulares que fueron preincubadas con el inhibidor antes de la adición del AS. Los resultados muestran que existe una estimulación en la producción de vainillina generada por el AS, sin embargo, ésta es atenuada por la neomicina. Esto sugiere que los segundos mensajeros generados por la enzima PLC podrían estar regulando la respuesta a la inducción con el AS y por lo tanto tener un efecto en la acumulación de la vainillina en las suspensiones celulares de *C. chinense*.

Palabras clave

Fosfolipasas, neomicina

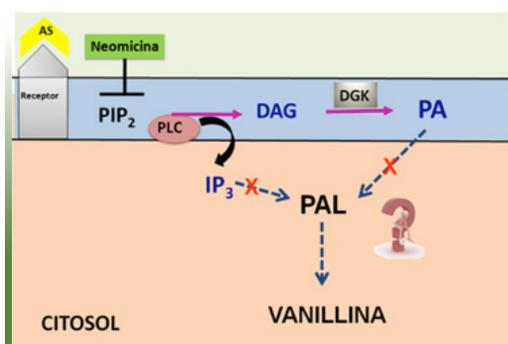
Introducción

Las plantas se encuentran expuestas a diferentes tipos de estrés debido a las condiciones ambientales que pueden afectar su crecimiento y desarrollo. La respuesta de las plantas al estrés se puede dar a través del reconocimiento del estímulo y la posterior transducción de la señal a través de segundos mensajeros que envían la información para la regulación del metabolismo y la expresión de genes de defensa.

Resultados

Partiendo del concepto de que la señalización llevada a cabo por la vía de la enzima PLC y la acumulación de un intermediario de la biosíntesis de capsaicinoides, en este caso la vainillina, son dos eventos que pudieran relacionarse como respuesta a la inducción con el AS, se propone un modelo de señalización donde se sugiere que el AS es percibido por receptores localizados en la membrana plasmática (Figura 1).

Figura 1
Modelo hipotético de la señalización de la PLC en respuesta al AS



Se presenta un modelo en suspensiones celulares de *C. chinense* y la posible regulación de los segundos mensajeros en la producción de vainillina. AS: ácido salicílico; PIP₂: Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato; IP₃: Inositol 3,4,5 trifosfato; DAG: Diacilglicerol; PAL: Fenilalanina amonio liasa; DGK: Diacilglicerol cinasa; PA: Fenilalanina.

La percepción de esta señal provoca la modificación en el metabolismo de los fosfolípidos, con la consecuente generación de los segundos mensajeros. En nuestro modelo se hipotetiza la posible regulación de los segundos mensajeros como el IP₃ y el PA en la producción de vainillina estimulada por el AS en suspensiones celulares de *C. chinense*.

Probablemente los pasos finales en la transducción de la señal del inductor podrían involucrar la traslocación de cinasas hacia

el núcleo para modular factores de transcripción, resultando en un incremento en la expresión de genes que codifican para las enzimas que tienen un papel importante en la ruta de biosíntesis de la vainillina (en este caso la fenilalanina amonio liasa) en suspensiones celulares de *C. chinense*.

Para entender cómo la señalización fosfolipídica se encuentra regulando el metabolismo de los capsaicinoides, donde la vainillina es un intermediario, se ha evaluado la actividad de la enzima clave en la vía de los fenilpropanoides, la fenilalanina amonio liasa (PAL).

En experimentos realizados, la actividad de la PAL es estimulada por el AS (datos no mostrados) en las suspensiones celulares de *C. chinense*, sin embargo, el incremento en la actividad de la PAL generada en las células por el tratamiento con el AS es disminuida cuando también está presente en las células la neomicina.

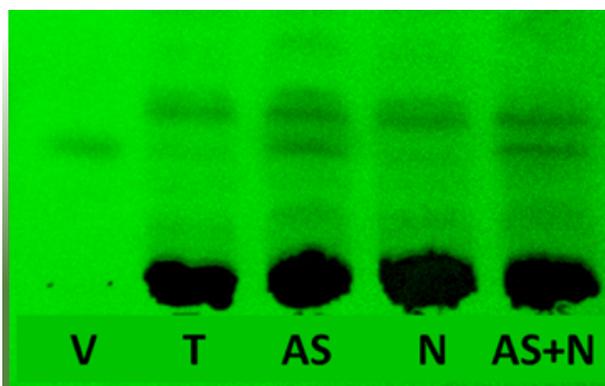
Esto podría sugerir que la activación de la PAL estimulada por el AS podría ser regulada por los segundos mensajeros generados en la vía de la enzima PLC. Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos para analizar el efecto de la neomicina en la producción de vainillina estimulada por el AS. Brevemente, las suspensiones celulares con 14 días del ciclo de cultivo (1g de células) fueron colocadas en 25 ml de medio Murashige and Skoog (MS) fresco en presencia y ausencia de neomicina (100 μM) durante una preincubación de 15 min antes de la adición del AS (200 μM).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la neomicina tiene un efecto negativo en la producción de vainillina. En las células que contenían el AS la producción de

vainillina resultó estimulada en las suspensiones celulares de *C. chinense* (Figura 2). La estimulación de la formación de vainillina inducida por el AS fue disminuida cuando las células fueron preincubadas con la

neomicina. Además, en las células con el tratamiento únicamente con la neomicina, la producción de vainillina presenta niveles similares al testigo.

Figura 2
Producción de vainillina en
las suspensiones celulares de *C. chinense*



Las suspensiones celulares fueron expuestas a neomicina 100 μ M. La fase móvil utilizada fue ciclohexano:cloroformo:ácido acético (70:20:10). V: estándar de vainillina; T: testigo, suspensiones celulares que no fueron sometidas a tratamiento con neomicina; AS: ácido salicílico, suspensiones celulares tratadas con el AS; N: Neomicina, suspensiones celulares tratadas con la neomicina; AS+N: suspensiones celulares tratadas con la neomicina y el AS. Las muestras fueron observadas en luz UV a 281 nm.

Discusión

La utilización de inductores es una herramienta que permite incrementar la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos celulares que producen cantidades muy pequeñas de éstas sustancias. Varios estudios han demostrado que la cascada de señalización de la vía de la PLC tiene un papel importante en la respuesta de la planta a los inductores.⁽⁴⁾ La utilización de inhibidores que interfieran en la generación de los segundos mensajeros como la neomicina, ha permitido generar evidencias del efecto inhibitorio de este aminoglucósido en diferentes eventos en la vida de la planta tales como la respuesta

de defensa estimulada por los inductores, la deflagelación y la expresión de genes inducidos por estrés hiperosmótico.⁽⁵⁾

La inhibición de la PLC consistentemente atenúa el contenido de vainillina estimulada por el AS y afecta la actividad enzimática de la PAL en las suspensiones celulares de *C. chinense*. Nuestros resultados son consistentes con lo observado en la estimulación en la síntesis de la antraquinona en *R. tinctorum* por el quitosano, donde su acumulación fue en gran medida reducida con los antagonistas de la PLC, la neomicina y el U-73122.⁽⁶⁾

Por otra parte varios estudios han reportado la participación de los segundos mensajeros como el IP_3 en la acumulación de pisatina en guisante,⁽⁷⁾ furanocumarinas en perejil,⁽⁸⁾ antraquinonas en rubia roja,⁽⁹⁾ medicarpina en suspensiones celulares de alfalfa⁽¹⁰⁾ y tujaplicina en el ciprés mexicano.⁽¹¹⁾

Existen reportes de que otro segundo mensajero como el PA puede regular la biosín-

tesis de metabolitos secundarios como la silimarina en cultivos celulares de *Silybum marianum*⁽¹²⁾ y fitoalexinas en suspensiones celulares de arroz,⁽¹³⁾ a pesar de esto poco se conoce acerca de la función de las fosfolipasas y sus productos en la regulación de la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Conclusiones

Nuestros datos muestran que los segundos mensajeros generados por la vía de la PLC podrían estar modulando la producción de vainillina estimulada por el AS a través de la activación de enzimas claves de la ruta de biosíntesis para la producción de vainillina

como la PAL. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo exacto de acción de los productos de la enzima PLC en la regulación de la respuesta al inductor punto clave a esclarecer en futuros estudios.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo técnico de los M. en C. Armando Muñoz-Sánchez y Miriam Monforte-González. Este trabajo es financiado por el proyecto Núm. 98352 y la beca de Conacyt Núm. 89390 para BARJ.

Referencias bibliográficas

- (1) Kashem M.A., Itoh K., Iwabuchi S., Hori H., Mitsui T. 2000. "Possible involvement of phosphoinositide- Ca^{2+} signaling in the regulation of alpha-amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.)". *Plant Cell Physiol* 41: 399–407.
- (2) Asatsuma S., Sawada C., Itoh K., Mitsutoshi Okito M., Kitajima A., Mitsui T. 2005. "Involvement of α -Amylase I-1 in starch degradation in rice chloroplasts". *Plant Cell Physiol* 46: 858–869.
- (3) Xue H.W., Chen M.X. 2009. "Function and regulation of phospholipid signaling in plants". *Biochem. J* 421: 145-156.
- (4) Meijer H.J.G., Munnik T. 2003. "Phospholipid-based signaling in plants". *Ann. Rev Plant Biol* 54: 265-306.
- (5) Toyoda K., Shiraishi T., Yamada T., Ichinose Y., Oku H. 1993. "Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals". *Plant and Cell Physiol* 34: 729–735.

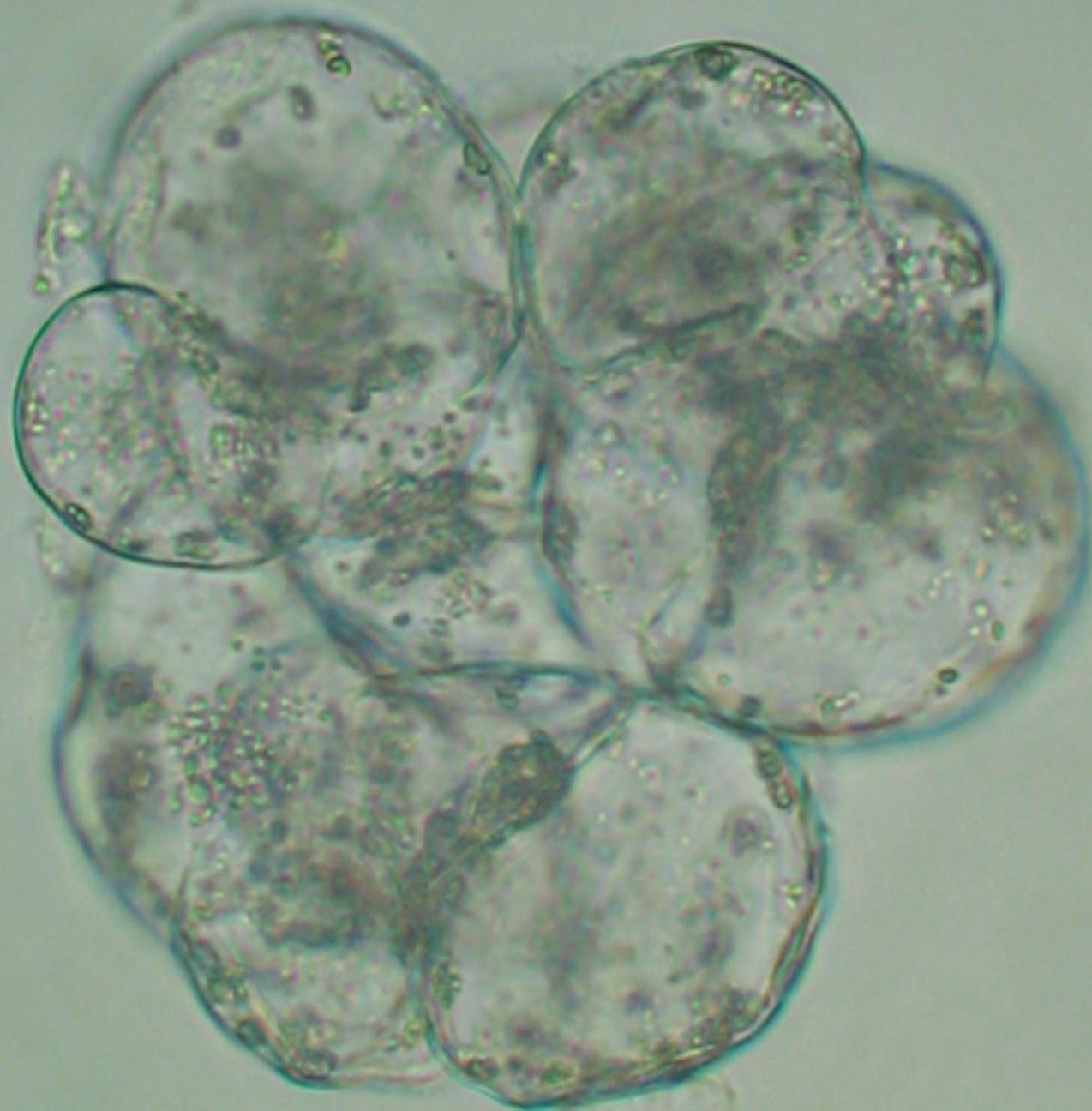
- (6) Vasconsuelo A.A., Giuletti A.M., Picotto G., Rodríguez-Talou J., Boland R. 2003. "Involvement of the PLC/PKC pathway in chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures". *Plant Sci.* 165 429–436.
- (7) Toyoda K., Shiraishi T., Yoshioka H., Yamada T., Ichinose Y., Oku H. 1992. "Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*". *Plant Cell Physiol* 33: 445–452.
- (8) Renelt A., Colling C., Hahlbrock K., Nuernberger T., Parker J., Sacks W., Scheel D. 1993. "Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defense". *J Exp Bot* 44: 257–268.
- (9) Vasconsuelo A.A., Morelli S., Picotto G., Giuletti A.M., Boland R. 2005. "Intracellular calcium mobilization: a key step for chitosan-induced anthraquinone production in *Rubia tinctorum* L.". *Plant Sci* 169 712–720.
- (10) Walton T.J., Cooke C.J., Newton R.P., Smith C.J. 1993. "Evidence that generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and hydrolysis of phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate are rapid responses following addition of fungal elicitor, which induces phytoalexin synthesis in lucerne suspension culture cells". *Cell Signal* 5:345–356.
- (11) Zhao J., Guo Y., Kosaihira A., Sakai K. 2004. "Rapid accumulation and metabolism of polyphosphoinositol and its possible role in phytoalexin biosynthesis in yeast elicitor-treated *Cupressus lusitanica* cell cultures". *Planta* 219: 121–131.
- (12) Madrid E., Corchet P. 2010. "Silymarin secretion and its elicitation by methyl jasmonate in cell cultures of *Silybum marianum* is mediated by phospholipase D-phosphatidic acid". *J Exp Bot* 61:747–754.
- (13) Yamaguchi T., Shigeru T., Eiichi M., Shibuya N. 2004. "Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells". *Plant Cell Physiol* 45: 1261-1270.



A high-magnification micrograph of a cell, likely a yeast or similar microorganism. The cell is roughly spherical and contains a large, dark, centrally located nucleus. Within the nucleus, a smaller, denser nucleolus is visible. The cytoplasm is filled with various organelles and granules. The cell is resting on a dark, textured surface, possibly a petri dish or a slide.

Sección V 

Los desarrollos biotecnológicos



Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la Península de Yucatán

Capítulo 24

Nancy Santana Buzzy,* Adriana Canto Flick, Eduardo Balam Uc, Susana Avilés Viñas, Carlos A. Lecona Guzmán, Guadalupe López Puc, Emily Marín Collí, Carlos Regla Márquez, Sthepanie López Erosa, Alejandrina Pereira Patrón, Pedro Osorio Montalvo, Raúl Valle Gough, Jericó Bello Bello, Daniela Solís Marroquín, Eunice Gómez Uc, Liliana Muñoz Ramírez, Laura Peña Yam y Jacobo Pérez Pastrana
*Autor responsable: nancy@cicy.mx



Resumen

Capsicum es un género reconocido como recalcitrante a la regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro*, razón por la que aún resulta muy difícil aplicar las técnicas biotecnológicas para su mejoramiento genético. Sin embargo, se ha logrado la inducción de brotes y embriogénesis somática en la especie *C. annuum*. Estos protocolos muestran baja eficiencia, baja reproducibilidad, baja capacidad de germinación y alto índice de embriones deformados, mientras que los brotes se forman arrosados y no alcanzan a elongarse. Esta incapacidad de los chiles para desarrollar plantas completas *in vitro* limitan el uso de las técnicas biotecnológicas en el mejoramiento y propagación de sus cultivares. En nuestro grupo se han desarrollado protocolos de regeneración (embriogénesis somática, organogénesis y brotes múltiples) altamente eficiente y reproducible para *Capsicum*. Sin embargo, la incapacidad para desarrollar plantas a partir de embriones somáticos representa una limitante para la aplicación de la Biotecnología al mejoramiento de chile habanero.

Palabras clave

Regeneración *in vitro*, recalcitrancia, embriogénesis somática, organogénesis

Introducción

Capsicum es un género reconocido como recalcitrante a la regeneración de plantas bajo condiciones *in vitro*, por ello es muy difícil aplicar las técnicas biotecnológicas para su mejoramiento genético. Aunque son pocos los reportes de morfogénesis

de chile *in vitro*, hasta fecha reciente solo se había logrado la inducción de brotes y la embriogénesis somática en la especie *C. annuum*.^(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10) Sin embargo, los protocolos de embriogénesis somática de *Capsicum* reportados a la fecha muestran la baja eficiencia, baja reproducibilidad, baja capacidad de germinación y el alto índice de embriones deformados, mientras que, por otro lado, los brotes se arrosetan y no alcanzan a elongarse después de formados. Esta incapacidad de los chiles para desarrollar plantas completas *in vitro*, limitan sustancialmente el uso de las técnicas biotecnológicas en el mejoramiento y propagación de sus cultivares.

Resultados

Nuestro grupo es pionero en los trabajos de regeneración de plantas *in vitro* de chile habanero (*Capsicum chinense*).^(11,12,13,14,15,16,17,18) Recientemente hemos incorporando la especie *C. annuum* a nuestros estudios de regeneración, también con resultados prometedores (Figura 1).

Figura 1
Embriogénesis somática directa de *Capsicum annuum*



En este sentido reportamos la regeneración *in vitro* para *C. chinense*, a partir de la inducción de brotes múltiples, con escalado a un sistema de inmersión temporal (Bio-MinT) (Figura 2) donde pudimos superar los problemas de elongación de los brotes, problema común al género.⁽¹⁸⁾ Realizamos, además, los primeros reportes de Embriogénesis Somática, directa e indirecta para chile habanero.^(13,14) Actualmente contamos

con un sistema de *Embriogénesis Somática Directa de Alta Eficiencia en Medio Líquido* (Figura 3) (Avilés-Viñas and Santana-Buzzy, datos sin publicar). Contrario a lo que se ha reportado para *C. annuum*, los protocolos de embriogénesis somática en chile habanero que hemos establecido son altamente eficientes y reproducibles, tanto directa como indirectamente.

Contrario a la dependencia del genotipo y del explante reportada para *C. annuum*, en chile habanero hemos inducido la embriogénesis somática a partir de diferentes tipos de explantes, siendo el hipocotilo el explante más eficiente. Sin embargo, nos encontramos trabajando para superar dos de los problemas también reportados para el género *Capsicum*: la alta frecuencia de embriones deformados y la baja capacidad de germinación de los embriones somáticos, lo que limita drásticamente la regeneración de plantas completas en la especie.

Para lograr un mayor entendimiento sobre la naturaleza de este fenómeno que afecta no solo a todos los chiles sino a muchas otras especies vegetales, estamos estudiando el papel que juegan diferentes factores en la recalcitrancia del género *Capsicum*: el

etileno acumulado en los recipientes de cultivo; las proteínas en los embriones somáticos; las poliaminas, tanto endógenas como adicionadas al medio de cultivo; los RCV,

particularmente el 2,4-D; algunos genes asociados con la histodiferenciación y con la formación del meristemo apical, entre otros.

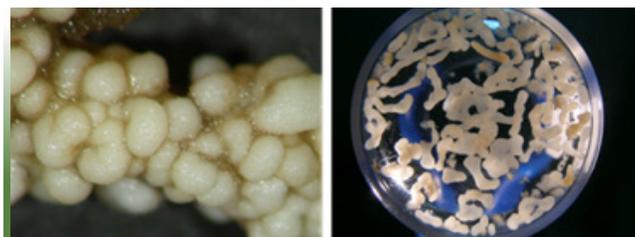
Figura 2

Regeneración *in vitro* de *Capsicum chinense*, a partir de la inducción de brotes múltiples, con escalado a un sistema de inmersión temporal (BioMinT)



Figura 3

Embriogénesis somática directa de alta eficiencia en medio líquido, de *C. chinense*



El papel del etileno

El etileno ha sido uno de los factores pioneros en los estudios que venimos realizando sobre la recalcitrancia de chile habanero (*C. chinense*) y al que le hemos dedicado una especial atención por los dramáticos efectos que provoca a los cultivos de tejidos de esta especie. En los inicios del proyecto de chile habanero, detectamos la alta sensibilidad de esta especie al etileno acumulado en los recipientes de cultivo durante la regeneración *in vitro*. Los primeros trabajos donde evaluamos la respuesta de diferentes

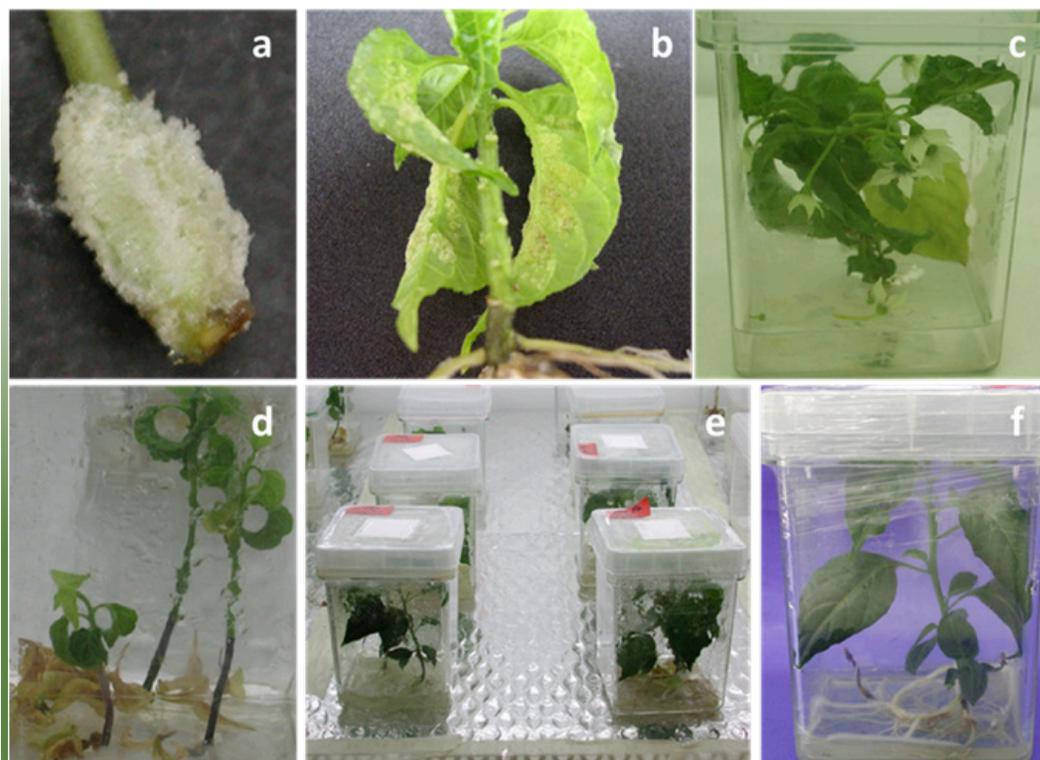
tipos de explantes de chile habanero a la inducción de brotes, en el tratamiento control (sin RCV) pudimos observar una amplia gama de respuestas que evidenciaban una interacción del explante con la presencia de RCV en el medio de cultivo. Pudimos inferir que la presencia del gas regulador etileno, frecuentemente presente en los cultivos *in vitro*, probablemente estuviera provocando este anormal comportamiento, similar a los efectos que provoca el etileno en las plantas: triple respuesta, floración *in vitro*, abscisión

de las hojas, envejecimiento precoz de las plántulas y presencia de callo a lo largo de todo el cuerpo de la planta. Posteriormente constatamos que la respuesta de los explantes de chile habanero a las condiciones de cultivo es contrastantemente diferente cuando los explantes son cultivados en recipientes ventilados y sin ventilar, sin reguladores de crecimiento. El etileno acumulado en el recipiente de cultivo provoca un efecto realmente dramático desde que se inicia el cultivo *in vitro* y a lo largo del desarrollo de los brotes (Figura 4).⁽¹¹⁾ El empleo de inhibidores de etileno en el medio de cultivo (CoCl_2 y AgNO_3), o la ventilación de los recipientes de cultivo, han permitido reducir el efecto negativo de este regulador sobre los brotes.⁽¹²⁾ Sin embargo, a fin de conocer

más sobre la naturaleza del efecto de este gas regulador sobre la regeneración *in vitro* de chile habanero, analizamos el comportamiento de dos genes relacionados con el etileno: ERP (Ethylene Responsive Protein) y ACCO (oxidasa del ácido aminociclopropano-1-carboxílico), ambos donados por el grupo del Dr. Zúñiga, aislados de una biblioteca de ADNc de suspensiones celulares de *Capsicum chinense*. Los resultados revelaron una expresión diferencial durante el ciclo de cultivo, cuando se cultivaron los brotes en recipiente sin ventilación, respecto de los ventilados, así como del gen de la actina (donado también por el Dr. Zúñiga) empleado como control. Los patrones de expresión diferencial obtenidos evidenciaron diferencias entre los tratamientos evaluados.⁽¹⁹⁾

Figura 4

Anormalidades observadas durante el cultivo *in vitro* de chile habanero, en presencia de etileno



a) Formación de callo en los extremos del segmento nodal; b) Formación de callo en diferentes partes de la planta; c) Floración temprana; d) Abscisión de hojas; e y f) Plántulas desarrolladas en recipientes ventilados sin presencia de etileno.

Las proteínas endógenas

El panorama de las proteínas endógenas en la embriogénesis somática de chile habanero tampoco ha sido muy alentador al relacionarlo con la baja capacidad de germinación de los embriones somáticos de esta especie. En un trabajo realizado,⁽²⁰⁾ donde se estudió el comportamiento de las proteínas a lo largo del desarrollo de los embriones somáticos de chile habanero, se observó que, contrario a lo reportado para embriones somáticos de otras especies, el contenido de proteínas de los embriones somáticos de chile habanero disminuye drásticamente con el avance de su desarrollo, observando que el embrión globular presenta la mayor concentración de proteínas y al arribar al estadio cotiledonar las proteínas se abaten, llegando a ser dramáticamente bajo su contenido. Al analizar el perfil proteico se evidenciaron nueve péptidos que fueron exclusivos para el embrión cigótico, los cuales no se expresaron en el perfil proteico del embrión somático de esta especie. Coincidentemente, cinco de estos péptidos mostraron pesos moleculares similares a los reportados para proteínas de reserva en otras especies. Como resultado de un análisis bidimensional (2D) del perfil proteico del embrión somático y del embrión cigótico de chile

habanero, fueron detectadas proteínas las cuales estuvieron ubicadas en un rango de pesos moleculares de 20 y 130 KDa, y el rango de 3-10 de punto isoelectrico (pI). Sin embargo, la mayoría de las proteínas se expresaron en el rango de peso molecular comprendido entre 33 y 120 KDa y entre 4 y 7 (pI), para ambos tipos de embriones. De manera similar, en el perfil del embrión cigótico se observó un grupo de proteínas enmarcadas en un rango de peso molecular de 40 a 40 KDa y en rango de pI entre 7 y 10, las cuales solo estuvieron presentes en el perfil proteico del embrión cigótico, no así en el del embrión somático. Este grupo de proteínas, por el rango de peso molecular y de punto isoelectrico donde se localizaron, pudieran pertenecer a proteínas de reserva, probablemente a las globulinas, aunque se requeriría secuenciar esas proteínas para confirmar su identidad. Estos resultados permiten inferir que este grupo de proteínas que están presentes en el perfil proteico del embrión cigótico y ausentes en el perfil proteico del embrión somático cotiledonar, pudieran tener alguna relación con la maduración del embrión y, en consecuencia, con la incapacidad de estos embriones somáticos para germinar y convertirse en plantas.

La influencia de las poliaminas

En los estudios realizados sobre el comportamiento de las poliaminas durante la embriogénesis somática de *C. chinense*, hemos encontrado evidencias de que el contenido de estas aminas alifáticas (Pas) en los embriones somáticos difieren significativamente del contenido observado en el embrión cigótico de esta especie. De las diferentes poliaminas detectadas, Putrescina (Put) y Cadaverina (Cad) fueron las más

abundantes, mientras que la Espermidina (Spd) y la Espermina (Spm) solo pudieron ser detectadas en embriones somáticos. Hemos detectado, además, tanto en embrión cigótico como en embrión somático, la presencia de Cadaverina (Cad), una poliamina poco común en plantas, siendo su contenido significativamente mayor en los embriones somáticos, en especial cuando fueron cultivados en recipientes sin venti-

lación (SV). El contenido de PAs en los embriones somáticos de *C. chinense* también varió durante el desarrollo, siendo menor en los estadios tempranos (globular y corazón), aumentando hacia los estadios más avanzados (torpedo y cotiledonar). Se ha observado también que las condiciones de cultivos (con ventilación y sin ventilación) influyen en el contenido de Pas, siendo mayores en embriones cultivados en recipientes sin ventilación (SV).⁽²¹⁾

Estamos estudiando el efecto de la aplicación de poliaminas al medio de cultivo, así como del uso de inhibidores de poliaminas (ciclohexilamina, aminoguanidina, α -Difluorometilarginina, y α -Difluorometilornitina) durante la embriogénesis somática de esta especie, con el fin de determinar el rol de estos compuestos en la recalcitrancia del género *Capsicum*. Resultados preliminares indican que, al parecer, la aplicación exógena de algunas poliaminas puede influir favorablemente en la germinación de los embriones somáticos de chile habanero.⁽²²⁾

Un factor muy controvertido en los sistemas de regeneración, por su naturaleza mutagénica y a su vez por ser un inductor por excelencia de la embriogénesis somática, es el 2,4-D. Esta auxina sintética resulta fundamental durante la inducción de la embriogénesis somática, mientras que es antagónica con la histodiferenciación, por lo que de manera general es suprimida del medio de cultivo en esta etapa del proceso. Este regulador de crecimiento vegetal es considerado como el factor responsable del desarrollo anormal del meristemo apical durante el cultivo *in vitro*, en diversas especies vegetales.⁽²³⁾ Nuestros resultados en este sentido pudieran ser alarmantes

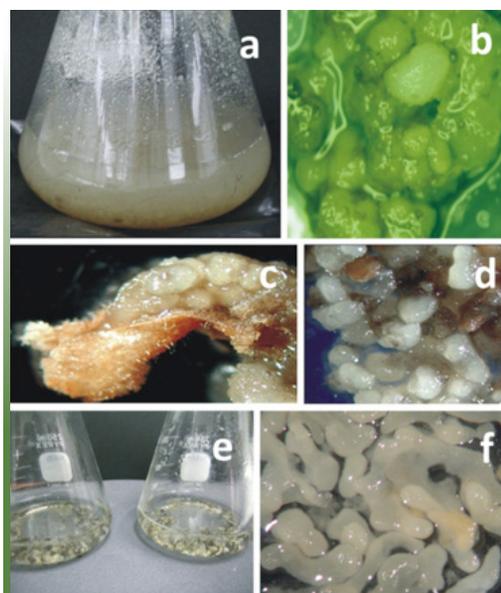
ya que hemos encontrado que existe una dependencia del explante por el 2,4-D, no solo para que la embriogénesis somática sea inducida sino a todo lo largo de la histodiferenciación de los embriones somáticos de chile habanero. A diferencia de los sistemas de embriogénesis somática reportados a la fecha, para otras especies, el 2,4-D no puede suprimirse después de inducida la embriogénesis somática en chile habanero, de lo contrario, el proceso se detiene y los embriones no avanzan más allá del estadio globular. Nuestra hipótesis es que el 2,4-D pudiera estar relacionado con las deformaciones de los embriones al arribar al estadio torpedo-cotiledonar, en esta especie. Estudios anatómicos nos muestran que los embriones somáticos de chile habanero cuentan con un meristemo radicular muy bien definido, y los tejidos vasculares están bien formados y organizados. Sin embargo, las deformaciones detectadas en la mayoría de los casos han sido localizadas siempre en el meristemo apical. Estos resultados permiten inferir que el 2,4-D pudiera ser un elemento desestabilizador durante el desarrollo y, en consecuencia, puede estar relacionado con la malformación que sufre el meristemo apical de los embriones de esta especie. Esta pudiera ser una de las causas fundamentales de incapacidad de los embriones somáticos de chile habanero para germinar, por lo que estamos estudiando el papel de algunos genes, como *Wuschel* (*Wus*), *Clavata* (*CLV3*), *Cup-shaped cotyledon 2* (*CUC2*), *Leafy cotyledon 1* y *2* (*LEC1* y *LEC2*) y *Shoot meristem* (*STM*), en el desarrollo del meristemo caulinar de los embriones somáticos de chile habanero y, muy posiblemente, del género *Capsicum*.

Avances en la regeneración *in vitro* de *C. chinense*

Actualmente contamos con un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa que permite la obtención de plantas completas capaces de crecer y desarrollarse en campo. Este protocolo inicia a partir del establecimiento de nudos como explante inicial, que son cultivados en medio MS semisólido conteniendo tidiiazurón (TDZ, 3.4 μM) y paclobutrazol (PAC, 3.4 μM). Bajo estas condiciones se han obtenido por primera vez no solo en la especie sino también en el género *Capsicum*, neoformaciones o estructuras organogénicas. Una vez formados los brotes, éstos son transferidos a medio de elongación.⁽¹⁸⁾ Este sistema de regeneración de chile habanero actualmente es el más eficiente y reproducible, el cual fue posible cuantificar un promedio de 25 brotes por explante, superando los resultados reportados para el género *Capsicum* (Figura 5). También contamos con protocolos de embriogénesis somática directa e indirecta en medio líquido y semisólido (Figura 6), ambos altamente eficientes y reproducibles, los cuales, ade-

más de ser nuestro objeto de estudio, nos ha permitido avanzar en el establecimiento de protocolos de "selección bajo presión" para diferentes tipos de estrés abiótico.

Figura 5
Organogénesis en chile habanero



a) Obtención de brotes; b) Brotes aislados; c) Elongación y Enraizamiento.

Obtención de líneas embriogénicas de chile habanero tolerantes a estrés hídrico (peg) y de salinidad (nacl) *in vitro*

En lo particular, la salinidad y la sequía constituyen en la actualidad la principal causa de pérdidas en el rendimiento de los cultivos económicamente importantes.⁽²⁴⁾

Orellana *et al.* (2012) pronostican que la precipitación pluvial en la Península de Yucatán disminuirá en los próximos 12 años, mientras que la temperatura aumentará, como consecuencia del calentamiento global. Por estas razones y dada la importancia del cultivo de chile habanero, es necesario contar con programas de mejoramiento

genético enfocados a la obtención de cultivares más tolerantes a los estrés que la naturaleza les impone.

La variación generada a partir del cultivo *in vitro* conocida como "variación somaclonal"⁽²⁶⁾ es una herramienta biotecnológica de gran utilidad para la obtención de regenerantes con características agronómicas deseables, como son la tolerancia a sequía, salinidad o resistencia a enfermedades.^(27,28) En chile habanero hemos

analizado la variación genética obtenida a través de diferentes sistemas de regeneración por medio de marcadores moleculares RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Como resultado, detectamos una alta frecuencia de variación somaclonal en los sistemas de regeneración que hemos establecido (embriogénesis somática directa e indirecta, y organogénesis directa). Esto ha sido la base para desarrollar metodologías de “selección bajo presión”, con el fin de obtener líneas embriogénicas tolerantes a *estrés hídrico* y a *salinidad*, em-

pleando como factores de selección polietilenglicol (PEG) y NaCl, respectivamente. Los valores de supervivencia, así como los análisis moleculares, análisis de contenido de prolina y de proteínas, evidenciaron que cuando los embriones fueron expuestos a 15% de PEG o a 100mM de NaCl, se generaron embriones somáticos de chile habanero, tolerantes tanto a estrés de sequía como de salinidad, respectivamente. Ambas líneas embriogénicas seleccionadas mostraron perfiles de ADN diferentes al de la planta donante, mediante el empleo de marcadores RAPDs e ISSR.

Análisis y perspectivas

Desde hace algunos años, las investigaciones del grupo han estado enfocadas al mejoramiento genético de chile habanero. La obtención de variedades más tolerantes, más productivas y mejor adaptadas a las condiciones ambientales, ha estado sustentada en la implementación de métodos que permitan reducir el tiempo y los recursos para lograr nuestro objetivo. En el mejoramiento genético, la eficiencia dependerá en gran medida de la disponibilidad de germoplasma de la especie, así como del empleo de herramientas biotecnológicas y moleculares, como complemento fundamental de los métodos clásicos de mejora en plantas. Esta integración de métodos ha permitido la selección y reincorporación al campo, de ocho variedades *criollas sobresalientes* de chile habanero, lo que marca el inicio irreversible de innovación de la tecnología de este importante cultivo en la región. Estas variedades han sido seleccionadas a partir del germoplasma de la especie, colectado en la región, y apoyándonos en las técnicas moleculares para la identificación de los genotipos⁽¹⁵⁾ y el uso del HPLC⁽¹⁶⁾ para determinar el nivel de pungencia. Paralelamente, hemos desarrollado protocolos de regeneración

altamente eficientes y reproducibles para el género *Capsicum* (embriogénesis somática, organogénesis y brotes múltiples). Sin embargo, la incapacidad para desarrollar plantas, tanto de los brotes como de los embriones somáticos, representa un significativo obstáculo para la aplicación de la biotecnología al mejoramiento de chile habanero. Sin embargo, los estudios que estamos realizando nos permiten entender que la recalcitrancia es un fenómeno mucho más complejo que una simple relación de factores externos con el explante. El desbalance endógeno de las proteínas en los embriones somáticos; la presencia de la Cad, una poliamina poco común en plantas; la dramática sensibilidad de esta especie al etileno que se acumula en los recipientes de cultivo, constatada además, a través de la expresión diferencial de genes, observada en brotes de chile habanero desarrollados en recipientes sin ventilación comparado con brotes desarrollados en recipientes ventilados, así como la marcada dependencia de los embriones al 2,4-D durante la fase de histodiferenciación relacionada probablemente con el alto índice de embriones deformados. Lo que demuestra que este panorama pudiera ser interpre-

tado como la causa de la incapacidad de esta especie, posiblemente del género, para desarrollar plantas completas *in vitro*. Nuestros resultados nos permiten discrepar con algunos reportes que se afirman que la eficiencia y la reproducibilidad de los sistemas de regeneración en el género *Capsicum* son bajas. Actualmente contamos con sistemas altamente eficientes y reproducibles, tanto para *C. chinense* como para *C. annum*, tanto en lo relativo a la dependencia del genotipo como del tipo de explante. Aunque hemos determinado utilizar *hipocotilo* como explante común en nuestros protocolos de embriogénesis somática, hemos logrado inducir este proceso directa e indirectamente con una amplia variedad de explantes en ambas especies de *Capsicum*. Estos sistemas de embriogénesis somática nos han permitido contar con líneas embriogénicas tolerantes a salinidad y sequía para chile habanero. En conclusión, *C. chinense* ha resultado un modelo excelente para estudiar el fenómeno de la recalcitrancia *in vitro*. A pesar de que la severa recalcitrancia del género ha sido la principal razón para los limitados avances en el empleo de estas técnicas con fines de propagación y mejora en el género *Capsicum*, actualmente existen avances significativos sobre la regeneración de dos de las especies más importantes especies de los chiles: *C. chinense* y *C. annum*. Por otro lado, los progresos alcanzados en los

últimos años en *Capsicum* han contribuido a una mejor comprensión del fenómeno de recalcitrancia; sin embargo, falta mucho por hacer en este sentido. Sin duda, el conocimiento alcanzado solo está indicando que nuevas rutas deben ser exploradas para lograr la regeneración de plantas normales de *Capsicum in vitro*. El estudio de genes relacionados con la formación y desarrollo del meristemo apical es un imperativo ya que la gran limitante en los sistemas de regeneración embriogénicos de *C. chinense* es que las plantas generadas carecen de meristemo apical o está deformado. Genes como WUS y CLV, los cuales están muy relacionados con la formación del meristemo apical, y como PIN1, que son responsables del transporte de las auxinas, son analizados para determinar su relación con las malformaciones de los embriones de *Capsicum*. Otros genes de interés son aquellos relacionados con la maduración de los embriones somáticos, como son ABI3, FUS3, LEC1, LEC2, CUC1, CUC2 y STM,^(29,30,31,32) y que también son analizados en nuestro modelo de regeneración. De la misma manera, genes considerados clave en la regulación de la embriogénesis somática como BBM y SERK^(29,32) son excelentes candidatos para estudiar su expresión durante la embriogénesis somática de *C. chinense* y su relación con la recalcitrancia *in vitro* de esta especie.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento de este trabajo a fondos mixtos Yuc-2008-CO6-105699 y a Conacyt (Ciencia Básica 2008, 100496). Así como al doctor José Juan Zúñiga Aguilar por los genes donados y al doctor Manuel L. Robert Díaz por facilitar el uso de biorreactores de inmersión temporal BIOMINT®.

Referencias bibliográficas

- (1) Agrawal S., Chandra N. 1983. "Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania". *Curr Sci* 52:645-46.
- (2) Ochoa-Alejo N., Ireta-Moreno L. 1990. "Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*". *Sci. Hort.* 42:21-28.
- (3) Arroyo R., Revilla M.A. 1991. "In vitro plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars". *Plant Cell Rep.* 10:414-416.
- (4) Szasz A., Nervo G., Fari M. 1995. "Screening for in vitro shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron". *Plant Cell Rep.* 14: 666-669.
- (5) Ramírez-Malagón R., Ochoa-Alejo N. 1996. "An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method". *Plant Cell Rep.* 16:226-231.
- (6) Binzel M.L., Sankhla N., Joshi S., Sankhla D. 1996. "Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.)". *Plant Cell Rep.* 15: 535-540.
- (7) Husain S., Jain A., Kothari S.L. 1999. "Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum*". *Plant Cell Rep.* 19:64-68.
- (8) Harini I., Sita G. 1993. "Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*Capsicum annuum* L.)". *Plant Sci.* 89: 107-112.
- (9) Buyukalaca S., Mavituna F. 1996. "Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media". *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 227-235.
- (10) Steinitz B., Küsek M., Tabib Y., Paran I., Zelcer A. 2003. "Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot". *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39:296-303.
- (11) Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M.C., Zapata-Castillo P.Y., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O., Miranda-Ham M.L. 2005. "Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis". *HortScience.* 40(6): 1829-1831.
- (12) Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias Andreu L.G., Montalvo Peniche M.C., López Puc G., Barahona-Pérez F. 2006. "Improvement of *In Vitro* Culturing of *Capsicum chinense* Jacq. by Inhibition of Ethylene Effects". *HortScience.* Vol. 41(2): 405-409.
- (13) López-Puc G., Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P.Y., Montalvo-Peniche M.C., Barahona-Pérez F., Iglesias-Andreu L.G., Santana-Buzzy N. 2006. "Direct Somatic Embryogenesis: A Highly Efficient Protocol for In Vitro Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience.* Vol. 41(7): 1645-1650.
- (14) Zapata-Castillo P.Y., López Puc G., Canto-Flick A., Solís-Ruiz A., Barahona Pérez F., Iglesias Andreu L.G., Santana-Buzzy N. 2007. "Somatic Embryogenesis in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) From Cell Suspensions". *HortScience.* Vol. 42(2): 329-333.
- (15) Montalvo-Peniche M.C., Iglesias-Andreu L.G., Mijangos-Cortés J.O., Nahuat-Dzib S.L., Barahona-Pérez F., Canto-Flick A., Santana-Buzzy N. 2007. "In Vitro Germplasm Conservation of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 42(5):1247-1252.

- ⁽¹⁶⁾ Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L.G., Balam-Uc E., Bello-Bello Jericó J., Lecona-Guzmán C.A., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., Gómez-Uc E., López-Puc G., Santana-Buzzy N. 2008. "Capsaicinoids Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Hottest Known Cultivars". *HortScience*. 43(5): 1344-1349.
- ⁽¹⁷⁾ Santana-Buzzy N., López-Puc G., Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Balam-Uc E., Avilés-Viñas S., Solís-Marroquín D., Lecona-Guzmán C., Bello-Bello J.J., Gómez-Uc E., Mijangos-Cortés J.O. 2009. "Ontogenesis of the Somatic Embryogenesis of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience*. 44(1):113–118.
- ⁽¹⁸⁾ Bello-Bello J.J., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Gómez-Uc E., Robert M.L., Iglesias-Andreu L.G., Santana-Buzzy N. 2010. "Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion". *HortScience* 45(7):1093–1098.
- ⁽¹⁹⁾ Gómez-Uc, E. 2010. Estudio de la expresión génica diferencial durante el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. en presencia de etileno. Tesis de Doctorado.
- ⁽²⁰⁾ Lecona-Guzmán C.A., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., De los Santos-Briones C., Santana-Buzzy N. 2012. "Changes in the protein profile of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) somatic embryos during development". *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(47), pp. 10761-10768.
- ⁽²¹⁾ Regla Márquez C.F. 2011. Estudio de las poliaminas durante el proceso de embriogénesis somática de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Maestría.
- ⁽²²⁾ López-Erosa S. 2012. Efecto de poliaminas exógenas en la embriogénesis somática de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Maestría.
- ⁽²³⁾ Parrott W.A., Dryden G., Vogt S., Hildebrand D.F., Collins G.B., Williams E.G. 1988. "Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean". *In Vitro Cell. Dev Biol* 24:817-820.
- ⁽²⁴⁾ Vinocur Basia, A.A. 2005. "Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations". *Current Opinion in Biotechnology*, 16:123–132.
- ⁽²⁵⁾ Orellana R., Espadas C., Conde C., Gay C. 2010. *Atlas escenarios de cambio climático en la Península de Yucatán*. CICY (ed), pp. 133.
- ⁽²⁶⁾ Larkin P.J., Scowcroft W.R. 1981. "Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement". *Theor. Appl. Genet.* 60: 197–214.
- ⁽²⁷⁾ Evans D.A. 1989. "Somaclonal variation: genetic basis and breeding". *Applications. Genetics* 5: 46-50
- ⁽²⁸⁾ Bajaj Y.P. 1990. "Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation and implications in plant breeding". In: Bajaj Y.P. (ed). *Somaclonal variation in crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin, pp 3-48.
- ⁽²⁹⁾ Karami O., Aghavaisi B., Pour A.M. 2010. "Molecular Aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants". *J. Chem. Biol.* 2, 177 – 190.
- ⁽³⁰⁾ Irikova T., Denev I. 2008. "Identification of two embryogenesis-related genes in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genome". *Biologie Moleculaire*. 61 (6), 761 -770.
- ⁽³¹⁾ Su Y.H., Zhao X.Y., Liu Y.B., Zhang C.L., O'Neill S.D., Zhang X.S. 2009. "Auxin-induced WUS expression is essential for embryogenic stem cell renewal during somatic embryogenesis in Arabidopsis". *The Plant Journal*. 59, 448 – 460.
- ⁽³²⁾ Braybrook S.B., Stone S.L., Park S., Bui A.Q., Le B.H., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J. 2005. "Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis". *PNAS*. 103 (9), 3468 – 3473.



Análisis microscópico de la interacción *Phytophthora capsici*-*Capsicum chinense* Jacq. durante la inducción de resistencia

Capítulo 25

Nallely Dolores Cocom Chan, Felipe Barredo Pool,
Adolfo Alberto Guzmán Antonio, Ramón Armando Souza Perera,
José Juan Zúñiga Aguilar*
*Autor responsable: zuniga@cicy.mx



Resumen

Resultados de nuestro laboratorio sugieren que el oomiceto *Phytophthora capsici* desarrolla la enfermedad letal conocida como "Marchitamiento por *Phytophthora*" a través de la inhibición de la ruta de señalización del etileno, debido a que la activación exógena de esta vía conduce a la generación de resistencia en el chile habanero. En el presente trabajo se estudió el efecto del tratamiento hormonal sobre la capacidad del oomiceto para colonizar las raíces de plántulas de chile habanero cultivadas en hidroponía *in vitro*. Mediante microscopía electrónica de barrido se encontró que el tratamiento sistémico retrasa la migración de zoosporas hacia la epidermis del tejido radical e inhibe la capacidad de *Phytophthora capsici* para penetrar y diseminarse a través de las raíces. Este efecto perduró por más de 30 días, corroborando la hipótesis de que la aspersión de plántulas de chile habanero con etileno les confiere resistencia contra el Marchitamiento por *Phytophthora*.

Palabras clave

Marchitamiento por *Phytophthora*, inducción de resistencia sistémica, reguladores del crecimiento vegetal

Introducción

El etileno (ET) juega un papel fundamental en la activación de la defensa en las plantas frente a diferentes tipos de microorganismos patogénicos, a través de una red compleja de señalización que incluyen principalmente el ácido jasmónico (JA) y el ácido salicílico (SA). Esta red de defensa se desencadena ante el ataque de microorganismos patógenos, heridas causadas por animales herbívoros y daño por insectos.⁽¹⁾

Por lo general es aceptado que el ET opera de manera sinérgica con el JA en la activación de la defensa contra patógenos necrotróficos, mientras que el SA, con el que interactúa de manera antagónica, confiere resistencia contra patógenos biotróficos.⁽²⁾ Sin embargo, tanto el ET como el SA se encuentran implicados en la defensa contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos. De manera adicional a sus conocidos efectos sobre la maduración de los frutos y la triple respuesta, existen reportes de que el ET induce genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PR),⁽³⁾ como las quitinasas y las glucanasas. También, el ET participa en el fortalecimiento de la pared celular, estimula la lignificación y la expresión de genes que codifican proteínas estructurales de la pared.⁽⁴⁾

Del mismo modo el etileno producido después del ataque de patógenos puede ser un estímulo para la respuesta de defensa de una amplia gama de genes; incluyen también las proteínas relacionadas a la patogénesis (PR).⁽⁵⁾

En nuestro laboratorio se ha determinado que el etileno aplicado exógenamente puede conferir resistencia al chile habanero contra la infección por *P. capsici*.⁽⁶⁾ En esos resultados se propone que el tratamiento con compuestos liberadores de etileno induce un tipo de resistencia sistémica adquirida en la planta, por lo que el avance del patógeno es bloqueado aun cuando pudiese penetrar los sistemas de defensa constitutivos basales.

De hecho, si la resistencia inducida por el etileno en plantas de chile habanero enciende una respuesta de tipo sistémica contra el oomiceto *Phytophthora capsici*, el tratamiento con esta hormona debería limitar el avance del patógeno a través de los tejidos en las plantas infectadas. La idea de que la resistencia inducida bloquea el avance del patógeno aun cuando éste haya podido penetrar los sistemas preestablecidos de defensa puede corroborarse mediante el análisis histológico comparativo mediante el uso de la microscopía electrónica de barrido, en los tejidos infectados de plantas tratadas con etileno y de plantas sin tratar. Estos experimentos podrían permitir el determinar el efecto que tiene el etileno en el proceso de infección.

Materiales y métodos

Cultivo *in vitro* de chile habanero en hidroponía

Plántulas germinadas *in vitro*, con dos hojas cotiledonares, se colocaron en medio de cultivo MS líquido⁽⁷⁾ suplementado con nutrientes tiamina (500 mg·L⁻¹), L-cisteína (25 mg·L⁻¹), mio-inositol (100 mg·L⁻¹), sacarosa (30 g·L⁻¹) y gel rite (2.2 g·L⁻¹); el pH se ajustó a 5.6 con KOH 1M. Las plántulas de chile habanero se mantuvieron en un cuarto de cultivo en fotoperiodo (18 h luz

y 6 h oscuridad) a 25 °C, hasta que alcanzaron un mes de edad para posteriormente ser infectadas.

Tratamiento de plántulas de chile habanero con ethrel

Una vez que las plántulas de chile habanero alcanzaron un mes de edad fueron tratadas con 1 mL de ethrel 5 mM. El ethrel, compuesto liberador de etileno, se diluyó con agua y se aplicó directamente sobre la

plántula mediante aspersión. Después de tratar a las plántulas, se taparon los frascos por completo debido a que el ethrel es un compuesto volátil y se esperó un tiempo de 24 horas para que las plántulas fueran inoculadas con el micelio de *P. capsici*. Las plantas testigo (que fueron asperjadas 24 horas previamente con agua) fueron inoculadas con un disco del medio V8. Posteriormente se realizó la colecta del tiempo cero y así sucesivamente se llevó a cabo la colecta hasta que se cumplió los tiempos establecidos en la siguiente sección.

Mantenimiento de la cepa de *Phytophthora capsici*

La cepa de *P. capsici* se inoculó en una plántula de chile habanero cultivada en fotoperiodo *in vitro* (18 h luz y 6 h oscuridad) a 25 °C. Después de tres días de la inoculación se tomó una parte del tejido infectado y se colocó en medio sólido V8 (Jugo V8 16.3% v/v, CaCO₃ 3 g·L⁻¹ y agar 16 g·L⁻¹). El cultivo de *P. capsici* se mantuvo a temperatura am-

biente y se resembró cada mes, hasta su uso. El desarrollo del micelio se observó al segundo día y así consecutivamente hasta que alcanzó la característica de aracnoide. El tiempo de crecimiento del micelio para la inoculación fue de 6 días, debido a que el patógeno estaba en pleno desarrollo, cubriendo totalmente la caja con el micelio.

Inoculación de plántulas de chile habanero

Para la inoculación de la raíz se tomó con una espátula pequeña un disco del micelio de *P. capsici*. El disco de micelio fue adicionado en el medio líquido en el que estaba sumergida la raíz de la plántula. Cada disco tenía un diámetro de 0.5 cm. Se colectaron diferentes tejidos (raíz y tallo) para evaluar la infección en diferentes tiempos (0, 12, 24, 48 y 72 h). Posterior a los tiempos establecidos, se procedió a colectar los diferentes tejidos correspondientes a los tratamientos testigo y los tratamientos con ET, conforme se describe en el Cuadro 1.

Cuadro 1

Esquema experimental del tratamiento con ethrel e inoculación con *Phytophthora capsici* en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Tratamiento		Inóculo		
		(Disco de 0.5 cm diámetro)	Tejido	Tiempo de colecta (h)
Agua	1	Medio V8 semi-sólido	Raíz	0, 12, 24, 48 y 72
	2	Micelio de <i>P. capsici</i>	Tallo	
Ethrel	3	Medio V8 semi-sólido	Raíz	
	4	Micelio de <i>P. capsici</i>	Tallo	

Análisis histológico con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)

Los tejidos inoculados se cortaron en diferentes tiempos (0,12, 24, 48 y 72 h) y se depositaron en una solución fijadora amortiguador de fosfatos a 0.2 M con pH= 7.2

más glutaraldehído 2.5%, el cual detiene toda actividad metabólica que se lleve a cabo en el tejido, este paso es llamado fijación; después, se lavaron los tejidos con el amortiguador de fosfatos tres veces, teniendo un cuarto y quinto lavado pero con otras condiciones, 20 min en vacío y el

resto del tiempo en refrigeración con una temperatura de 4 °C. El siguiente paso fue la deshidratación de la muestra, en la cual éstas se agregaron en soluciones de etanol con concentraciones graduales (30, 50, 70, 85, 96 y 100%), durante una hora en cada solución, 20 minutos a vacío y 40 en refrigeración, esto se realizó dos veces en cada concentración. La finalidad de la deshidratación es sustituir por etanol el agua que se encuentra en el tejido. Las muestras se secaron a punto crítico con CO₂ en un secador Tousimis® modelo Sandri-795, esto para sustituir el etanol por CO₂ líquido el cual finalmente se transforma a CO₂ gaseoso de tal forma que todos los espacios en

el tejido vegetal que contienen etanol se llenan con CO₂ para que el tejido no pierda su estructura original y se deforme durante la observación en el MEB. Por último, las muestras fueron metalizadas con una cubierta de oro de 150 Å de grosor para hacerlas conductoras, se utilizó un metalizador Denton® Vacuum Desk II. Finalmente se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca JEOL®, modelo JSM-6360LV, para observar todos los tejidos de chile habanero inoculados con *P. capsici*, así como sus respectivos controles.

Resultados

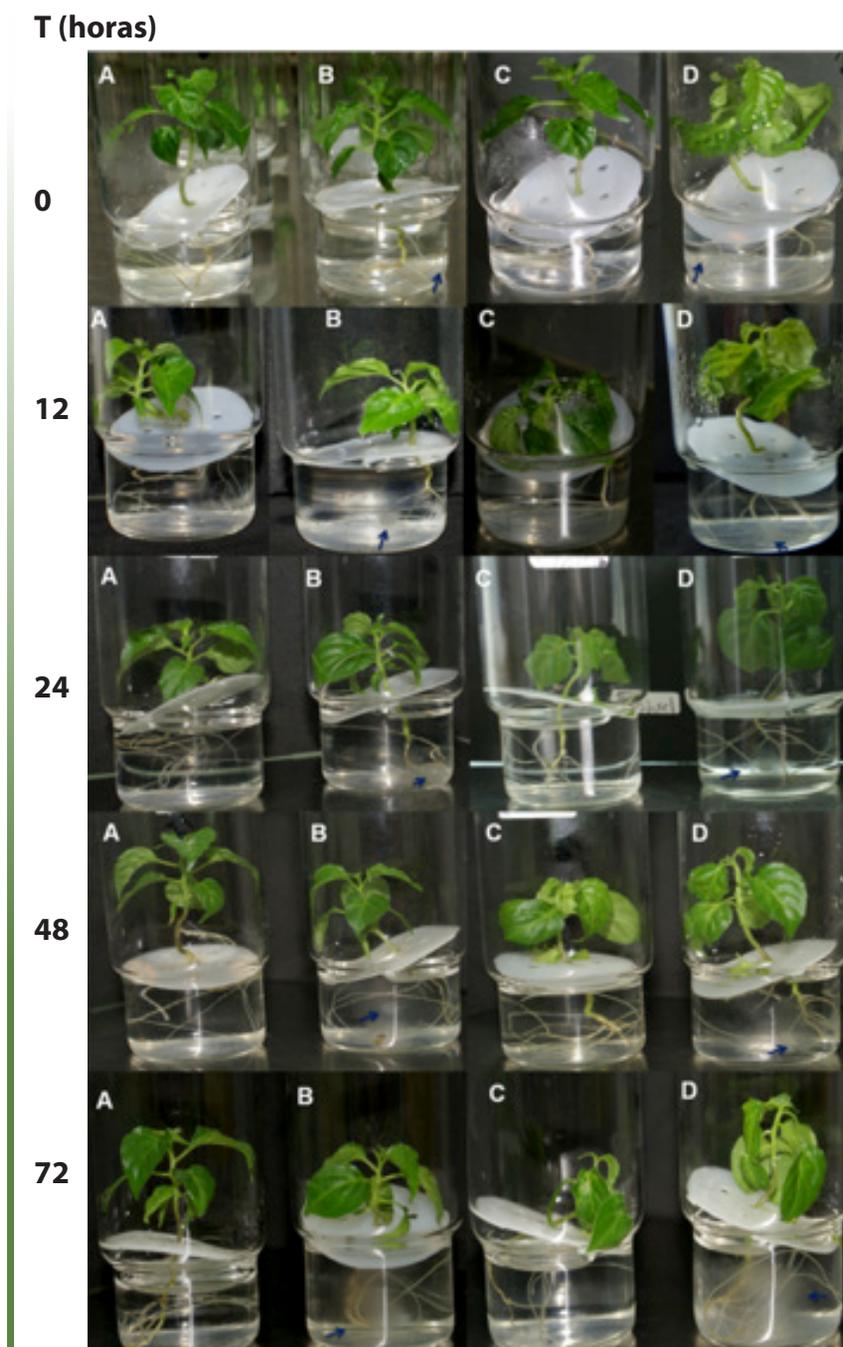
Sintomatología de las plántulas de chile habanero después de la inoculación

Antes de realizar la colecta de los tejidos, se llevó a cabo un análisis de los síntomas de la enfermedad en las plántulas tratadas y en los testigos. En las plántulas testigo inoculadas con el oomiceto se observó un desarrollo continuo del micelio desde prácticamente las 12 h después de la inoculación (ddi) (Figura 1B); el desarrollo se incrementó gradualmente y para las 72 h ddi existía un desarrollo masivo del micelio en el medio de cultivo, mientras que la planta mostraba síntomas de necrosamiento, especialmente en la raíz (Figura 1B). En las plántulas asperjadas con ethrel se observaron síntomas de abscisión (Figuras 1C y 1D), pero aunque sí existió desarrollo de micelio en medio de cultivo, no se observó necrosamiento de la plántula (Figura 1D).

Debido a que las plántulas del tratamiento 4 no presentaron grandes síntomas a las 72 h ddi, se decidió continuar la observación de todos los tratamientos hasta los 9 días ddi, con el objetivo de observar hasta qué momento se mantenía el efecto protector contra el oomiceto por la aspersión de las plántulas con ethrel.

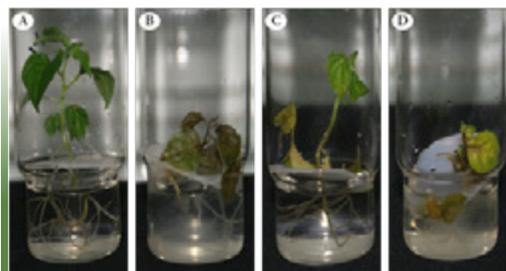
Como puede observarse en la Figura 2, para los 9 días ddi las plántulas del tratamiento 2 ya presentaban muerte por necrosamiento, mientras que las plántulas asperjadas con ethrel mostraban una profunda abscisión (Figuras 2C y 2D), pero no mostraba necrosamiento (Figura 2D). Esto concuerda con lo observado anteriormente, de que la interacción de *C. chinense*-*P. capsici* es de tipo compatible (Figura 2B), pero puede ser revertida por la aspersión con compuestos liberadores de etileno.

Figura 1
Sintomatología del Marchitamiento por *Phytophthora*



Plántulas de chile habanero fueron asperjadas con agua (A y B) o con ethrel (B y D) e inoculadas con agar (A y C) o con micelio del oomiceto (B y D). Los síntomas fueron observados en los intervalos mostrados.

Figura 2
Efecto del etileno sobre el
Marchitamiento por *Phytophthora*



Plántulas de chile habanero de un mes de edad fueron asperjadas con agua (A y B) o con ethrel (C y D), e inoculadas con *Phytophthora capsici* (B y C). Como testigo, las plántulas fueron inoculadas con agar (A y C).

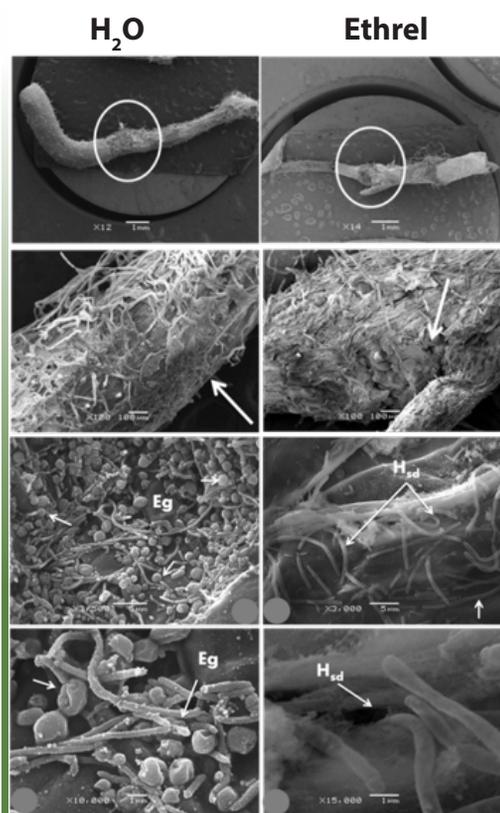
Observación microscópica en el MEB

En las siguientes figuras se muestran las micrografías electrónicas de muestras de raíces y tallos de las diferentes plántulas testigo y las plantas asperjadas con ethrel.

En la Figura 3 se muestran las micrografías del epitelio de la raíz a las 12 h ddi, de las plántulas asperjadas con agua (3A) o con ethrel (3B). Puede observarse que en el epitelio de las plántulas asperjadas con agua se localizan mosaicos de esporas, muchas de ellas germinadas (Figura 3A), mientras que en las plántulas asperjadas con ethrel no existen prácticamente esporas y se encuentran algunos segmentos cortos de micelio (Figura 3B).

En la Figura 4 se muestran los resultados a las 24 h ddi. Puede observarse una mayor cantidad de micelio desarrollándose sobre el epitelio de las plántulas testigo (Figura 4A). Cortes transversales realizados en las raíces mostraron una incipiente penetración del micelio del oomiceto en el epitelio radicular, pero no se observa que se haya difundido a las células corticales.

Figura 3
Micrografías de esporas adheridas al epitelio radicular

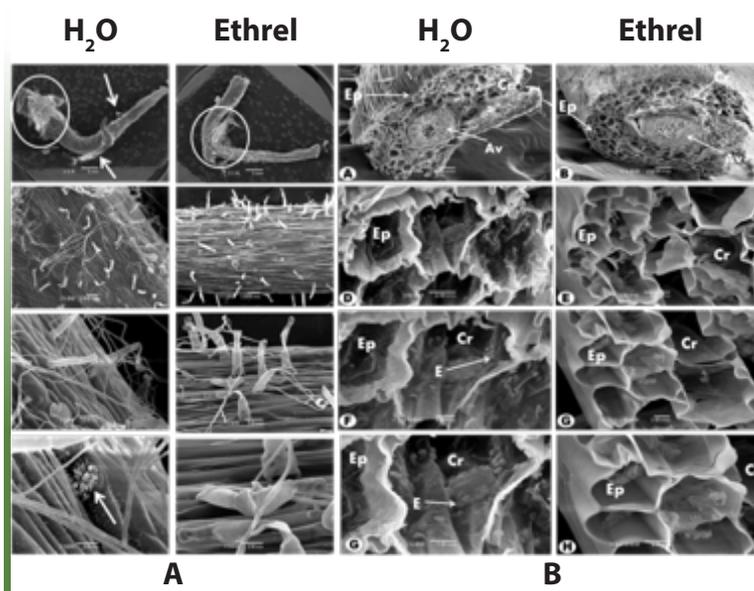


Segmentos de raíz de plántulas asperjadas con agua o con ethrel fueron observadas en el MEB a las 12h ddi.

No obstante, en estos tiempos parece comenzar a afectarse la integridad de los haces vasculares, pues al comparar con los haces de las plántulas asperjadas con ethrel muestran una geometría menos estructurada; sobre todo, las paredes de los haces tienen una apariencia de menor "rigidez". Es importante mencionar que en esta etapa no se observó una obstrucción aparente de los haces vasculares.

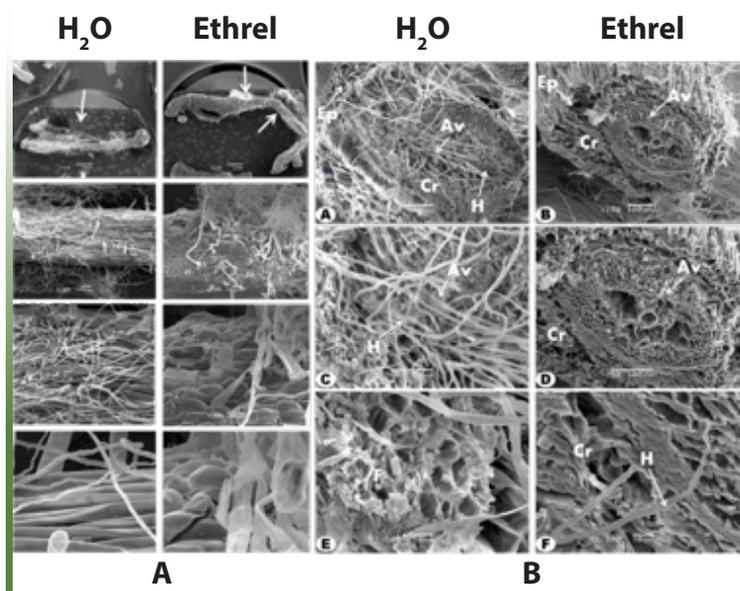
En la Figura 5 se muestran los resultados a las 48 h ddi. En este periodo se observa que el micelio está desarrollándose profusamente sobre el epitelio de las plántulas asperjadas con agua y en menor medida

Figura 4
Micrografías de la dispersión de micelio a las 24 h



Segmentos de raíz de plántulas asperjadas con agua o con ethrel, observados en el MEB a las 24 h ddi. **A:** desarrollo de micelio en la superficie epitelial; **B:** cortes transversales de raíz a diferentes niveles de resolución. **Ep:** epitelio; **Cr:** células corticales; **Av:** haces vasculares.

Figura 5
Micrografías de la dispersión de micelio a las 48 h



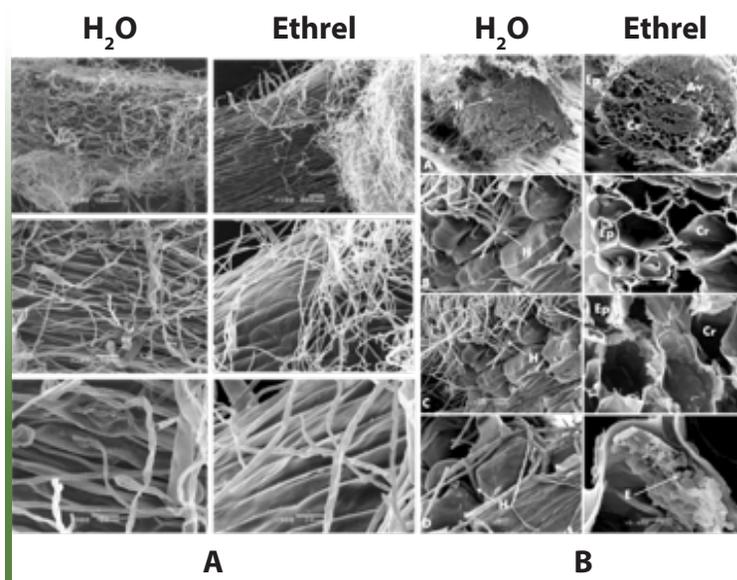
Segmentos de raíz de plántulas asperjadas con agua o con ethrel, observados en el MEB a las 48 h ddi. **A:** desarrollo de micelio en la superficie epitelial; **B:** cortes transversales de raíz a diferentes niveles de resolución. **Ep:** epitelio; **Cr:** células corticales; **Av:** haces vasculares; **H:** hifas.

en las plántulas asperjadas con ethrel (Figura 5A). En el panel 5B se muestran cortes transversales de raíz, en donde pueden verse claramente diferencias significativas por el tratamiento hormonal.

En los cortes de raíz de las plántulas testigo se observa que el micelio del patógeno ha invadido totalmente el epitelio y se ha dispersado abundantemente a través de los haces vasculares, los cuales ya se encuentran extensivamente dañados. En contraste, en las raíces de las plántulas tratadas con ethrel existe una alta proliferación de micelio en el exterior, que ha comenzado a invadir ligeramente el epitelio. No obstante, los haces vasculares se encuentran prácticamente libres de micelio y conservan su integridad aparente.

Finalmente, en la Figura 6 se muestran los resultados a las 72 h ddi. En el panel A puede observarse que el epitelio radicular de las plántulas testigo está totalmente cubierto con el micelio del oomiceto e inclusive se encuentran hifas emergiendo del mismo en múltiples regiones, pero en las plántulas asperjadas con ethrel se aprecia desarrollo superficial sin aparentemente haber penetrado el epitelio. Las micrografías electrónicas de los cortes transversales de las raíces muestran que para esta etapa el micelio del oomiceto ya ha obstruido totalmente la luz de los haces vasculares, mientras que en las plántulas tratadas con ethrel solo se observa desarrollo en el epitelio, encontrándose los haces vasculares prácticamente libres de micelio.

Figura 6
Micrografías de la dispersión de micelio a las 72 h



Segmentos de raíz de plántulas asperjadas con agua o con ethrel, observados en el MEB a las 72 h ddi. **A:** desarrollo de micelio en la superficie epitelial; **B:** cortes transversales de raíz a diferentes niveles de resolución. **Ep:** epitelio; **Cr:** células corticales; **Av:** haces vasculares, **H:** hifas.

Discusión

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la aspersión con etileno (en forma de etefón) confería resistencia al chile habanero contra la enfermedad letal causada por el oomiceto *Phytophthora capsici*.⁽⁶⁾ En ese estudio, la inoculación del patógeno se realizó mediante la colocación de un disco de micelio del oomiceto sobre dos de las hojas verdaderas de plántulas de un mes de edad. Lo que se observó es que el micelio es incapaz de diseminarse por los tejidos de las hojas asperjadas, proponiendo que el tratamiento conducía al establecimiento de un tipo de resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés).⁽⁶⁾

La propuesta anterior implica que si la aspersión con etileno establece un tipo de ISR, entonces toda la planta debería quedar inmunizada contra el ataque del patógeno, aun en sitios distantes del lugar de aplicación, inclusive la raíz.

Para probar esta teoría, en el presente trabajo nos propusimos asperjar los tejidos aéreos de plántulas de chile habanero cultivadas *in vitro*, para posteriormente inocularlas con el patógeno y comparar en el nivel microscópico el avance del mismo, con relación al avance en plántulas testigo.

Los resultados del presente trabajo muestran que, de manera espectacular, la aspersión con etileno sobre el tejido aéreo afectó de manera significativa el desarrollo de *P. capsici* en las raíces de las plántulas testigo. En tiempos tempranos, se detectó que el tratamiento provocó una disminución de la cantidad de esporas adheridas a la superficie de la raíz. Pudo apreciarse también en esta etapa que algunas de las esporas ya habían germinado, emergiendo pequeñas hifas. En relación con este mecanismo de infección, se ha propuesto indicar que una

vez que las esporas alcanzan la superficie del tejido del hospedante, se adhieren mediante moléculas de adhesión⁽⁸⁾ (Meng *et al.*, 2009). Entonces, un tubo germinativo emerge y de él se desarrolla una hifa o un apresorio, que también se adhieren mediante moléculas de adhesión.

Comparando los datos de la literatura con las evidencias experimentales, se puede decir que en nuestro sistema la infección ya se ha iniciado por lo menos hacia las 12 horas después de la inoculación. Esto se pudo constatar porque para las 24 h las hifas del patógeno ya se encontraban cubriendo la coronilla de la raíz. Se ha mencionado que, una vez que el patógeno desarrolla hifas, el patógeno secreta efectores citoplasmáticos y apoplásticos con la finalidad de penetrar en el tejido⁽⁹⁾ (Kamoun, 2006). Las micrografías de este trabajo tomadas a las 24 h mostraron esporas en aperturas naturales (lenticelas) del tejido y observaciones en cortes transversales de la raíz se observó que las esporas del patógeno ya se encontraban adheridas a las células epidérmicas, así como a las células corticales. La evaluación de la infección a las 48 y las 72 horas indican que el patógeno ha desarrollado una mayor agresividad, ya que la superficie de la raíz se encontraba totalmente cubierta por las hifas de *P. capsici* y el tejido se encontró colapsado totalmente y con señales de necrosamiento.

En relación con los efectos producidos por el tratamiento con etileno, que detiene el progreso de la enfermedad, los resultados mostraron que se evitó la migración de las esporas hacia la epidermis de la raíz, se detuvo el avance del patógeno a través de los vasos conductores (xilema y floema) y como consecuencia de ello se mantuvo la integridad de los tejidos de la raíz y del

tallo. Núñez-Pastrana *et al.* (2011)⁽⁶⁾ proponen que como resultado de la resistencia sistémica inducida por el etileno, el avance del patógeno debería ser bloqueado, aun cuando éste pudiese penetrar los sistemas de defensa constitutivos basales. Nuestros resultados corroboran esta hipótesis, ya que en los tejidos de las plántulas tratadas prácticamente se eliminaron los síntomas,

aunque ocasionalmente sí se encontraron esporas e hifas en los tejidos más externos de las raíces.

Estos resultados contribuyen a entender el mecanismo mediante el cual la fitohormona etileno induce una respuesta sistémica de defensa en el chile habanero en contra del oomiceto *Phytophthora capsici*.

Conclusiones

Como conclusión, puede mencionarse que el tratamiento con etileno, que conduce a la resistencia contra *P. capsici* en el chile habanero, reduce la capacidad de las esporas del patógeno para migrar hacia la epidermis del hospedante y limita su capacidad para dispersarse a través de sus los tejidos.

En la literatura se ha propuesto que el éxito de los oomicetos para infectar mortalmente a sus hospedantes se basa en su capacidad para bloquear o manipular los

sistemas de defensa, a través de los efectores que secreta al citoplasma o al espacio apoplásmico. Debido a que el etileno evita la infección, es posible que esta hormona active la ruta de defensa que el oomiceto bloquea bajo condiciones normales.

Los resultados obtenidos no permiten determinar cuáles son los mecanismos de protección, pero eso es un tema que ahora puede ser abordado con otras perspectivas, derivadas del aporte del presente trabajo.

Agradecimientos

El proyecto P48831 fue financiado por el Conacyt.

Referencias bibliográficas

- (1) Bari R., Jonatan D. and Jones D.G. 2009. "Role of plant hormones in plant defence responses". *Plant Mol Biol* 69:473-488. DOI:10.1007/s11103-008-9435-0.
- (2) Van Loon L.C., Geraats B.P.J. and Linthorst H.J.M. 2006. "Ethylene as a modulator of disease resistance in plants". *Trends Plant Sci* 11:184-191. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.02.005.
- (3) Edreva A. 2005. "Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years". *Gen Appl Plant Physiol* 31:105-124.

- (4) Adie B., Chico J.M., Rubio-Somoza I. and Solano R. 2007. "Modulation of Plant Defenses by Ethylene". *J Plant Growth Reg* 26:160-177. DOI: 10.1007/s00344-007-0012-6.
- (5) Chen N., Goodwin P.H. and Hsiang T. 2003. "The role of ethylene during the infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum*". *J Exp Bot* 54:2449-2456. DOI: 10.1093/jxb/erg289.
- (6) Núñez-Pastrana R., Arcos-Ortega G.F., Souza-Perera R.A., Sánchez-Borges C.A., Nakazawa-Ueji Y.E., García-Villalobos F.J., Guzmán-Antonio A.A., Zúñiga-Aguilar J.J. 2011. "Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper". *Eur J Plant Pathol* 131:669-683. DOI:10.1007/s10658-011-9841-z.
- (7) Murashige T. and Skoog F. 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiol Plant* 15:473-497. DOI: 10.1111 / j.1399-3054.1962.tb08052.x
- (8) Meng S., Torto-Alalibo T., Chibucos M.C., Brett M.T. and Dean R.A. 2009. "Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with gene ontology terms". *BMC Microbiology* 9(Suppl 1):S7. DOI:10.1186/1471-2180-9-S1-S7.
- (9) Kamoun S. 2006. "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes". *Annu Rev Phytopathol* 44:41-60. DOI:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436.



Aislamiento de genes de chile habanero de interés agroindustrial

Capítulo 26

Yumi Elena Nakazawa Ueji, María Goretty Caamal Chan, Ramón Armando Souza Perera y José Juan Zúñiga Aguilar*

*Autor responsable: zuniga@cicy.mx



Resumen

El mejoramiento genético es una herramienta muy útil que permite obtener plantas resistentes a enfermedades o a otros tipos de estrés que afectan negativamente la productividad de cultivos de importancia agronómica. El primer paso para la obtención de plantas tolerantes es la identificación y clonación de genes de interés. Existen diversas estrategias para la clonación de genes. Una de las estrategias es la clonación directa, en la cual los genes se aíslan mediante el uso de cebadores específicos. La otra estrategia es la clonación inespecífica, mediante la cual se clonan grupos de genes cuyos transcritos se encuentran representados diferencialmente en la población de ARN mensajeros, debido a condiciones ambientales o del desarrollo específicas de las células o tejidos en estudio. Las dos estrategias experimentales más utilizadas para la identificación y el aislamiento de genes de interés han sido la síntesis y escrutinio de la biblioteca de ADN complementario y la técnica conocida como el despliegue diferencial de ARNs. En nuestro laboratorio hemos aplicado ambas estrategias para generar bibliotecas de ADN complementario, en las cuales se encuentran representados genes que codifican proteínas estructurales, de señalización, de respuesta a estrés biótico y abiótico, de proteínas clave en las rutas de biosíntesis de hormonas, del metabolismo constitutivo y de la replicación del ADN, entre otros. Estas colecciones de genes constituyen una poderosa herramienta para la obtención de plantas mejoradas genéticamente.

Palabras clave

RT-PCR, ADNc, mejoramiento genético, clonación de genes, expresión génica

Introducción

El chile habanero es afectado por diversos factores que incluyen cambios en el ambiente en el que se desarrollan y la interacción con otros organismos. Las estrategias de manejo utilizadas actualmente involucran la aplicación de productos químicos que a largo plazo disminuyen su eficiencia debido a que en la mayoría de los casos

los patógenos adquieren resistencia a ellos,⁽¹⁾ por lo que actualmente la biotecnología como una herramienta para la obtención de plantas mejoradas genéticamente es indispensable.⁽²⁾ Uno de los requisitos para el mejoramiento genético es contar con genes que confieran a la planta resistencia a las condiciones ambientales, incluyendo estrés abiótico y biótico.⁽³⁾ Los genes de interés pueden ser obtenidos de diferentes maneras. El principal interés de nuestro grupo de trabajo es estudiar la interacción entre el chile habanero y el oomiceto *Phytophthora capsici*, el cual es un patógeno que afecta mortalmente al chile habanero de manera irremediable.⁽⁴⁾

Para poder entender esta interacción, en nuestro laboratorio hemos establecido diferentes modelos que permitan controlar el efecto de las condiciones ambientales. Inicialmente se utilizaron cultivos de suspensiones celulares,⁽⁵⁾ pero también hemos utilizado plántulas cultivadas *in vitro*.^(6,7) El objetivo es reducir la posibilidad de que elementos bióticos o abióticos del medio ambiente puedan activar los mecanismos de defensa, interfiriendo con la interpretación de los resultados específicos de nuestros modelos.

A partir de las suspensiones celulares hemos obtenido bibliotecas de ADNc,⁽⁵⁾ las cuales están compuestas por marcos de lectura completos de genes involucrados en diferentes procesos celulares. Algunos de los genes clonados por esta metodología incluyen genes de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR10), metalotioneínas, ω -6-desaturasas, esterasas, proteínas de pared celular, el regulador transcripcional NPR1, el factor transcripcional WRKY, la proteína de señalización MAPK y proteínas involucradas en el estrés oxidativo, entre otros.

Adicionalmente, hemos utilizado la técnica del despliegue diferencial de ARNs para la identificación de genes involucrados en la respuesta del chile habanero al oomiceto *Phytophthora capsici*.⁽⁶⁾ Mediante esta técnica es posible determinar e identificar genes que se modifican diferencialmente bajo condiciones de estrés, comparando las poblaciones de transcritos de órganos o tejidos testigo con las de tejidos sometidos a estrés.⁽⁷⁾ Esta técnica ha permitido la identificación de genes que se modifican como respuesta a la infección por *P. capsici*; sin embargo, tiene una desventaja, únicamente se obtienen fragmentos de aproximadamente 300 pb, por lo que es necesario realizar ensayos adicionales si se pretende clonar los ADN complementarios completos para realizar el mejoramiento genético. Algunos de los ADN transcritos identificados mediante esta metodología corresponden a proteínas de defensa y de diversos procesos celulares, lo que permitió entender mejor los cambios que se presentan en diferentes niveles de la respuesta de la planta a este patógeno.⁽⁶⁾

Los genes clonados en este trabajo han servido como base para diversos estudios sobre la interacción entre el chile habanero y sus patógenos, y para establecer los protocolos de transformación del chile habanero que posteriormente permitirán realizar el mejoramiento genético de este cultivo.⁽⁸⁾

Resultados

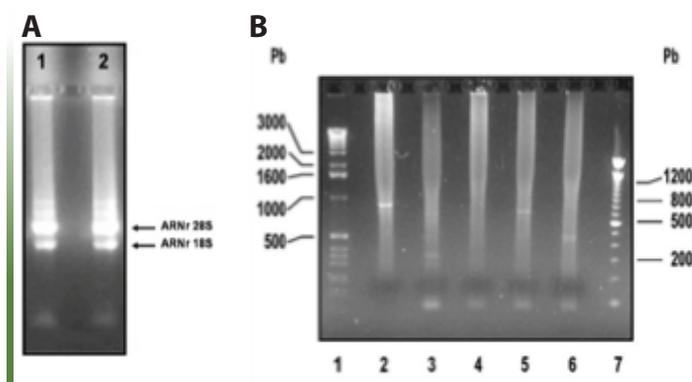
Construcción y análisis de bibliotecas de ADN complementario

El mejoramiento genético de cultivos vegetales requiere la clonación de marcos de lectura completos de los genes de interés, el establecimiento de los métodos para la transformación de plantas y de manera muy importante la regeneración de plantas completas a partir del tejido transformado. Es por esto que nuestro objetivo inicial fue la clonación de marcos de lectura completos de chile habanero, posteriormente se determinó su modificación al adicionar homogeneizados de *P. capsici* y al infectar plántulas de chile habanero con micelio de *P. capsici*. Los marcos de lectura fueron obtenidos mediante la síntesis de una biblioteca de ADNc de suspensiones celulares de chile habanero (Smart cDNA library synthesis kit Clontech®). El primer paso para la síntesis de la biblioteca fue la obtención de ARN total de excelente calidad (Figura 1A).

Una vez que se obtuvo el ARN se sintetizó el ADNc, se amplificó mediante PCR (Figura 1B), y se fraccionó mediante columnas de exclusión molecular (Figura 2).

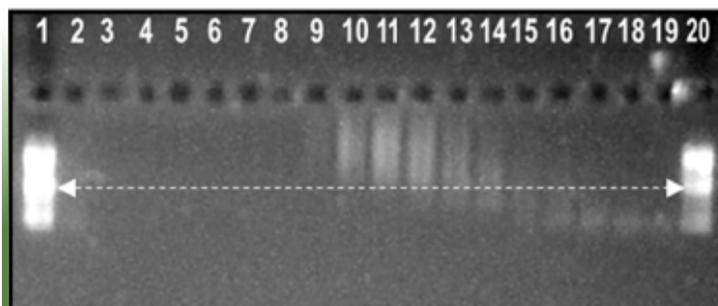
El siguiente paso es la titulación de la biblioteca, que consistió en poner en contacto los fagos que contienen el ADN con las bacterias de *E. coli* LE392, se siembran y se cuentan las unidades formadoras de placa en tres diluciones. La biblioteca tuvo un título de 1.4×10^6 ufp, indicando que la biblioteca sintetizada fue de muy buena calidad. Posteriormente se caracterizó la biblioteca de ADNc, mediante la amplificación por PCR de los fragmentos contenidos y mediante el uso de enzimas de restricción. La amplificación de los fragmentos fue el método más preciso para determinar el tamaño, porque en algunos casos los fragmentos tenían sitios de corte internos y generaban más de una banda (Figura 3).

Figura 1
Obtención de ARN total
y síntesis del ADNc



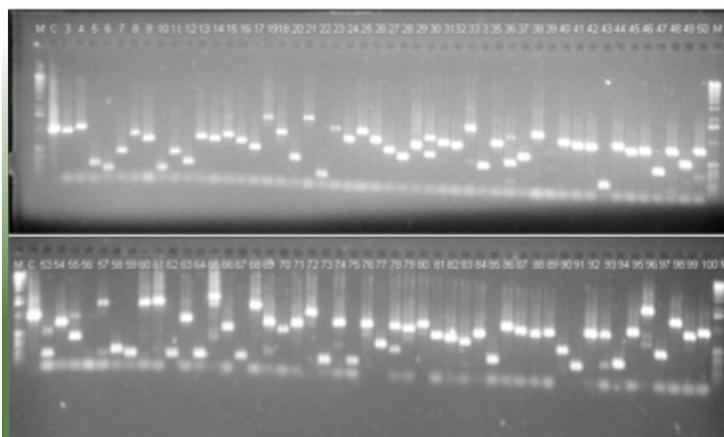
Dos microgramos de ARN total extraído de suspensiones celulares de chile habanero fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 1.1% y teñidos con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Los carriles 1 y 2 contienen muestras independientes.

Figura 2
**Fraccionamiento del ADNc
 mediante columnas de exclusión molecular**



Se colocó el ADNc amplificado en una columna y se colectaron las fracciones en diferentes tubos, posteriormente se realizó una electroforesis para elegir las fracciones de mayor tamaño.

Figura 3
Determinación del tamaño promedio de los insertos



Alícuotas de los productos de PCR obtenidos con cebadores universales M13 fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 1.1% y teñidos con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Cada número de carril representa la amplificación de clonas independientes "picadas" al azar. **Pb**, se indica el tamaño de tres bandas de la escalera de ADN de 1 kB (Invitrogen®).

Finalmente, para determinar la presencia de marcos de lectura completos, se eligieron al azar clonas con insertos de más de 900 pb y se enviaron a secuenciar. Las secuencias fueron comparadas con secuencias reportadas en el Genbank y posteriormente registradas en la EMBL.

Las secuencias deducidas de aminoácidos obtenidas fueron comparadas con las bases

de datos del Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/>).⁽⁹⁾

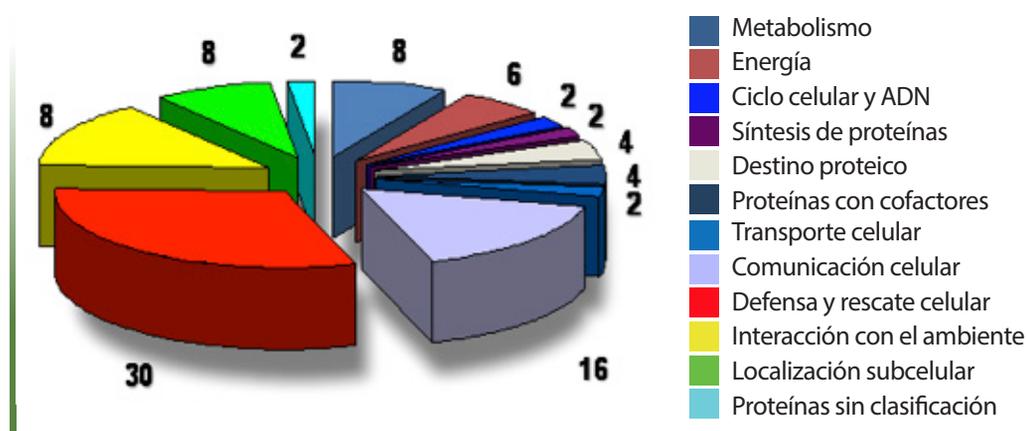
En este Centro se encuentran anotadas bases de datos genómicos de diferentes especies vegetales, incluyendo *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Brachypodium distachyon*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* y *Solanum lycopersicum*.

En la Figura 4 se muestra una gráfica con la representación de cada categoría funcional después de su análisis en el MIPS:

Los genes de MAPK, actina, WRKY y NPR1 fueron clonados mediante RT-PCR. Se realizó la comparación de las secuencias reportadas para sintetizar los cebadores de generados o específicos que se utilizaron para amplificar los genes. A partir de ARN

de chile habanero se realizó la amplificación de los genes, se verificó el tamaño, se ligó en el vector de clonación, se transformaron bacterias de *E. coli* DH5α y se aislaron las clonas que poseen el inserto del tamaño deseado. De cada uno se enviaron a secuenciar tres clonas y se analizó la secuencia para identificar el inserto.

Figura 4
Análisis funcional de las clonas de ADNc



Las clonas representativas fueron clasificadas funcionalmente con base en el alineamiento de sus secuencias deducidas de aminoácidos en la base de datos del Munich Information Centre for Protein Sequences (MIPS).⁽⁹⁾

Identificación de genes expresados diferencialmente, mediante RT-PCR

En nuestro laboratorio hemos aplicado la técnica del despliegue diferencial de ARNs para identificar genes que se expresan diferencialmente durante la interacción planta-patógeno. Los modelos experimentales en los que hemos trabajado son la elicitación *in vitro* de callos de *Cocos nucifera* con quitosán⁽¹⁰⁾ y la interacción *Capsicum chinense-Phytophthora capsici*.^(6,7)

Para el estudio, se realizaron 22 combinaciones de cebadores de anclaje y universales, con los cuales se pudo detectar un total de 36 bandas diferenciales. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de estos resultados.

En el modelo del chile habanero, algunos de los genes identificados y analizados ya fueron descritos en un capítulo anterior. En esta parte se detallará la identidad de sus respectivas secuencias deducidas de aminoácidos.

El Cuadro 6 muestra un resumen de algunas características de los transcritos expresados diferencialmente que se pudieron clonar, incluyendo su clave, su tamaño, su identidad y el efecto de la infección sobre sus niveles de expresión. Como se puede observar, las secuencias tienen identidad con proteínas que participan en transporte y la asimilación de nitrógeno, así como en el tráfico vesicular y la regulación de la transcripción.

Al revisar la identidad de las secuencias, se pudo entender por qué para algunas de ellas solamente hubo cambios en la expresión, pues las proteínas correspondientes participan en procesos metabólicos que

están activos en condiciones normales. Ésta podría ser la razón por la que se observó un nivel basal en las plantas no inoculadas al realizar el análisis del Northern blot reverso.

Cuadro 1
Identidad de clonas del banco de ADNc de chile habanero

Clave EMBL	Identidad	Categoría funcional
AJ879118	Poli-ubiquitina	14
AJ879069	Ω -6 ácido graso desaturasa	01, 32
AJ879065	Transportador ABC	20
AJ879071	Ω -6 desaturasa	01, 32
AJ879119	Esterasa	32
AJ879062	Proteína de pared celular-1	70, 32
AJ608158	MAPK-1	30, 36
AJ879068	Proteína ribosomal L37a	12
-----	Proteína inducida por TMV	32
AJ879115	PR10	32
-----	Inhibidor de proteinasas	18
AJ878871	Proteína relacionada con la patogénesis	32
-----	Proteína relacionada con la patogénesis	32
-----	Proteína relacionada con la patogénesis	32
-----	Proteína relacionada con la patogénesis	32
AM040275	Proteína hipotética -1	99
AJ608159	MAPK-2	30, 36
AJ879117	ACC oxidasa	01, 36
AJ879116	Metalotioneína-1	32
AJ879936	Proteína putativa asociada a receptor	30
AJ879121	Glutatión S-transferasa	32
-----	Tipo ATPasa	02, 20
AM040277	Factor de replicación A	10
-----	Ornitina descarboxilasa	01
AJ973135	Glutatión peroxidasa	32
AM040276	Oxidasa asociada a FAD	16, 36
AM040272	Proteína de pared celular-3	70
AJ879070	Enzima conjugada a ubiquitina	14

Continuación...

Clave EMBL	Identidad	Categoría funcional
AM040273	Proteína de respuesta a etileno	30, 36
AM040269	Alcohol deshidrogenasa	02
AM040274	Proteína putativa de dedo de zinc	16
AM040278	Proteína inducida por auxinas	30, 36
AJ879120	Proteína inducida por ácido araquidónico	30
AJ879063	Metalotioneína-2	32
AJ879064	V-ATPasa	02, 20
AJ879072	Proteína tipo extensina	70, 32
AJ879066	Peroxidasa aniónica	32
AJ879067	GST/peroxidasa	32
AM040266	Proteína 14-3-3	30
AM040268	malato deshidrogenasa citosólica	02
AM040271	Glutación S-transferasa-12	32
AM040267	Proteína inducida por fosfatos (phi-1)	32
AM168448	Actina	70
AJ608160	MAPK-3	30, 36
AM900560	Factor transcripcional tipo WRKY 1	11
AM900559	NPR1	30

Se muestra la categoría funcional de las clonas seleccionadas al azar, de acuerdo con MIPS.

Cuadro 2

Número de bandas identificadas como diferenciales por cada combinación de cebadores

Cebadores	Bandas diferenciales	Oligonucleotidos	Bandas diferenciales
P1:T1	---	P4:T1	4
P1:T2	3	P4:T5	---
P1:T4	5	P4:T6	---
P2:T1	1	P4:T7	6
P2:T2	---	P4:T8	3
P2:T3	1	P6:T1	2
P2:T4	---	P6:T5	---
P2:T5	---	P8:T1	---
P3:T1	---	P8:T6	3
P3:T5	3	P8:T7	3
P3:T6	---	P9:T1	2

Cuadro 3
Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos
de la clona CCD-4 de chile habanero

	1				50
<i>Capsicum chinense</i>	DCTEEFDAIH	SDKAKKLED	FRIGELITG	YTSDSPNS	VHGSSISF
<i>Solanum tuberosum</i>	DCTEEFDAIH	SDKAKKLED	FRIGELITG	YTSDSPNTS	VHGSSISF
<i>Solanum lycopersicum</i>	DCTEEFDAIH	SDKAKKLED	FRIGELITG	YTSDSPNS	VHGSSISF
<i>Petunia hybrida</i>	DCTEEFDAIH	SDKAKKLED	FRIGELITG	YTSDSPNS	VHGSSFSGF
	51				100
<i>Capsicum chinense</i>	LAPIKELVQT	PTRSVALIPR	EKIPCKLVDK	QSISPDVRRF	RFALPSEDQV
<i>Solanum tuberosum</i>	LAPIKELVQT	PTRSVALIPR	EKIPCKLVDK	QSISHDVRKF	KFALPSEDQV
<i>Solanum lycopersicum</i>	LAPIKELVQT	PTRSVALIPR	EKIPCKLVDK	QSISHDVRKF	KFALPSEDQV
<i>Petunia hybrida</i>	LAPIKELAPA	-VRSVALIPR	EKIPCKLVDK	KSISHDVRKF	RFALPSEDQV
	101				125
<i>Capsicum chinense</i>	LGLPVGKHIF	LCATIDDKLC	MRAYT		
<i>Solanum tuberosum</i>	LGLPVGKHIF	LCATVDDKLC	MRAYT		
<i>Solanum lycopersicum</i>	LGLPVGKHIF	LCATVDDKLC	MRAYT		
<i>Petunia hybrida</i>	LGLPVGKHIF	LCAIIDDKLC	MRAYT		

Esta clona tiene mayor nivel de identidad con la secuencia peptídica de la nitrato reductasa de *Solanum tuberosum* y *Nicotiana benthamiana*, respectivamente.

Cuadro 4
Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos
de la clona CCF-6 de chile habanero

	1				50
<i>Capsicum chinense</i>	GSVLTSNGIV	EMGACIMDGI	TKNCGAVSGL	TTVVNAISLA	RLVMEKTPHI
<i>Vitis vinifera</i>	GSVLTTDGTV	EMEACIMDGN	TKKCGAVSGL	TTVVNPISLA	RLVMEKTPHI
<i>Ricinus communis</i>	GSVLTEGTV	EMEACIMDGK	TKKCGAVSGL	TTVVNAISLA	RLVMEKTPHI
<i>Populus trichocarpa</i>	GSVLTSRGTV	EMEACIMDGN	SKKCGAVSGL	TTVVNAISLA	RLVMDNTPHI
	51				100
<i>Capsicum chinense</i>	YLAFEGAEAF	AREQGVETID	SSHFTPRNI	ERLKQAKEAN	KVQVDYNTRP
<i>Vitis vinifera</i>	YLAFDGAFAF	AREQGVETVD	ASHFITPENI	ERLKQAKEAN	RVQIDY.TQP
<i>Ricinus communis</i>	YLAFDGAFAF	AREQGVETVD	SSQFVTPENV	ERLKQAKEAN	RVQIDY.TQP
<i>Populus trichocarpa</i>	YLGFDGAFAF	AREQGVETVD	SSHFITPENI	ERLKQAKEAD	RVQMDY.TQP
	101				
<i>Capsicum chinense</i>	IPKGDK				
<i>Vitis vinifera</i>	ITKDTK				
<i>Ricinus communis</i>	IQKNEE				
<i>Populus trichocarpa</i>	IQKDEK				

Esta clona tiene mayor nivel de identidad con la secuencia peptídica de la asparaginasa de *Vitis vinifera*, *Ricinus communis* y *Populus trichocarpa*, respectivamente.

Cuadro 5
Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CCG-7 de chile habanero

	1				50
<i>Capsicum chinense</i>	IVEYQDFVVR	NYTPPPSINN	SIKMEVGIED	CLHIEFEYNK	SKYHLKDVII
<i>Solanum tuberosum</i>	IVEYQDFVVR	NYSPPPSINN	SIKMEVGIED	CLHIEFEYNK	SKYHLKDVII
<i>Vitis vinifera</i>	IVEYQDFVVR	NYTPPPEINT	SIKMEVGIED	CLHIEFEYNK	SKYHLKDVII
<i>Ricinus communis</i>	IIEYQDFVVR	NYSPPPVNN	SIKMEVGIED	CLHIEFEYNK	SKYHLKDVII
	51				100
<i>Capsicum chinense</i>	GKIYFLLVRI	KIKNMDLEIR	RRESTGSGAN	THVETETLAK	FELMDGAPVR
<i>Solanum tuberosum</i>	GKIYFLLVRI	KIKNMDLEIR	RRESTGSGEN	THVETETLAK	FELMDGAPVR
<i>Vitis vinifera</i>	GKIYFLLVRI	KIKNMDLEIR	RRESTGSGAN	THVETETLAK	FELMDGAPVR
<i>Ricinus communis</i>	GKIYFLLVRI	KIKNMDLEIR	RRESTGAGAN	THVETETLAK	FELMDGAP
	101				150
<i>Capsicum chinense</i>	GESIPIRLFL	SPYELTPTYR	NINNKFSVKY	YLNLVLVDEE	DRRYFKQQEI
<i>Solanum tuberosum</i>	GESIPIRLFL	SPYELTPTYR	NINNKFSVKY	YLNLVLVDEE	DRRYFKQQEI
<i>Vitis vinifera</i>	GESIPIRLFL	SPYELTPTHR	NINNKFSVKY	YLNLVLVDEE	DRRYFKQQEI
<i>Ricinus communis</i>	GESIPIRLFL	SPYELTPTHR	NINNKFSVKY	YLNLVLVDEE	DRRYFKQQEI
	151				
<i>Capsicum chinense</i>	TMFRLAETS				
<i>Solanum tuberosum</i>	TMFRLEETS				
<i>Vitis vinifera</i>	TVYRLPETS				
<i>Ricinus communis</i>	TIYRLQENS				

Esta clona tiene mayor nivel de identidad con la secuencia peptídica de la proteína de sorteo vacuolar 26 (VPS26) de *Solanum tuberosum*, *Vitis vinifera* y *Ricinus communis*.

Cuadro 6
Análisis de identidad y expresión diferencial de transcritos aislados por despliegue diferencial de *C. chinense* infectado con *P. capsici*

Clona	Tamaño	Identidad	Expresión
CC-A	390	No reportada	↑
CC-B	510	No reportada	↓
CC-C	490	No reportada	↓
CC-D	490	Nitrato reductasa	↑
CC-E	460	Proteína unión a ADN	↑
CC-F	480	L-Asparaginasa	↑
CC-G	380	Prot. sorteo vacuolar	↑
CC-H	500	Proteína putativa	↑
CC-I	350	No reportada	↑
CC-J	350	No reportada	↑

Discusión

El trabajo realizado hasta el momento ha generado información muy valiosa que proporciona las herramientas para futuros trabajos. Existen diferentes técnicas que permiten la clonación de genes completos; sin embargo, antes de determinar la metodología es necesario tomar en cuenta las características de cada una y los objetivos del trabajo.

Las bibliotecas de ADNc son útiles porque permiten la clonación de genes expresados durante las condiciones específicas de estudio. Una biblioteca de alta calidad, como la sintetizada en este trabajo, proporciona un amplio número de marcos de lectura completos que pueden ser estudiados individualmente. Además, el hecho de que los genes clonados estén completos permite introducirlos en un vector de expresión para posteriormente transformar plantas y conocer mejor su función. También permite la síntesis de anticuerpos específicos, su expresión en sistemas heterólogos para purificar la proteína y estudiar sus propiedades, o para determinar su interacción con otras proteínas. Por otro lado, el análisis bioinformático de los marcos de lectura completos permite determinar la presencia de dominios, de señales de traslocación, en algunos casos la localización de la proteína, etcétera.

La clonación de genes mediante RT-PCR es muy útil cuando se pretende estudiar una proteína o un gen en particular, y aunque en nuestro caso no requerimos las secuencias completas, también es posible clonar marcos de lectura completos. La diferencia es que es necesario realizar la búsqueda de

secuencias del gen de interés en especies relacionadas, diseñar cebadores y realizar la amplificación del transcrito específico en tejidos de plantas expuestas a las condiciones adecuadas que aseguren la presencia del gen de interés. Es necesario también establecer las condiciones para cada combinación de cebadores utilizada. Una vez obtenido un fragmento del gen, se requiere diseñar cebadores específicos de la secuencia obtenida, que permitan la clonación de los extremos mediante RACE 3' y 5'.

Ambas técnicas permiten la clonación de marcos de lectura completos, indispensables para la obtención de organismos genéticamente modificados mediante herramientas biotecnológicas.

En chile habanero se cuenta con una biblioteca de ADNc a partir de la cual se obtuvieron aproximadamente 40 marcos de lectura completos, y de la cual se pueden obtener muchos más genes. También se clonaron fragmentos de genes importantes en la modulación de la respuesta de defensa, incluyendo proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), factores de transcripción (WRKY), cuyos marcos de lectura completos pueden ser fácilmente obtenidos. Todos los genes clonados fueron utilizados para el estudio de la interacción del chile habanero con *P. capsici*, proporcionando las primeras evidencias del posible papel de las vías de transducción en la respuesta y de la importancia de fitoreguladores en esta interacción.

Conclusiones

El aislamiento de genes es indispensable para el mejoramiento genético de cultivos de interés, especialmente en cultivos de importancia económica que son susceptibles a patógenos o a condiciones ambientales adversas, provocando pérdidas considerables en la producción. Debido a que el uso de productos químicos para el

control de los patógenos como *P. capsici* y la capacidad de los mismos para generar resistencia a los agroquímicos, la clonación de los genes que modifiquen la respuesta incrementando la resistencia de las plantas es una alternativa para el manejo de las enfermedades.

Agradecimientos

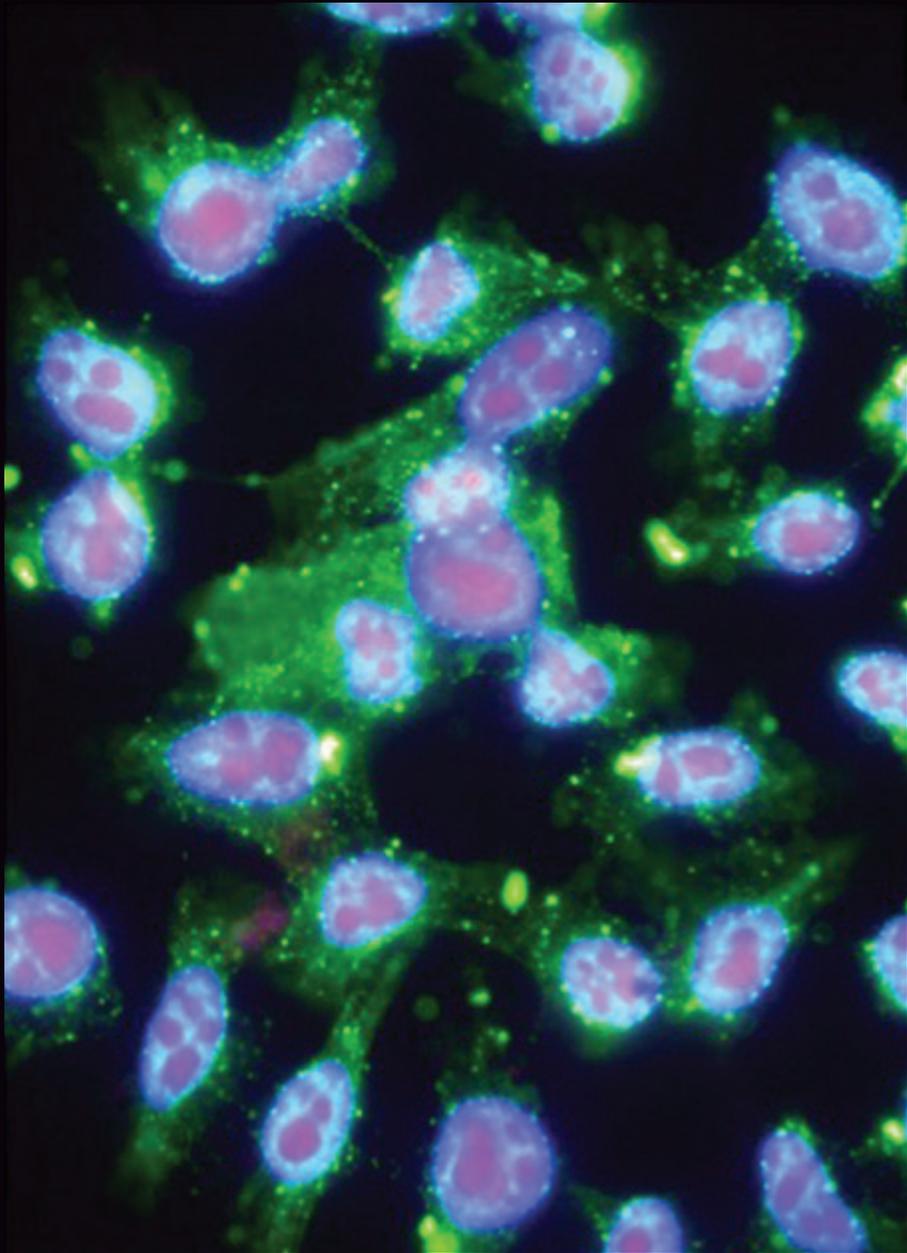
El proyecto P-48837 fue financiado por el Conacyt. YENU y MGCC agradecen las becas 172927 y 204985, otorgadas por el Conacyt, respectivamente.

Referencias bibliográficas

- (1) Parra G. and Ristaino J. 2001. "Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of bell pepper". *Plant Disease* 85:1069–1075.
- (2) Oelke L.M., Bosland P.W., Steiner R. 2003. *Differentiation of race specific resistance to Phytophthora root rot and foliar blight in Capsicum annum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128:213–218.
- (3) Bhatnagar-Mathur P., Vadez V. and Sharma K.K. 2008. "Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects". *Plant Cell Rep* 27:411–424.
- (4) Hamada H., Takeuchi S., Kiba A., Tsuda S., Suzuki K., Hikichi Y. *et al.* 2005. "Timing and extent of hypersensitive response are critical to restrict local and systemic spread of Pepper mild mottle virus in pepper containing the L3 gene". *Journal of General Plant Pathology* 71:90–94.
- (5) Nakazawa-Ueji Y.E., Núñez-Pastrana R., Souza-Perera R.A., Santana-Buzzy N., Zúñiga-Aguilar J.J. 2010. "Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defence-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense*". *European Journal of Plant Pathology* 126:403–415.

- ⁽⁶⁾ Caamal-Chan M.G., Souza-Perera R., Zúñiga Aguilar J.J. 2011. "Systemic induction of a *Capsicum chinense* nitrate reductase by the infection with *Phytophthora capsici* and defence phytohormones". *Plant Physiology and Biochemistry* 10:1238-1243.
- ⁽⁷⁾ Núñez-Pastrana R., Arcos-Ortega G.F., Souza-Perera R.A., Sánchez-Borges C.A., Nakazawa-Ueji Y.E., García-Villalobos F.J., Guzmán-Antonio A.A. Zúñiga-Aguilar J.J. 2011. "Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper". *European Journal of Plant Pathology* 131:669–683.
- ⁽⁸⁾ Arcos-Ortega G.F. Chan-Kuuk R.A., González-Kantún W.A., Souza-Perera R., Nakazawa-Ueji Y.E., Avilés Berzunza E. *et al.* 2010. "*Agrobacterium tumefaciens* transient genetic transformation of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) leaf explants". *Electronic Journal of Biotechnology* 13:7–8.
- ⁽⁹⁾ Frishman D., Albermann K., Hani J., Heumann K., Metanomski A., Zollner A. *et al.* 2001. "Functional and structure genomics using PEDANT". *Bioinformatics* 17:44–57.
- ⁽¹⁰⁾ Lizama Uc G., Estrada Mota I., Caamal Chan M.G., Souza Perera R., Oropeza Salín C., Islas Flores I. Zúñiga-Aguilar J.J. 2007. "Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L." *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 70:130-141.





La transformación estable del gen TPS1 y su efecto en chile habanero

Capítulo 27

Laura Y. Solís-Ramos, Ángela Francisca Ku González,
Luis Carlos Rodríguez Zapata, Mercí Silvestre Chuil Ku,
Citlali del Ángel, Tomás Augusto González Estrada
y Enrique Castaño de la Serna*

*Autor responsable: enriquec@cicy.mx



Resumen

En la actualidad, el uso y manejo del agua para riego constituyen un problema relevante para nuestro país. Los cambios climáticos y los periodos de sequía requieren que los cultivos tengan un suministro continuo para el crecimiento y sobrevivencia de muchos cultivares, entre ellos *Capsicum chinense* es afectado severamente durante los primeros estadios de crecimiento si el suministro de agua es reducido. Debido a los altos costos de bombeo y teniendo en cuenta posibles cambios del clima se generaron plantas transformadas con el gen que sintetiza la trealosa sintasa. Se observó previamente que en *Arabidopsis thaliana* aumentaba la cantidad de trealosa y permitía una mayor sobrevivencia a la deshidratación. En nuestro estudio realizamos transformaciones estables de *Capsicum chinense* y plantas de tercera generación fueron analizadas para determinar el efecto de estrés hídrico, obteniendo que las plántulas del primer par de meses pueden sobrevivir en sustratos con un menor porcentaje hídrico y por un periodo mayor a la de los testigos. Se concluye que esta estrategia ayudará a disminuir los costos de riego y reducir la pérdida de plantas por periodos de sequía.

Palabras clave

Péptidos antimicrobianos, biocidas naturales, *Capsicum chinense* Jacq., semillas

Introducción

Diferentes métodos de transformación genética han sido desarrollados para introducir genes en plantas, el más exitoso y utilizado es la transferencia de ADN mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Herrera-Estrella *et al.*, 2004). A pesar que desde 1853 se tenía conocimiento de la enfermedad de la agalla de la corona y en 1897 se identificó la agrobacteria como agente causal (*Agrobacterium vitis*) (citados por

Escobar y Dandekar, 2003), no fue sino hasta 1983 que se reportó la primera planta transformada, utilizando la capacidad que tiene *A. tumefaciens* de transferir parte de su ADN-T al genoma de su hospedero.

A partir de 1990 se tienen reportes de transformación genética vía *A. tumefaciens* para *Capsicum* spp, siendo la mayoría para *Capsicum annuum*; sin embargo, ninguno ha mostrado ser eficiente o reproducible (Liu *et al.*, 1990; Yu-Xian *et al.*, 1996; Manoharan *et al.*, 1998; Mihalka *et al.*, 2000; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001; Venkataiah *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002; Shivegowda *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003, Cai *et al.*, 2003; Mihalka *et al.*, 2003; Dabauza y Peña, 2003; Lee *et al.*, 2004), y a la fecha hemos reportado protocolos para *C. chinense* con el gen reportero GUS y con el gen WUSCHEL (Solís-Ramos *et al.*, 2009; Solís-Ramos *et al.*, 2010b).

Se llevaron a cabo estudios para obtener plantas transformadas *in vitro* e *in planta* de *C. chinense* mediante *A. tumefaciens*, ya que es indispensable contar con un método de transformación genética no sólo para el mejoramiento genético de la especie sino para el estudio y entendimiento de genes particulares (Solís-Ramos *et al.*, 2009), por lo que se presentan los experimentos iniciales que permitieron su la transformación de chile habanero con el gen TPS1.

Transformación genética *in planta* de *Capsicum chinense*

En los últimos años se han descrito varios protocolos de transformación y regeneración para varias especies de *Capsicum*; en su mayoría han sido para *C. annuum* L. (Mihalka *et al.*, 2000; Shivegowda *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005) y Venkataiah *et al.* (2001), que emplearon explantes de *C. baccatum*, *C. frutescens* y *C. praetermissum*. Sin embargo, éstos reportan una baja eficiencia de transformación y reproducibilidad (Mihalka *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005).

Los dos prerrequisitos más importantes para el éxito del método de transformación genética son la disponibilidad de un sistema de regeneración de los explantes y un método para la transformación, los cuales no están disponibles para *Capsicum* (Manoharan *et al.*, 1998; Venkataiah *et al.*, 2001; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Dabauza y Peña, 2003; Delis *et al.*, 2005; Solís-Ramos *et al.*, 2009; Solís-Ramos *et al.*, 2010a).

La principal limitación es que *Capsicum* es recalcitrante (Solís-Ramos *et al.*, 2012), dificultando la regeneración y transformación genética *in vitro* (Mihalka *et al.*, 2000; Solís-Ramos *et al.*, 2009). La regeneración en la mayoría de los cultivares de este género se han reportado vía organogénesis por inducción de brotes, empleando cotiledones (Mihalka *et al.*, 2000; Shivegowda *et al.*, 2002; Mihalka *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004), hipocótilos (Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005), o nudos (Santana-Buzzy *et al.*, 2005).

Se trabajó con ocho plantas de *C. chinense* cultivadas bajo condiciones de invernadero (CICY). En cada etapa de floración se identificaron las flores cerradas y abiertas para aplicar los tratamientos por las mañanas, durante el tiempo en que permanecen receptivas. Cada botón floral permaneció receptivo de 4 a 7 días antes de la apertura de la flor y de 3 a 4 días después de la apertura floral.

Se utilizó la EHA105 de *A. tumefaciens* con el plásmido pCATBin19, bajo el promotor 35S y el terminador 35S. Como gen repor-

tero tiene el gen GFP, que codifica para la proteína verde fluorescente. Se tomó una asada de una colonia de la cepa y se incubó en 30 ml de medio LB más kanamicina (50 mg/L), el cual se incubó en la oscuridad en un orbitador toda la noche a 28 °C. Luego se inocularon 2 ml del cultivo anterior en 30 ml LB y de la misma forma se incubó 24 horas o hasta alcanzar la fase logarítmica temprana ($0.4 < DO_{600} < 0.6$).

La suspensión celular se centrifugó a 5500 durante 20 minutos, el sobrenadante se descartó y la pastilla celular se resuspendió en 10 ml de NaCl a 0.15 M. Luego se centrifugó en las mismas condiciones que las usadas anteriormente. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de CaCl₂ 0.09 M a temperatura ambiente. La suspensión resultante se usó inmediatamente para la transformación genética in vivo de plantas de Chile.

Evaluación de plantas de *Capsicum chinense* transformadas con el gen de la trehalosa-6-fosfato sintasa

La trehalosa-6- fosfato sintasa (TPS) es un disacárido (α -D-gluco-pyranosyl-1, 1- α -D-glucopyranoside) no reductor que se acumula en una amplia variedad de organismos, que le da resistencia ante estrés por sequía, salinidad, altas o bajas temperaturas (Avonce *et al.*, 2004). El gen para la trehalosa-6-fosfato sintasa fue detectado por complementación en una cepa mutante de *S. cerevisiae* TPS1 con una biblioteca de cDNA de *Arabidopsis thaliana*. (Blázquez *et al.*, 1998; Zentella *et al.*, 1999).

Estudios de genética funcional han permitido el aislamiento y caracterización del gen TPS1 en *E. coli*, levaduras y otros microorganismos (Bell *et al.*, 1992; Luyten *et al.*, 1993; Kaasen *et al.*, 1994). En *S. lepidophylla*, o planta de resurrección, el gen SITPS1 codifica para una enzima funcional que se muestra por complementación de la levadura mutante TPS1 Δ mutante, la

cual restablece la acumulación de trealosa (Zentella *et al.*, 1999), en *A. thaliana* AtTPS1 se encontraron homólogos que también fueron capaces de soportar la síntesis de trealosa (Blázquez *et al.*, 1998), sin embargo, se ha detectado en bajos niveles, esto llevó a la detección de la N-terminal del gen TPS1 de *A. thaliana* y *S. lepidophylla*, resultando un mayor incremento en la actividad del gen TPS1 (Van Dijck *et al.*, 2002), indicando esto una mayor síntesis de trealosa, confiriéndole resistencia a la deshidratación a la planta (Godjin *et al.*, 1997).

El objetivo de este trabajo fue transformar Chile habanero con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* con el plásmido: pBinRD29A-bifuncional (pBin), con la secuencia trealosa 6- fosfato sintasa.

Una vez comprobada la inserción del plásmido en el genoma de la bacteria se realizó la transformación de las plantas por medio de la infiltración al vacío. Se consideraron plantas defoliadas completamente y plantas defoliadas que mantenían el meristemo apical. La finalidad de este procedimiento fue observar diferencias del número de brotes y desarrollo de las plantas, concluyéndose que se desarrollaron mejor aquellas que presentaban meristemo apical, floreciendo en un menor tiempo y con mejor desarrollo de frutos, sin embargo, las defoliadas completamente presentaron desarrollo lento, incluso una diferencia ligera en cuanto a altura de la planta, así como frutos de menor tamaño.

Se obtuvieron plantas de *Capsicum chinense* (Jacq.) transformadas con la cepa C58C1-pBin de *A. tumefaciens*, con la secuencia trealosa 6- fosfato sintasa y fueron verificadas mediante la aplicación de la técnica de PCR (T1) y la electroforesis en gel agarosa para observar el tamaño de banda, que fue de aproximadamente 1.6 kb. A las plantas positivas T1 (primera generación de plantas transformadas) le fueron cosechados

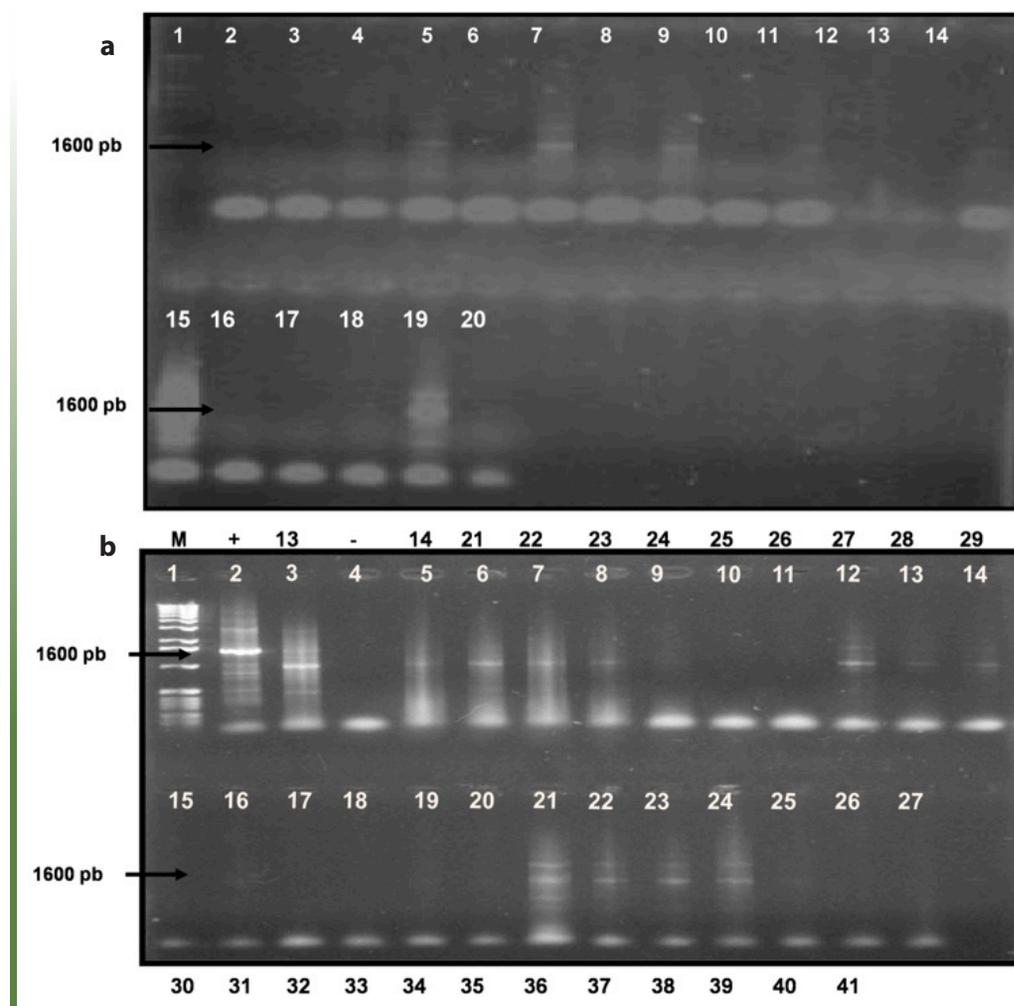
sus frutos y se sembraron las semillas en charolas con una mezcla de tierra y agrolita (50:50 W/W) hasta que se generaron nuevos brotes, y luego se trasplantaron a bolsas de 4 kg, con tierra y agrolita en proporción 1:1 para su floración y colecta de fruto en invernadero (T2).

Verificación por PCR de transformantes T2

Una vez comprobada la extracción de ADN de hoja (según Rong-Cheng *et al.*, 2001), se realizó la PCR de las mismas para comprobar la transformación con C58C1-pBin. Para ello se tomó en consideración lo siguiente: 2.5 μ l de buffer 10X, 2 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 1 μ l de dNTPS (10 mM), 0.2 μ l de Taq Polimerasa,

Figura 1

Evaluación de PCR de las plantas de chile infectadas con *A. tumefaciens*-pBIN



A: Carril 1: escalera de ADN de 1 kb, carril 2: control positivo (ADN pBin), carril 3: control negativo (agua) y carriles 4 al 20: ADN de hoja de chile habanero (plantas de la Núm. 1 a la 20). **B:** Carril 1: marcador de peso molecular 1 kb, carril 2: control positivo (ADN pBin), carril 4: control negativo (agua), carriles 3, y del 5 al 27: producto de PCR (plantas Núms. 13,14, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 y 41).

1 µl de forward TPS1, 1 µl reverse TPS1, agua y ADN de la planta. Se corrió el programa trealosa: 94 °C 5 minutos desnaturalización inicial, 94 °C 1 minuto 30 ciclos desnaturalización, 50 °C 1 minuto 30 ciclos hibridación, 72 °C 2 minutos 30 ciclos elongación, 72 °C 10 minutos, 4 °C 10 minutos final.

En la Figura 1 se observó una banda muy tenue a nivel de 1.6 kb tamaño aproximado del plásmido utilizado, en las plantas número 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 15 y 19. Con el fin de confirmar estos resultados se repitió la PCR utilizando el ADN de hoja de las plantas que dieron positivas. Se observó una banda amplificada en las plantas número 10, 11, 12, 14 y 15, resultando la segunda ocasión en que dan positivas (datos no mostrados). En esta reacción se volvió a utilizar ADN de la planta Núm. 14, con lo que se comprobó que dio positiva nuevamente. Además, se utilizó

ADN de las hojas de las demás plantas infectadas con *A. tumefaciens*-pBin (de la Núm. 21 a la Núm. 41).

Los geles anteriores mostraron por cuarta vez una señal positiva en el ADN de la planta Núm. 14, es decir, se corroboró la presencia del plásmido en la planta (pBIN), el cual incorporó el gen para sobreexpresar la trealosa 6- fosfato sintasa que confiere resistencia al estrés abiótico.

Estudios fisiológicos de plantas transformadas

Se llevarán a cabo estudios fisiológicos que servirán para conocer con certeza el lugar donde se acumula con mayor cantidad la trealosa 6- fosfato sintasa. Después de medir su expresión se obtuvo que las plántulas de estas plantas transformadas tuvieron 100% de sobrevivencia al estrés hídrico

Figura 2

Plántulas transformadas de *Capsicum chinense*



(A, 13, B 17, C 21 y D 23) días sin riego; todas las plantas se ven de manera similar con el mismo volumen y material de sustrato. Aquellas marcadas como pBIN fueron transformadas con el gen TPS1.

luego de 21 días. La siguiente serie de Figuras muestran una sección representativa de plantas no transformadas, transformadas con un vector vacío y transformadas con el vector binario que sobreexpresa la trealosa sintasa. Después de 13 días sin riego todas las plantas se ven de manera similar, como se puede observar en la Figura 2.

Las mismas plantas a los 17 días sin riego empiezan a mostrar cambios significativos en los grupos testigo. Puede observarse la deshidratación de varias de ellas tanto en las plantas no transformadas como en aquellas transformadas con el vector vacío. Las plantas transformadas con pBIN muestran muy leve efecto a la deshidratación en este periodo.

Posteriormente, se mantuvieron las plantas por 21 días sin agua y varios de los grupos testigo muestran deshidratación intensa y se observa un daño en 100% de los testigos mientras que las plantas transformadas con pBIN siguen sin presentar cambios severos.

Una vez que empiezan los daños, éstos continúan rápidamente en cuestión de 24 horas; las plantas transformadas presentan deshidratación leve, como se puede observar en la Figura 2.

Discusión

El uso de cocultivo con *A. tumefaciens* en zonas meristemáticas permitió la obtención de células meristemáticas transformadas que fueron útiles para obtener posteriormente flores y semillas transformadas. Las semillas fueron producidas de la misma planta para incrementar el nivel de semillas transformadas. Las semillas germinadas produjeron 5% de plantas positivas a PCR y que fueron estables por varias generaciones. Las plantas positivas denominadas plantas pBIN fueron retadas a estrés hídrico en diferentes etapas

Los daños comienzan a ser irreversibles a partir de los 23 días para las plantas no transformadas, ya que no pueden recuperarse, sin embargo, las plantas transformadas se recuperaron al adicionar agua, como puede verse en la Figura 3.

Figura 3
Adición de agua posterior a los 23 días sin riego



La fotografía muestra la recuperación de las plantas transformadas con TPS1 una hora posterior al riego, ninguna planta testigo pudo recuperarse.

de desarrollo. En todos los experimentos se obtuvo una mayor resistencia y recuperación a la carencia de riego, lo que permite pensar que el incremento de la trealosa en los tejidos le ayuda no solo para evitar el rompimiento de membranas durante la desecación sino también a evitar la pérdida de agua por incremento de turgencia. Estas plantas podrán ser de gran utilidad y el modelo en sí permitiría en su momento usar este tipo de genes para obtener cultivos en condiciones extremas.

Los resultados obtenidos con la expresión del gen TPS1 claramente muestran que disminuye la susceptibilidad al estrés hídrico y permiten una recuperación de plantas que han sido deshidratadas como se muestra en las Figuras 2 y 3. Este resultado ha sido verificado y se encuentran en proceso los estudios fisiológicos y los resultados de las características de producción de estas plantas.

En un futuro, este tipo de tecnología podría subsanar muchas de las carencias hídricas que presenta el estado para este cultivar y es factible aplicarlo a otros cultivos para permitir la producción en aquellos lugares donde nuestros recursos hídricos se vean afectados. Claramente para los cultivos por temporal sería de beneficio cuando las condiciones climáticas no sean predecibles.

Agradecimientos

El proyecto fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), México. Laura Solís agradece a la Dirección de Intercambio Académico de la Secretaría de Relaciones Exteriores (SRE), México.

Referencias bibliográficas

- (1) Bell W., Klaassen P., Ohnanker M., Boller T., Herweijer M., Schoppink P., Vander Zee P., Wiemken A. 1992. "Characterization of the 56 KDa subunit of yeast trehalose – 6-phosphate Synthase and Cloning of its Gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation". *Eur J Biochem* 951-959.
- (2) Blázquez M.A., Santos E., Flores C.L., Martínez-Zapater J.M., Salinas J., Gancedo C. 1998. "Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6phosphate synthase". *Plant J* 13:685-690.
- (3) Dabauza M., Peña L. 2003. "Response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to *A. tumefaciens* as a means of selecting proper vectors for genetic transformation". *J Hort Sci Biotechnol* 78:65-72.
- (4) Delis M., Garbaczewska G., Niemirowicz-Szczyzy K. 2005. "Differentiation of Adventitious Buds from *Capsicum annuum* L. Hypocotyls after co-culture with *Agrobacterium tumefaciens*". *Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica.* 47:193-198.
- (5) Escobar M., Dandekar M. 2003. "*A. tumefaciens* as an agent of disease". *Review. Trends Plant Sci* 8:380-385.
- (6) Goddjin, Ojm, Verwoerd Tc, Voogd E., Krutwagen Rwhh, De Graaf Pthm, Poels J., Van Dun K. 1999. In: Ponstein A.S., Damm B., Pen J. 1997. "Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plant". *Plant Physiol* 113:181-190.
- (7) Herrera-Estrella L., Simpson J., Martínez-Trujillo M. 2004. Transgenic Plants. An historical perspective. In: Peña, L. Transgenic Plants. Methods and Protocols. Humana Press 286:3-31.

- (8) Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens J-P., Van Montagu M., Schell J. 1983. "Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells". *EMBO J.* 2:987-995.
- (9) Kaasen I., McDougall J., Strom A. 1994. "Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *E. coli* and homology of the otsB proteins to the test trehalose – 6- phosphate synthase/phosphatase complex". *Gene* 145:9-15.
- (10) Lee H.Y., Kim H.S., Kim J.Y., Jung M., Park Y.S. Lee J.S., Choi S.H., Her N.H., Lee J.H., Hyung N.I., Lee C.H., Yang S.G., Harn C.H. 2004. "A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. Genetic Transformation and Hybridization". *Plant Cell Rep.* 23:50-58.
- (11) Li D., Zhao K., Xie B., Zhang B., Luo K. 2003. "Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.)". *Plant Cell Rep.* 21:785-788.
- (12) Liu W., Parrot W.A., Hildebrand D.F., Collins G.B., Williams E.G. 1990. "Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes". *Plant Cell Rep.* 9:360-364.
- (13) Luyten K., De Koning W., Tesseur I., Ruiz Mc., Ramos J., Cobbaert P., Thevelein J.M., Hohmann S. 1993. "Disruption of the Kluyveromyces GGS1 gene causes inability to Grow in Glc and Fructose and is Suppressed by mutations that reduce sugar uptake". *Eur J Biochem* 217: 01-713.
- (14) Manoharan M., Sree C.S., Lakshmi S. 1998. "Agrobacterium mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var Pusa jwala)". *Plant Sci* 131:77-83.
- (15) Mihalka V., Fari M., Szasz A., Balazs E., Nagy I. 2000. "Optimized protocols for efficient plant regeneration and gene transfer in pepper (*Capsicum annuum* L.)". *J. Plant Biotechnol* 2:143-149.
- (16) Mihalka V., Balázs E., Nagy I. 2003. "Binary transformation systems based on 'shooter' mutants of *Agrobacterium tumefaciens*: a simple efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. Genetic Transformation and Hybridization". *Plant Cell Rep.* 21:778-784. pp: 629-783.
- (17) Ochoa-Alejo N., Ramírez-Malagon R. 2001. "Invited Review. *In vitro* chilli pepper biotechnology". *In vitro Cell Dev Biol* 37:701-709.
- (18) Romero-Pozueta J., Houlne G., Cañas L., Schantz R., Chamarro J. 2001. "Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling plants explants for *Agrobacterium*-mediated transformation". *Plant Cell Tiss Org Cult* 67:173-180.
- (19) Shivegowda T., Mythili J.B., Anand L., Saipradad G., Ramanjini G., Gowda T.K. 2002. "In vitro regeneration and transformation in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.)". *J Horticult Sci Biotechnol* 77:629-634.
- (20) Solís-Ramos L.Y., González-Estrada T., Nahuath-Dzib S., Rodríguez-Zapata L., Castaño E. 2009. "Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis". *Plant Cell Tiss Org Cult* 96:279-287.
- (21) Solís-Ramos L.Y., Nahuath-Dzib S., Andrade-Torres A., Barredo-Pool F., González-Estrada T., Castaño de la Serna E. 2010A. "Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*". Section Cellular and Molecular Biology. Junio. *Biología.* 65:504-511.

- ⁽²²⁾ Solís-Ramos L.Y., González-Estrada T., Rodríguez-Zapata L.C., Ku-González A., Castaño E. 2010. *The Mechanism Infection of Agrobacterium tumefaciens. Plant genetic transformation and molecular markers*. Ed. By Ashwani Kumar. Pointer publishers. Jaipur. India, p: 57-65.
- ⁽²³⁾ Solís-Ramos L.Y., González-Estrada T., Andrade-Torres A., Godoy-Hernández G., Castaño De La Serna E. 2010B. "Endogenous GUS-like activity in *Capsicum chinense* Jacq. Electron". *J Biotechnol*
- ⁽²⁴⁾ Solís-Ramos L.Y., Andrade-Torres A., Sáenz L., Oropeza C., Castaño de la Serna E. 2012. "Somatic embryogenesis in recalcitrant plants". In: Sato, K. (Ed). *Embryogenesis*. In Tech, Open Access Publisher. Croatia. ISBN:979-953-307-439-8.
- ⁽²⁵⁾ Van Dijck P., Mascorro-Gallardo J.O., De Bus M., Royackers K., Iturriaga G., Thevelein J.M. 2002. "Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels on expression in yeast". *Biochem J* 366:63-71.
- ⁽²⁶⁾ Venkataiah P., Christopher T., Subhash K. 2001. "Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in four *Capsicum* species". *Capsicum and Eggplant Newsletters* 20:68-71.
- ⁽²⁷⁾ Yu-Xian X., Wen-Jun O-Y., Yi-Feng Z., Zhang-Liang C.H. 1996. "Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation". *Plant Cell Rep.* 16:71-75.



La transformación temporal para estudiar la resistencia contra enfermedades causadas por microorganismos patógenos

Capítulo 28

Guadalupe Fabiola Arcos-Ortega, Rafael Antonio Chan-Kuuk,
Wilma Aracely González-Kantún, Ramón Souza-Perera,
Yumi Elena Nakazawa-Ueji, Elidé Avilés-Berzunza,
Gregorio Godoy-Hernández, Michael A. Lawton, José Juan Zúñiga Aguilar*
*Autor responsable: zuniga@cicy.mx



Resumen

La mayoría de las especies del género *Capsicum* son recalcitrantes a la transformación genética temporal o estable mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. En este estudio se optimizó un protocolo para la transformación genética temporal del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) a través de la evaluación y estandarización de varios factores, de los cuales se analizaron: la edad del explante, el tiempo y la temperatura del co-cultivo, la aplicación de una presión negativa (vacío) y o positiva (infiltración), en combinación con una microinyección, el uso de acetosiringona durante el cultivo bacteriano y una modificación del pH durante el ensayo histoquímico de GUS para eliminar la actividad endógena de la β -glucuronidasa. El protocolo estandarizado fue utilizado para movilizar dos vectores binarios vacíos, así como dos ADN complementarios completos de *Capsicum chinense* que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis, la proteína 10 conocida como PR10 (EMBL AJ879115) y la esterasa (EMBL AJ879119).

Palabras clave

Agrobacterium tumefaciens, transformación genética, *Capsicum chinense* Jacq.

Introducción

Durante la última década, la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* ha sido utilizada exitosamente para la transformación genética de varios miembros de la familia Solanaceae.^(1,2) Sin embargo, un miembro de esta familia, el género *Capsicum*, ha permanecido en gran medida recalcitrante a la transformación y como resultado sólo se ha logrado una baja frecuencia y reproducibilidad (0.5- 1%) de los protocolos de transformación.^(3,4,5,6) La falta de un adecuado sistema de regeneración *in vitro* representa un significativo obstáculo para su manipulación genética y para el desarrollo de estudios de genómica funcional.^(1,7,5,6)

Para superar estas dificultades, los análisis genómicos de chile han sido realizados en sistemas heterólogos como los de *Arabidopsis thaliana*,⁽⁸⁾ *Solanum lycopersicum*,⁽⁹⁾ *Nicotiana tabacum*⁽¹⁰⁾ y *Allium cepa*.⁽¹¹⁾ Sin embargo, es necesario establecer un sistema homólogo para el estudio de los genes de *Capsicum*. En este sentido, la transformación genética temporal puede ser una herramienta importante que permite el análisis funcional de los genes de una manera rápida y previa a la transformación genética estable.

Adicionalmente, la transformación genética temporal es un proceso relativamente rápido y fácil el cual se puede realizar de 5 a 8 días, desde la infiltración hasta el análisis de expresión de genes, con un alto porcentaje de transformación de explantes,^(12,13) por lo que con el uso de dichos sistemas se puede evaluar un alto número de construcciones.⁽¹⁴⁾

En estudios recientes,^(15,16) lograron generar brotes *in vitro* a partir de callos originados de hojas de chile habanero. Lo cual establece la posibilidad de utilizar la transformación genética temporal de hojas de chile habanero para lograr la transformación genética estable a través de la organogénesis. En el presente estudio analizamos diferentes factores para optimizar un protocolo de transformación genética temporal de hojas de chile habanero mediante *Agrobacterium tumefaciens*. El protocolo estandarizado fue utilizado para movilizar dos vectores binarios vacíos, así como dos ADN complementarios completos de *Capsicum chinense* que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis, la proteína 10 conocida como PR10 (EMBL AJ879115) y la esterasa (EMBL AJ879119). Éstos fueron clonados de una librería de cDNA construida a partir de células en suspensión elicidadas con el oomiceto *Phytophthora capsici*.

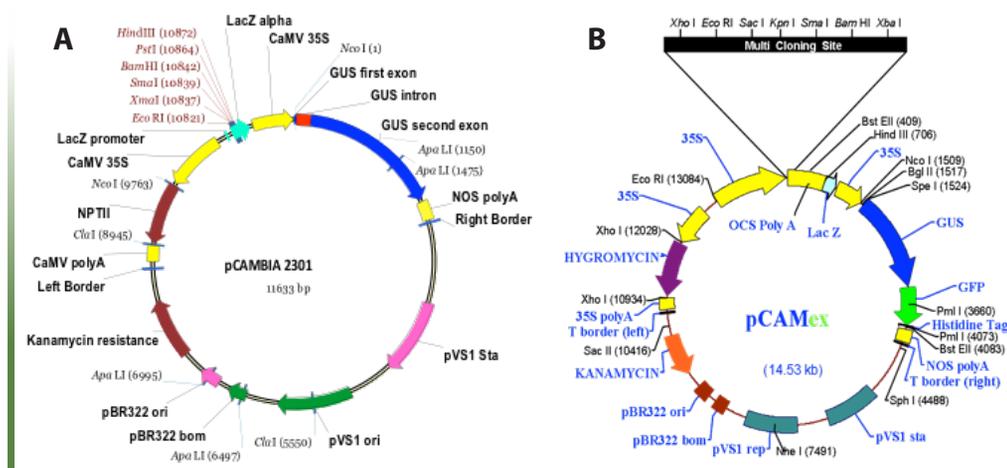
Resultados y discusión

En nuestro laboratorio analizamos la interacción entre el oomiceto *Phytophthora capsici* y el chile habanero a un nivel fisiológico, bioquímico y molecular, por lo que uno de nuestros objetivos es estudiar la dispersión del micelio del oomiceto a través de las hojas de chile transformadas con genes relacionados con la defensa. Ante este reto, nuestro interés se centró en generar un sistema de transformación temporal, que nos permitiera lograr una expresión homogénea de los transgenes en toda la superficie de la hoja.

En este estudio se utilizaron dos vectores binarios: pCAMBIA2301 y pCAMex (Figura 1). El vector pCAMBIA2301 fue utilizado para

discriminar falsos positivos producidos por la expresión del transgen de GUS, debido a que este vector contiene un intrón en el gen reportero que no puede ser procesado por la bacteria. Consecuentemente, la tinción de GUS puede ser atribuido exclusivamente al tejido transformado. El vector binario pCAMex fue construido a partir del vector pCAMBIA 1303 (<http://www.cambia.org>) para expresar constitutivamente los genes de interés; pCAMex es un vector binario versátil que además de detectar la expresión de GUS, permite monitorear tejidos transformados *in vivo* a través de la detección de la proteína verde fluorescente (GFP) en un microscopio óptico.

Figura 1
Vectores binarios



Representación esquemática de los vectores binarios empleados en este estudio. El vector binario pCAMBIA 2301 fue utilizado como testigo negativo (a). El vector binario pCAMex (b), construido a partir del vector pCMABIO1303, fue utilizado para sobreexpresar los transgenes bajo el control del promotor constitutivo 35S.

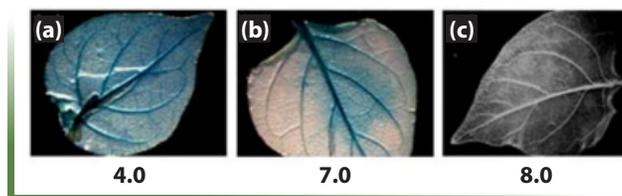
Debido a que los miembros de la familia Solanacea expresan una actividad endógena de la β -glucoronidasa,⁽¹⁷⁾ la cual es dependiente del pH,⁽¹⁸⁾ evaluamos si la actividad endógena en chile habanero podría ser eliminada mediante la modificación del pH de la solución del ensayo histoquímico de GUS.⁽¹⁹⁾ Para lo cual, las hojas transformadas fueron incubadas en soluciones de GUS ajustadas a diferentes valores de pH. Los resultados indicaron que a un pH de 4.0 la tinción es alta en toda la superficie de las hojas. Mientras que a un pH de 7.0 la tinción se reduce y se elimina completamente a un pH de 8.0 (Figura 2). Estos resultados confirmaron que el chile habanero posee una actividad endógena pH dependiente de la β -glucoronidasa. Por ello, todas las determinaciones histoquímicas de GUS de los experimentos de transformación fueron realizadas a un pH de 8.0.

Debido a que no se obtuvieron hojas transformadas que mostraran una expresión GUS positiva mediante la infiltración directa de la solución bacteriana a través del vacío, se

evaluó la aplicación de tres métodos, uno basado en una presión negativa, otro en una presión positiva y otro más con una combinación de ambas, complementados con la aplicación de varias inyecciones de la solución bacteriana en el envés de cada hoja mediante la aguja de una jeringa. En el Cuadro 1 se puede observar que se obtuvieron los mejores resultados con la aplicación de la combinación de una presión negativa y una positiva en las hojas inyectadas.

Se ha demostrado que la edad de la planta determina la manifestación de un grado de tolerancia ante un microorganismo patógeno y se ha establecido que las plantas de mayor edad presentan una mayor tolerancia durante la interacción con un patógeno.⁽²⁰⁾ Adicionalmente, se ha determinado que varios factores son importantes para el éxito de la transformación genética y dentro de éstos se ha establecido que con el uso de explantes provenientes de plantas jóvenes se obtienen resultados más eficientes.⁽²¹⁾ En este estudio evaluamos si la edad de los explantes tiene

Figura 2
Efecto del pH sobre la actividad endógena de la β -glucuronidasa en hojas de chile habanero *Capsicum chinense*



Las hojas no transformadas provenientes de plántulas de cuatro semanas de edad, fueron analizadas mediante el ensayo histoquímico de GUS ajustado a diferentes valores de pH. Las hojas fueron blanqueadas mediante lavados sucesivos con etanol y fotografiadas con un microscopio óptico. (a) pH 4.0; (b) pH 7.0; (c) pH 8.0.

alguna influencia sobre la eficiencia de la transformación genética temporal. En las Figuras 3a-b y en la Figura 4a, se puede observar que la máxima eficiencia de transformación temporal se obtuvo en las hojas provenientes de plántulas con cuatro semanas de edad para todas las construcciones evaluadas. Mientras que en las hojas provenientes de plántulas con ocho semanas de edad o con más semanas, la eficiencia de transformación disminuye significativamente y ocurre una alta necrosis de las hojas (Figura 3a).

La acetosyringona (AS) es una molécula usada por *A. tumefaciens* como un atrayente químico para iniciar la adhesión a las células.⁽²¹⁾ La AS es adicionada durante el cultivo de células bacterianas para incrementar la virulencia y por consiguiente la eficiencia de la transferencia de los transgenes.^(22,23)

En este estudio no se observaron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de AS que fueron evaluadas (Figura 4b). Sin embargo, cuando la AS no fue agregada al medio de cultivo bacteriano, la transformación temporal disminuyó significativamente y no fue homogénea en toda el área de la hoja. Esta dependencia a la AS ha sido también observada en

Arabidopsis thaliana⁽²²⁾ y en *C. annuum*,⁽⁴⁾ donde la AS fue uno de los componentes esenciales para la transformación de esta especie de chile.

Otro de los factores importantes para la transformación genética es el co-cultivo. Con el fin de determinar la importancia de este factor en la transformación temporal del chile habanero, en este estudio se evaluaron tres tiempos de duración del proceso de co-cultivación (uno, dos y tres días) y dos temperaturas 20 y 28 °C. Los mejores resultados fueron obtenidos con dos días de co-cultivo a 28 °C (Cuadro 1). La eficiencia de la transformación temporal fue reducida significativamente con un periodo de co-cultivo de tres días y con un periodo de un día a una temperatura de 20 °C no se obtuvieron hojas GUS positivo. Resultados similares han sido reportados para *C. annuum*, por quienes⁽⁵⁾ reportan que con un periodo de co-cultivación de dos días obtuvieron una mayor eficiencia de transformación de cotiledones y hipocotilos de chile, pero periodos más largos (4,5, 7 días) de co-cultivación ocasionaron necrosis de los tejidos lo cual impidió la regeneración de brotes. Adicionalmente, en *Citrus paradise* se han obtenido más brotes GUS positivos con un periodo de dos días de co-cultivo.⁽²⁴⁾

Cuadro 1
Efecto de diferentes factores sobre la eficiencia de la transformación temporal de hojas de chile habanero (*Capsicum chinense*)

Factores evaluados	Tratamiento de cada factor	Número de explantes positivos a la prueba histoquímica de GUS (porcentajes ± desviación estándar)				ANOVA
		Constructos				
		pCAMBIA2301	pCAMex	pCAMex:PR10	pCAMEx:Est	
Condiciones de cocultivo en oscuridad (días, temperatura)	3, 20 °C	0	0	0	0	P < 0.05
	2, 20 °C	0	0	0	0	
	1, 20 °C	0	0	0	0	
	3, 28 °C	11(18.8 ± 3.0)	8(13.8 ± 3.2)	9(14.9 ± 4.0)	7(11.0 ± 3.5)	
	2, 28 °C	13(38.9 ± 0.5)	23(38.4 ± 2.0)	21(34.9 ± 2.0)	22(36.0 ± 2.5)	
	1, 28 °C	0	0	0	0	
Método de transformación	Vacío (V)	0	0	0	0	P < 0.05
	Infiltración (I)	8(12.7 ± 2.5)	6(10.5 ± 3.0)	6(10.5 ± 2.5)	5(8.8 ± 2.5)	
	Microinyección (M)	03(4.9 ± 2.6)	05(8.3 ± 3.0)	02(3.8 ± 2.0)	04(6.6 ± 3.6)	
	V + I	12(20.0 ± 3.0)	10(16.6 ± 4.0)	8(12.7 ± 4.1)	6(10.5 ± 4.0)	
	V + M	04(7.2 ± 2.0)	06(9.4 ± 2.5)	03(5.5 ± 3.0)	05(8.8 ± 3.0)	
	I + M	14(23.8 ± 3.0)	15(24.4 ± 5.0)	16(27.2 ± 1.5)	16(26.6 ± 4.5)	
	M + I + V	28(47.2 ± 2.0)	24(40.5 ± 2.5)	23(38.8 ± 6.8)	24(40.5 ± 3.5)	
Período de pre-incubación (horas)	0	28(46.0 ± 3.0)	24(40.5 ± 2.5)	23(40.5 ± 3.0)	25(42.2 ± 5.0)	P < 0.05
	1	42(69.4 ± 5.0)	40(67.1 ± 2.5)	43(71.6 ± 5.5)	40(67.1 ± 2.5)	
	6	33(54.9 ± 4.3)	36(59.4 ± 2.5)	30(49.9 ± 3.6)	34(56.6 ± 2.5)	
	12	40(66.6 ± 2.0)	33(54.4 ± 4.7)	32(53.8 ± 2.0)	35(58.3 ± 3.6)	
	24	42(69.9 ± 5.5)	39(65.5 ± 2.3)	41(67.7 ± 4.0)	34(56.6 ± 4.5)	

Los datos son presentados como la media ± el error estándar de tres experimentos independientes. El número de hojas utilizado en cada experimento fue de 60.

*La eficiencia de la transformación fue evaluada basada en el número y porcentaje de hojas GUS positivas (GUS+) producidas.

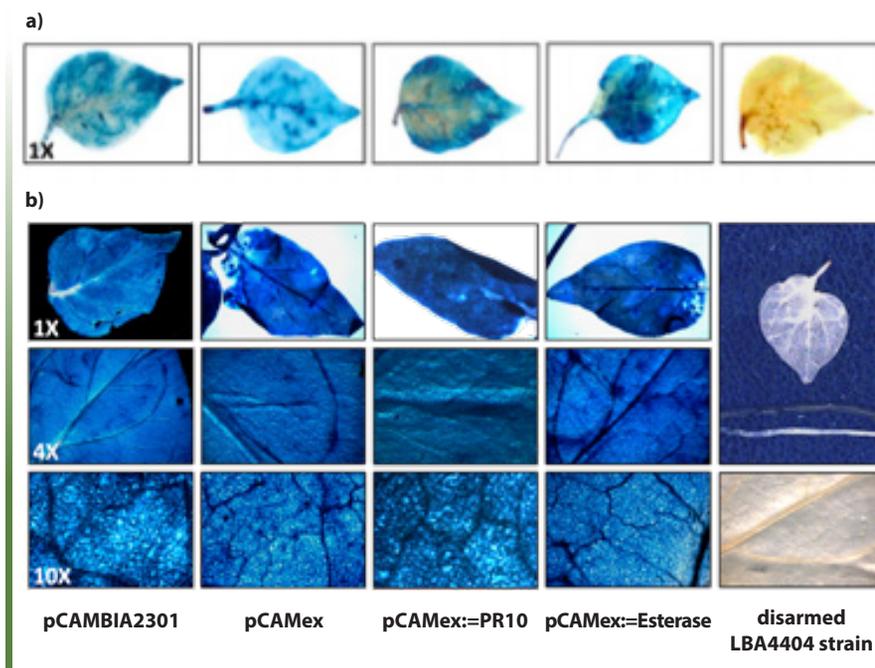
*Sobre un agitador ajustado a 200rpm.

*Valores con un diferente superíndice en una misma columna son significativamente diferentes (P < 0.05).

Usando las mejores condiciones obtenidas de nuestros experimentos de co-cultivación (dos días en la oscuridad con agitación constante a 200 rpm y a una temperatura de 28 °C), se evaluó el efecto de la precultivación de los explantes en medio MS sin reguladores de crecimiento con el fin de controlar la respuesta de hipersensibilidad de las hojas del chile habanero, inducida durante la co-cultivación con *A. tumefaciens*. Los resultados indicaron que con un periodo de una hora de

precultivación se logró un incremento de 50% en la frecuencia de hojas GUS positivos para todas las construcciones (Cuadro 1). Sin embargo, con periodos más largos de pre-cultivo (6, 12 y 24 horas) no se obtuvieron incrementos significativos de la eficiencia de la transformación temporal (Figura 4c). En este sentido, en un estudio realizado en la nuez *Arachis hypogaea* se han obtenido mayores eficiencias de transformación con la aplicación de un periodo de precultivación de los

Figura 3
**Efecto de la edad del explante
 sobre eficiencia de transformación**



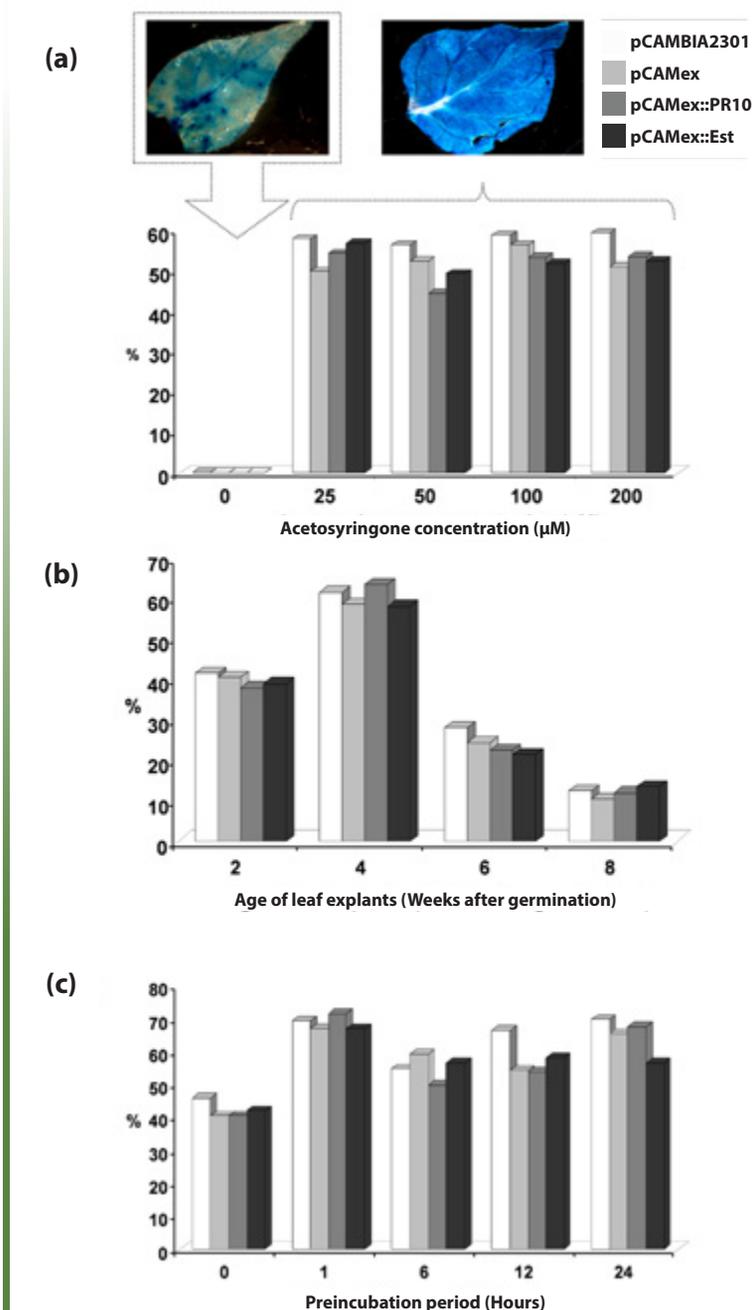
Las hojas provenientes de plántulas de diferentes edades fueron transformadas con la construcción indicada, bajo óptimas condiciones mencionadas en el texto. Después del ensayo histoquímico de GUS, las hojas fueron blanqueadas mediante sucesivos lavados con etanol y fotografiadas en un microscopio a diferentes aumentos (1X, 4X y 10X). (a) Plántulas de ocho semanas de edad; (b) Plántulas de cuatro semanas de edad.

explantes.⁽²⁵⁾ Al respecto,⁽⁵⁾ consideran que el precondicionamiento de los explantes de chile puede promover la transformación genética, pero periodos largos de precondicionamiento pueden resultar en una baja infección de *A. tumefaciens*.

Durante las últimas dos décadas, varios estudios han presentado evidencia clara de la existencia de una "ventana de competencia", lo cual es considerada como el tiempo durante el cual las células son susceptibles a la transformación por *A. tumefaciens*, aunque las bases del incremento de la transformación mediante un precondicionamiento de los explantes no ha sido completamente establecida. En este sentido, se ha establecido que las células vegetales inician una adaptación fisiológica

que las conduce a un estado competente para la transformación durante el periodo de precondicionamiento.^(23,24) Adicionalmente, varios autores han sugerido que el periodo de precultivo reduce el estrés de las plantas.^(25,5) En este estudio, los mejores resultados fueron obtenidos con una combinación de los diferentes factores evaluados, lo cual generó un protocolo eficiente para la transformación temporal de hojas de chile habanero, el cual consiste de un precondicionamiento de las hojas de una hora en medio MS sin reguladores del crecimiento, seguido de una combinación de los tres métodos de transformación evaluados (método 7), la adición de 100 μ M de acetosiringona al medio YEB durante el cultivo bacteriano y un periodo de co-cultivación de dos días en medio MS estéril líquido sin

Figura 4
Factores que afectan la eficiencia de transformación genética de *Capsicum chinense*



El efecto de varios factores sobre la eficiencia de transformación fue analizado. (a) Las hojas provenientes de plántulas de cuatro semanas de edad fueron co-cultivadas con *A. tumefaciens* que fue previamente cultivada en presencia de acetosyringona. (b) las hojas provenientes de plántulas de chile con diferentes edades fueron transformadas bajo condiciones óptimas descritas en el texto. (c) Las hojas provenientes de plántulas de cuatro semanas de edad fueron preincubadas en medio MS durante varios periodos de tiempo antes del co-cultivo.

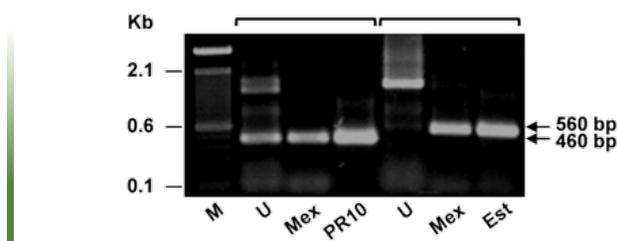
reguladores del crecimiento en la oscuridad con agitación constante a 200 rpm y a una temperatura de 28 °C.

En este estudio evaluamos la expresión de los transgenes en las hojas que fueron transformados mediante ensayos de RT-PCR, los resultados indicaron que con la aplicación del protocolo establecido se pueden obtener altos niveles de transcritos de GUS, se pueden obtener en hojas transformadas con los vectores binarios vacíos y/o con las construcciones de los genes PR10 y esterasa (Figura 5a). En las hojas no transformadas no se detectaron transcritos de GUS (Figura 5a, línea 1). Los transcritos para los genes PR10 y esterasa fueron también detectados en hojas transformadas (Figura 5b); sin embargo, ambos genes se expresaron también en bajos niveles en hojas transformadas con los vectores binarios vacíos (Figura 5b, líneas 3 y 5). Adicionalmente, se observaron bajos niveles de PR10 en hojas no transformadas (Figura 5b, línea 2). Al respecto, el gen PR10, al ser un miembro relacionado con la patogénesis, puede ser expresado como un

resultado de factores de estrés bióticos y abióticos. El gen de esterasa no es clasificado como un miembro de la familia PR, pero éste es una hidrolasa que funciona en la defensa contra patógenos.⁽²⁶⁾ Es posible que la expresión de dichos genes es el resultado del proceso de transformación por lo cual dichos genes no son adecuados para evaluar las eficiencias de transformación durante la estandarización de protocolos.

Durante los últimos cinco años se ha logrado un remarcable progreso en el desarrollo y conocimiento del proceso de infección de *A. tumefaciens* y los procesos de transformación. La literatura revisada ha proporcionado una clara evidencia que existe una alta recalcitrancia del género *Capsicum* a la transformación mediante *A. tumefaciens* y al cultivo celular *in vitro*. Como consecuencia, no existen protocolos que puedan ser usados entre las diferentes especies. A nivel mundial, las investigaciones que se realizan utilizan sistemas heterólogos para expresar genes de chile con el fin de estudiar su función biológica.⁽²⁷⁾

Figura 5
**Detección del transcrito del transgen
en hojas de chile transformadas**



Dos microgramos de RNA total fueron obtenidos de hojas genéticamente transformadas y fueron amplificados mediante transcriptasa reversa y PCR (RT-PCR) empleando cebadores específicos de cada gen evaluado. Dos microlitros de cada producto de amplificación fueron evaluados por electroforesis en un gel de agarosa y teñido con 1 µg·mL⁻¹ de bromuro de etidio. (a) Amplificación (RT-PCR) del transcrito del gen reportero GUS; (b) Amplificación (RT-PCR) de los transcritos de los genes PR10 y esterasa. M: 1Kb marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen). U: Hojas no transformadas; pCAMex: vector binario vacío; pCAMBIA 2301: vector binario vacío pCAMBIA; PR10: construcción pCAMex:PR10; Est: construcción pCAMex: Esterasa; símbolo (+): Control positivo de amplificación por PCR usando el vector pCAMBIA2301 como templado.

Conclusiones

En el presente estudio se desarrolló un eficiente sistema de transformación genética temporal de *Capsicum chinense*, conocido en el ámbito mundial como chile habanero.⁽²⁸⁾ Este protocolo puede ser utilizado para estudiar la función biológica de genes de chile relacionados con la defensa a patógenos en un sistema homólogo.

El objetivo fundamental del presente trabajo fue la obtención y optimización de un protocolo de transformación genética

temporal de chile habanero mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, mediante el estudio de diversos factores que afectan la transformación. El protocolo establecido permite la obtención de un 50-60% de hojas transformadas y sentando las bases que permitirán el estudio de genes de interés agronómico, comercial y principalmente los asociados con la resistencia a patógenos.

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el Conacyt, convenio P48831. GFAO y YENU agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas 56153 y 172927 otorgadas.

Referencias bibliográficas

- (1) Ochoa-Alejo N., Ramírez-Malagón R. 2001. "In vitro chili pepper biotechnology". In vitro *Cellular & Developmental Biology-Plant* 37(6): 701-729.
- (2) Nianiou I., Karavangeli M., Zambounis A., Tsaftaris A. 2002. "Development of pepper transgenic plants via *Agrobacterium* and biolistic transformation". In: *Acta Horticulturae* 579 (ISSH), II Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes, Thessaloniki, Greece 83-87.
- (3) Manoharan M, Sree Vidya C.S., Lakshmi S.G. 1998. "Agrobacterium-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala)". *Plant Sci* 131(1): 77-83.
- (4) Kim Sihyun, Kim S.R., Chung S.A., Hong Y.N., Lee K.W. 2001b. *Molecules and Cells* 12(2):221-226.
- (5) Li D., Zhao K., Xie B., Zhang B., Luo K. 2003. "Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.)". *Plant Cell Reports* 21(8): 785-788.
- (6) Lee Y.H., Kim H.S., Kim J.Y., Jung M., Park Y.S., Lee J.S., Choi S.H., Her N.H., Lee J.H., Hyung N.I., Lee C.H., Yang S.G., Harn C.H. 2004. "A new selection method for pepper transformation: callus mediated shoot formation". *Plant Cell Reports* 23(1-2): 50-58.

- (7) Shivegowda S.T., Mythili J.B., Anand L., Saiprasad G.V.S., Gowda R. Gowda T.K.S. 2002. "In vitro regeneration and transformation in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.)". *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77(5): 629-634.
- (8) Hong J.H., Hwang B.K. 2006. "Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, CACHi2, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the CACHi2-overexpressing Arabidopsis". *Planta* 223(3):433-448.
- (9) Sarowaret S., Kim Y.J., Kim E.N., Kim K.D., Choi J.Y., Hyung N.I., Shin J.S. 2006. "Constitutive expression of two pathogenesis-related genes in tomato plants enhanced resistance to oomycete pathogen *Phytophthora capsici*". *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86(1):7-14.
- (10) Park C.J., Shin Y.C., Lee B.J., Kim K.J., Kim J.K., Paek K.H. 2006. "A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to tobacco mosaic virus and *Xanthomonas campestris*". *Planta* 223(2):168-179.
- (11) Hong J.P., Kim W.T. 2005. "Isolation and functional characterization of the Ca-DREBLP1 gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang)". *Planta* 220(6):875-888.
- (12) Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N., Commandeur U. 1999. "Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants". *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30(2): 113-116.
- (13) Van Der Hoorn Ral, Laurent F., Roth R., De Wit P.J.G.M. 2000. "Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis". *Molecular Plant Microbe Interactions* 13(4): 439-446.
- (14) Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. 1997. "An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves". *Plant Sci* 122(1):101-108.
- (15) Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Barahona-Pérez F., Montalvo-Peniche M.C., Zapata-Castillo P.Y., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O., Mirandaham M.L. 2005. Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40(6):1829-1831.
- (16) Zapata-Castillo P.Y., Canto-Flick A., Lopéz-Puc G., Solís-Ruiz A., Barahona-Pérez F., Santana-Buzzy N. 2007. "Somatic embryogenesis in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions". *Hortscience* 42(2): 329-333.
- (17) Plegt L., Bino R.J. 1989. "β-glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and non-transgenic plants". *Molecular and General Genetics*, 216(2-3):321-327.
- (18) Sudan C., Prakash S., Bhomkar P., Jain S., Bhalla-Sarin N. 2006. "Ubiquitous presence of β-glucuronidase (GUS) in plants and its regulation in some model plants". *Planta*, 224(4): 853-864.
- (19) Alwen A., Benito Moreno R.M., Vicente O., Heberle-Bors E. 1992. "Plant endogenous β-glucuronidase activity: how to avoid interference with the use of the *E. coli* β-glucuronidase as a reporter gene in transgenic plants". *Transgenic Research*, 1(2): 63-70.
- (20) Kim Y.J., Hwang B.K., Park K.W. 1989. "Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*". *Plant Disease* 73(9):745-747.
- (21) Binns A.N., Thomashow M.F. 1988. "Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants". *Annual Review of Microbiology* 42: 575-606.

- ⁽²²⁾ Sheikholeslam S.N., Weeks D.P. 1987. "Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*". *Plant Molecular Biology* 8(4): 291-298.
- ⁽²³⁾ Sunilkumar G., Vijayachandra K., Veluthambi K. 1999. "Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing vir gene induction". *Plant Sci* 141(1): 51-58.
- ⁽²⁴⁾ Costa M.G.C., Otoni W.C., Moore G.A. 2002. "An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradise* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes". *Plant Cell Reports* 21(4): 365-373.
- ⁽²⁵⁾ Venkatachalam P., Geetha N., Jayabalan N.S.S., Sita L. 1998. "*Agrobacterium*-mediated genetic transformation of groundnut (*Arachis hypogaea* L.): An assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants". *Journal of Plant Research* 111(4): 565-572.
- ⁽²⁶⁾ Kim Y.S., Lee H.H., Ko M.K., Song C.E., Bae C.Y., Lee Y.H., Oh B.J. 2001a. "Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (*Capsicum annuum*) esterase". *Molecular Plant Microbe Interactions* 14(1): 80-85.
- ⁽²⁷⁾ Kim S.H., Hong J.K., Lee S.C., Sohn K.H., Jung H.W., Hwang B.K. 2004. "CAZFP1, Cys2/His2-type zinc-finger transcription factor gene functions as a pathogen-induced early-defense gene in *Capsicum annuum*". *Plant Molecular Biology* 55(6): 883-904.
- ⁽²⁸⁾ Canto-Flick A., Balam-Uc E., Bello-Bello J.J., Lecona-Guzmán C., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., Gómez-Uc E., López-Puc G., Santana-Buzzy N., Iglesias-Andreu L.G. 2008. Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest known cultivars". *HortScience*, 43(5):1344-1349.



Producción académica del Centro de Investigación Científica de Yucatán sobre el chile habanero que se cultiva en la Península de Yucatán

Capítulo 29

Tomás Augusto González Estrada,*
José Juan Zúñiga Aguilar y Felipe Vázquez Flota
*Autor responsable: tge@cicy.mx



Resumen

El Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY) es una institución de excelencia en investigación y docencia en posgrado que contribuye al avance de la ciencia, la tecnología y la innovación en el sureste de México. La Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP) es una unidad integrante del CICY que se especializa en el desarrollo de investigación básica y aplicada para generar conocimiento en los campos de la genética, la biología celular, la biología molecular, la bioquímica y la fisiología de plantas de interés agroindustrial o nativas de la Península de Yucatán. También trabaja para obtener nuevas metodologías en dichos campos. Asimismo, dirige su actividad hacia la formación de recursos humanos de alto nivel.

El presente capítulo pretende resumir y analizar 15 años (2003-2017) de trabajo académico por parte de los investigadores de la UBBMP y de otras Unidades del CICY que se han enfocado al estudio y conocimiento del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) que se produce en la Península de Yucatán. Durante el periodo reportado se generaron 113 publicaciones de las cuales 61 correspondieron a artículos de investigación original, 21 a memorias en extenso, 10 a capítulos de libro, 16 a artículos de divulgación y cinco a libros. Se graduaron 162 profesionistas de nivel superior y de posgrado, que con la asesoría y la dirección de los investigadores, condujo a realizar sus respectivas tesis de grado y estancias posdoctorales. Se realizaron 82 tesis de licenciatura, 46 tesis de maestría, 28 tesis de doctorado y seis estancias de posdoctorado. La mayoría de las tesis y estancias posdoctorales se realizaron en la UBBMP. Respecto de las variedades mejoradas de chile habanero, se registraron un total de nueve variedades y se gestionaron tres derechos de obtentor de variedad mejorada ante el Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa), respectivamente.

Palabras clave

Chile habanero, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, vinculación, producción académica, Península de Yucatán

Introducción

Durante el segundo semestre de 2002, el Dr. Armando Escamilla Bencomo (+), entonces director de la UBBMP del CICY, propuso a los investigadores de dicha Unidad llevar a cabo un proyecto estratégico denominado “Caracterización bioquímica y molecular del germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la Península de Yucatán para su mejoramiento genético”, el cual se desarrollaría en el periodo 2003-2006. Entre los objetivos del proyecto se buscaba estudiar la variabilidad genética del chile habanero cultivado en la Península de Yucatán con respecto de su acumulación de capsaicina y/o resistencia a patógenos, la formación de investigadores y de personal técnico de alto nivel en campos estratégicos de la bioquímica y la biología molecular de plantas a través del estudio de la variabilidad genética del chile habanero y la vinculación con el sector productivo relacionado con el chile habanero del sureste de México.

En ese entonces, la propuesta representó una iniciativa innovadora en el sentido de plantear la colaboración entre los investigadores de la UBBMP, y con otras unidades del CICY, en torno de una especie de importancia económica y social para la región sureste del país. También se planteó la importancia de colaborar con especialistas de otras instituciones académicas y de investigación en México y en el extranjero.

La propuesta del Dr. Escamilla generó reacciones favorables entre los integrantes de la UBBMP, ya que incluso algunos investigadores habían iniciado proyectos de investigación y dirección de tesis con dicha especie, como fue el caso de la Dra. Nancy Santana Buzzy y su grupo. Sin lugar a duda, la propuesta del proyecto estratégico ha tenido mucha relevancia en el quehacer de la UBBMP ya que a lo largo de 15 años se han generado proyectos, numerosas publicaciones de investigación científica, variedades mejoradas de chile habanero, infraestructura para multiplicar semilla y se han formado recursos humanos de alto nivel. Los impactos sociales, económicos y académicos de esta iniciativa continúan siendo relevantes para México y en particular para la Península de Yucatán.

El presente capítulo pretende resumir y analizar 15 años de trabajo académico por parte de los investigadores de la UBBMP y de otras Unidades del CICY, que por diversas razones han tenido el interés y la dedicación de enfocar su quehacer al estudio y conocimiento de este cultivo.

La vinculación académica de la cadena de valor del chile habanero

La cadena productiva del chile habanero de la Península de Yucatán constituye un buen ejemplo de vinculación entre los sectores académico, productivo y público. La constante cercanía de los investigadores con los productores, industriales y autori-

dades de los diferentes niveles de gobierno ha permitido focalizar los productos de la investigación hacia aspectos y temas que son de relevancia para los involucrados en la cadena productiva, creando una ventana de oportunidad para contribuir a resolver

problemáticas pertinentes y para la formación de recursos humanos de alto nivel especializados en diferentes aspectos de importancia académica o productiva.

En Yucatán, la participación del sector académico y de investigación en esta dinámica de vinculación y colaboración es relativamente reciente y se remite a mediados de la década 1970-1980 en los Campos Agrícolas Experimentales de Mocochoá y Uxmal del entonces Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). En esa década se desarrollaron y liberaron las variedades INIA y UXMAL y se publicaron folletos divulgativos dirigidos a productores. En la misma década se incorporaron investigadores del entonces Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2 de Conkal, Yucatán. A finales de los 90 y durante los primeros años del siglo XXI se incorporan investigadores de otras instituciones de educación superior y centros públicos de investigación como la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), la Facultad de Química-UADY, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UADY, el Instituto Tecnológico de Mérida, el Centro Regional Universitario de la Península de Yucatán (CRUPY) de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH), el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco Unidad Sureste (CIATEJ) y el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY).

Cabe destacar la creación, en 2003, de la Red de Encadenamientos Productivos para el Desarrollo Agroindustrial de Yucatán (ENPRODAY) para el chile habanero con el objetivo de fomentar la formación de redes productivas en el sector agroindustrial y proporcionar apoyo tecnológico, financiero y de comercialización, con el fin de contribuir a una mayor derrama económica en diferentes regiones donde se apoya al campo mejorando el nivel y la

calidad de vida de la familia rural. La red ENPRODAY estuvo operando hasta el año 2012, aproximadamente.

El 23 de marzo de 2005 se sometió ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) la solicitud de la "Denominación de Origen del Chile Habanero de Yucatán". Solicitud en la que colaboraron investigadores y técnicos de la UBBMP, así como académicos de otras instituciones de educación superior y de centros de investigación radicados en Yucatán. Dicha solicitud fue posteriormente modificada para ser sometida como "Denominación de Origen del Chile Habanero de la Península de Yucatán". La denominación de origen fue autorizada por el IMPI y publicada en el *Diario Oficial de la Federación* el 10 de junio de 2010. Constituye así la primera denominación otorgada a una especie de chile en México y continúa vigente.

Aunado a lo anterior, investigadores de la UBBMP también apoyaron en la elaboración de diversos documentos normativos de ámbito local, nacional e internacional relacionados con chiles. Entre estos cabe mencionar el "Plan rector estatal del sistema producto chiles de Yucatán" (2004), la actualización de la Norma Mexicana Productos alimenticios no industrializados para consumo humano de chile fresco (*Capsicum* spp.) -especificaciones (NMX-FF-025-SCFI-2007); la creación de la norma "México Calidad Suprema del Chile Habanero" (Sagarpa, 2007); el proyecto de la "Norma Mexicana del Chile habanero-Especificaciones y métodos de prueba" del Comité Técnico de Normalización Nacional de Productos Agrícolas, Pecuarios y Forestales (Sagarpa, 2007), la cual posteriormente se convertiría en la Norma Oficial Mexicana NOM-189-SCFI-2012, "Chile Habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum chinense* Jacq.) -Especificaciones y métodos de prueba" publicada en el *DOF* el

30 noviembre 2012, cuya versión revisada se publicó de nueva cuenta en el *DOF* el 22 noviembre 2016.

En el ámbito internacional, colaboraron en la elaboración de la norma del *Codex Alimentarius* para el chile (CODEX STAN 307-2011) adoptada en la 34ª Reunión de la Comisión del *Codex Alimentarius*, Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, en Ginebra, Suiza (2011) y en la elaboración de la norma "UNECE Standard FFV-61 concerning the marketing and commercial quality control of chilli " publicada el 10 noviembre de 2013 por la Comisión Económica para Europa de Naciones Unidas (CEPE-UNECE), Ginebra, Suiza. Eventualmente, dichas propuestas normativas fueron autorizadas y están vigentes.

La producción académica sobre chile habanero del CICY

La participación del CICY en la cadena productiva del chile habanero ha sido por demás relevante si consideramos los productos académicos, las variedades mejoradas, la infraestructura y los recursos humanos a nivel superior que se han formado a lo largo de 15 años.

Los productos de investigación se pueden agrupar en las siguientes categorías: las publicaciones, la formación de recursos humanos y el registro de variedades mejoradas. Las publicaciones se pueden desagregar en artículos de investigación original en revistas arbitradas (internacionales y nacionales), libros, capítulos de libro, memorias en extenso y artículos de divulgación. La formación de recursos humanos comprende las tesis de doctorado, maestría, licenciatura y las estancias posdoctorales. Por último, y no menos importante por su impacto económico, se consideran las variedades de chile habanero mejoradas y registradas ante el SNICS.

Entre 2011 y 2012 investigadores de la UBBMP, en colaboración con técnicos, ingenieros y autoridades del CICY, elaboraron una propuesta, gestionaron fondos y terrenos que permitieron establecer la Unidad Productora de Semillas en el Parque Científico-Tecnológico de Yucatán ubicado en el poblado de Sierra Papacal, Yucatán. En dichas instalaciones, desde 2014, se han multiplicado las variedades de chile habanero mejoradas por investigadores y técnicos de la UBBMP y registradas en el SNICS de la Sagarpa. A la fecha, dichas variedades están disponibles para su comercialización (Anexo 1).

Para cada categoría, los productos se clasificaron por año de publicación, o registro, y por orden alfabético (Anexo 1). El listado de productos académicos se integró con las aportaciones de los investigadores de la UBBMP que estudian al chile habanero de la Península de Yucatán y también de investigadores que laboran en otras Unidades del CICY; sin embargo, por causas ajenas a nuestro interés es posible que de manera involuntaria se hayan omitido algunos productos y que también algunos de los incluidos pudieran presentar errores en la manera de citar los nombres de los autores, los títulos o las referencias. En la medida de lo posible se revisó y se trató de corregirlos.

En la Figura 1 se reporta la producción académica sobre chile habanero del CICY durante el periodo 2003-2017, medida por el número de publicaciones, recursos humanos formados y las variedades registradas. Durante el periodo reportado se generaron

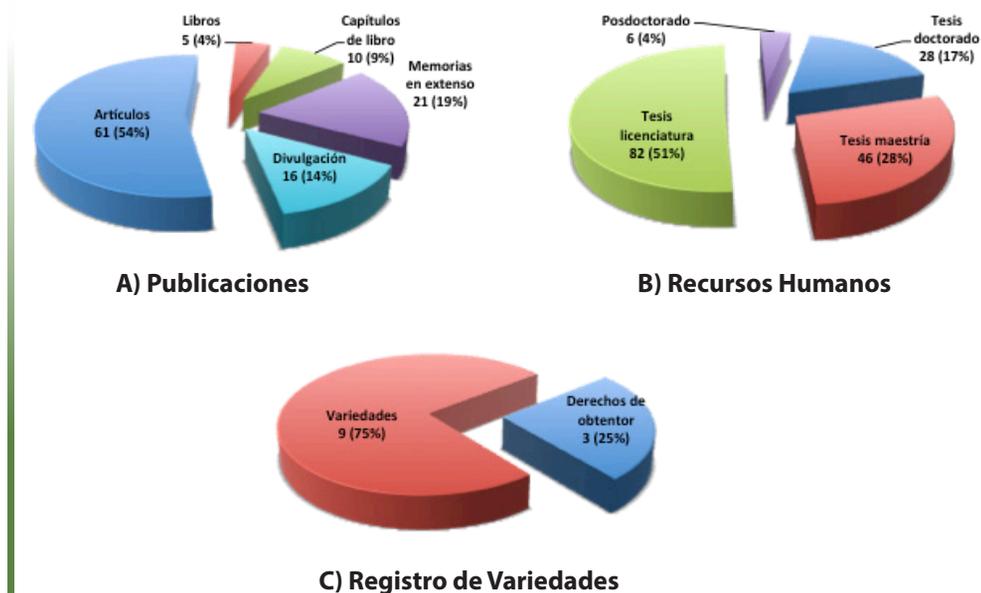
113 publicaciones de las cuales 61 (54%) corresponden a artículos de investigación original, 21 (19%) a memorias en extenso, 10 (9%) a capítulos de libro, 16 (14%) a artículos de divulgación y 5 (4%) a libros. En promedio, se generaron 7.5 publicaciones por año durante este periodo.

La formación de recursos humanos está representada por 162 tesis de grado y estancias posdoctorales; de las cuales 82 (51%) corresponden a tesis de licenciatura, 46 (28%) a tesis de maestría, 28 (17%) a tesis de doctorado y 6 (4%) a estancias de posdoctorado. Por tanto, durante el periodo se graduaron 10.4 profesionistas de nivel superior y de posgrado con la asesoría y dirección de investigadores del CICY, la mayoría de la UBBMP.

Respecto de las variedades mejoradas de chile habanero, resultado de la investigación aplicada, se registraron un total de nueve (75%) variedades y se gestionaron tres (25%) derechos de obtentor de variedad mejorada ante la Sagarpa. En promedio, se registraron 0.6 variedades mejoradas de chile habanero por año.

Para comparar el comportamiento de los productos académicos durante el periodo de análisis, éstos se graficaron considerando los años en que se reportan.

Figura 1
Producción académica sobre chile habanero del Centro de Investigación Científica de Yucatán, 2003-2017



Fuente: Información proporcionada por investigadores del CICY, Nov. 2017.

Publicaciones

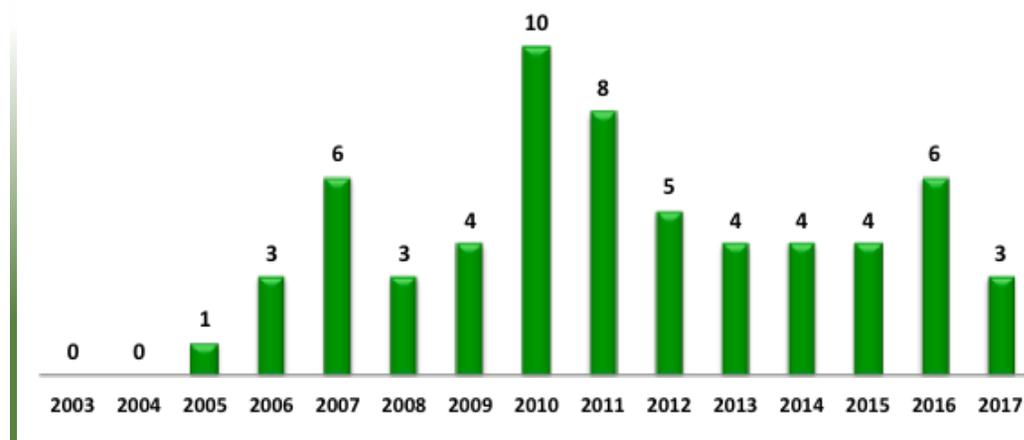
Artículos publicados de investigación original

La Figura 2 reporta el número de artículos nacionales e internacionales, producto de investigación original. Los años 2010 y 2011 reportan la mayor producción de artículos arbitrados, respectivamente, y que sumados representan 29.5% de la producción total del periodo.

Los artículos científicos se han publicado en revistas nacionales e internacionales tales como *Agronomía Mesoamericana*;

Journal of the Mexican Chemical Society; *Revista Fitotecnia Mexicana*; *Tropical and Subtropical Agroecosystems*; *African Journal of Biotechnology*; *Australian Journal of Crop Science*; *Electronic Journal of Biotechnology*; *European Journal of Plant Pathology*; *Food Chemistry*; *Frontiers in Plant Science*; *Functional Plant Biology*; *HortScience*; *Journal of American Society of Horticultural Science*; *Journal of Phytopathology*; *Journal of Science Food and Agriculture*; *Plant Cell Tissue and Organ Culture*; *Plant Physiology and Biochemistry*, entre otras (Anexo 1).

Figura 2
Artículos publicados de investigación original sobre chile habanero por investigadores del CICY, 2003-2017

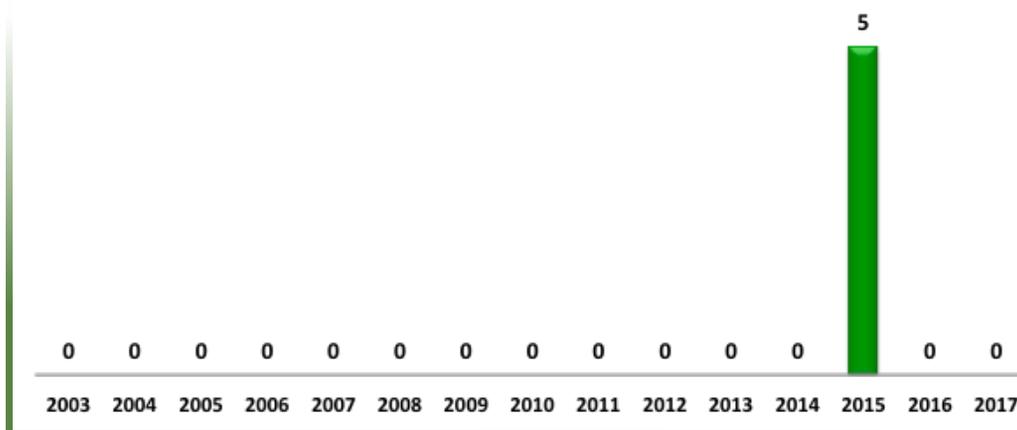


Libros

El total de libros editados e impresos sobre chile habanero durante el periodo, se reporta en la Figura 3. Los cinco libros reportados se publicaron en 2015. El primero corresponde al *Manual de producción en invernadero de plántulas certificadas de chile habanero de la Península de Yucatán* compilado en colaboración con el Colegio de Posgraduados Campus Campeche (CP), el Instituto Tecnológico Superior de los Ríos de Balancán Tabasco (ITSR), el Instituto

Tecnológico de Chiná Campeche (ITC) y el Consejo Nacional de Productores de Chiles, S.C. (CONAPROCH). Los cuatro restantes corresponden al *Estudio estratégico de los mercados de chile habanero de la Península de Yucatán* realizados en colaboración con el Centro Latinoamericano de Innovación en Logística (CLII), el City College of New York (CUNY) y el Texas Transportation Institute de Texas A&M University (Anexo 1).

Figura 3
Libros editados sobre el chile habanero por investigadores del CICY, 2003-2017



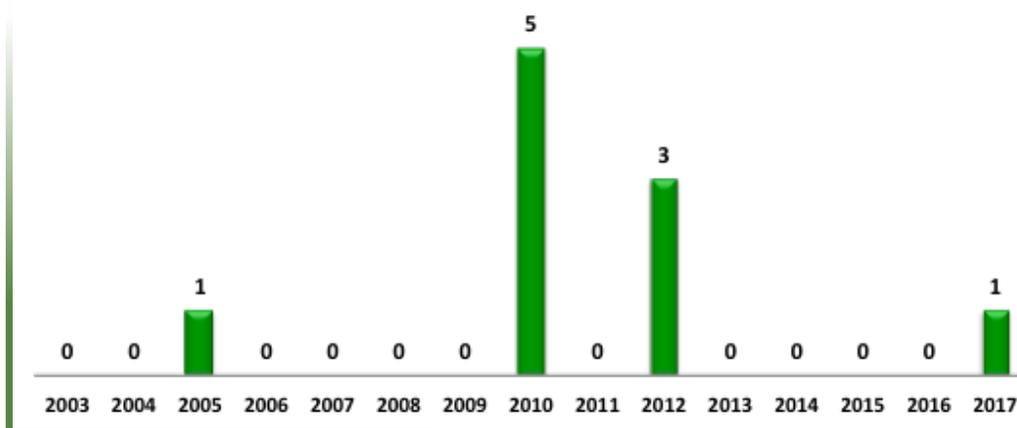
Capítulos de libro

La Figura 4 señala los capítulos de libro que se publicaron en el periodo. Destaca 2012 con cinco capítulos, que corresponden al 50% de la producción en este rubro.

y otros han sido impresos por casas editoriales internacionales (CABI, Nova Science Publishers, The Humana Press/Springer, Transworld Research Network, entre otras) (Anexo 1).

Los capítulos se han publicado en libros editados en el ámbito nacional (CICY, Conabio)

Figura 4
Capítulos de libros publicados sobre chile habanero por investigadores del CICY, 2003-2017



Memorias en extenso

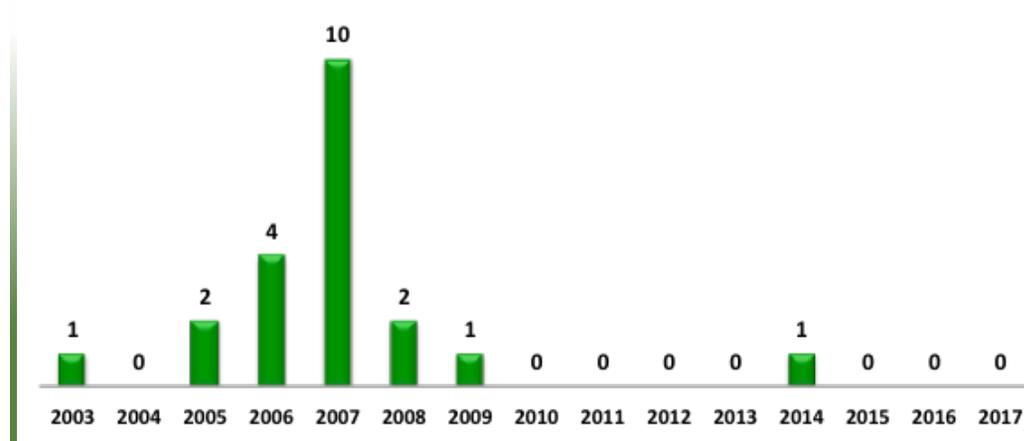
La Figura 5 reporta los artículos publicados como memorias en extenso de las participaciones en eventos como congresos, seminarios y convenciones nacionales e internacionales. El 2007 sobresale con 10 publicaciones de memorias en extenso, las cuales representan 47.6% de la producción de este rubro.

La mayor parte de las publicaciones en esta modalidad corresponden a las memorias

de las Reuniones Estatales de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca organizadas por la Fundación Yucatán Produce A.C., del 2005 al 2008, y a las participaciones de los investigadores en las diferentes ediciones de la Convención Mundial del Chile organizadas por el Consejo Nacional de Productores de Chiles, S.C. (CONAPROCH) (Anexo 1).

Figura 5

Artículos publicados como memorias en extenso sobre chile habanero por investigadores del CICY, 2003-2017



Divulgación

La Figura 6 reporta los artículos de divulgación publicados en revistas nacionales e internacionales relacionados con chiles. Destacan los años 2006 y 2009 con cuatro

publicaciones, respectivamente, y que suman el 50% de la producción de este rubro. Más del 90% de los artículos de divulgación se han publicado en revistas locales o nacionales (Anexo 1).

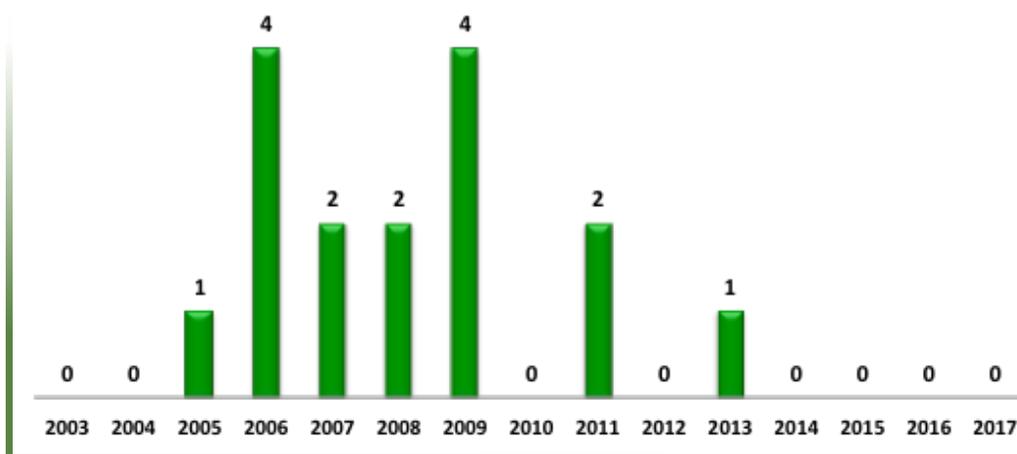
Formación de recursos humanos

Tesis de doctorado

En la Figura 7 se consigna el total de tesis de doctorado realizadas por estudiantes inscritos en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, que en su mayoría corresponden a la especialidad en Bioquímica

y Biología Molecular del CICY, y que previamente estaba registrado como Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Destacan los años 2011, 2012, 2013 y 2015 con cuatro tesis finalizadas, respectivamente. Las tesis doctorales de estos años represen-

Figura 6
**Artículos de divulgación sobre chile habanero
 publicados por investigadores del CICY, 2003-2017**

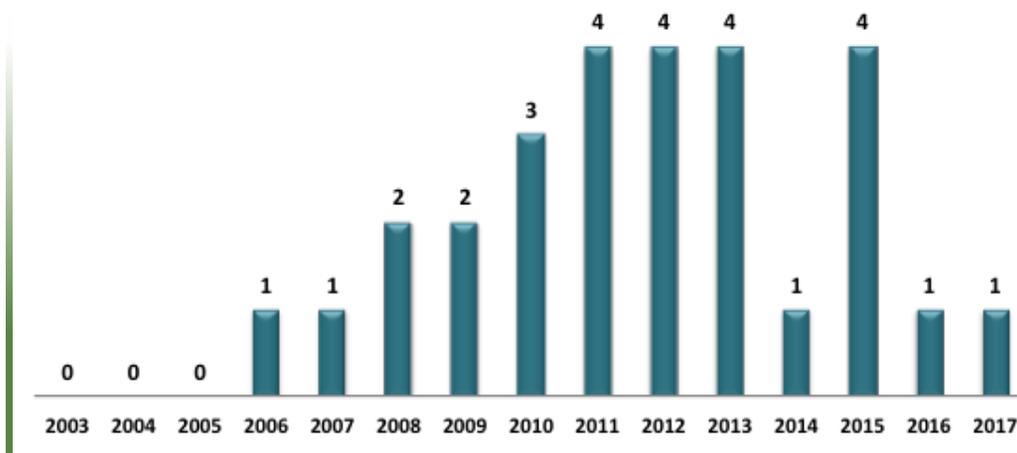


tan el 57% de la producción total. Durante el periodo, en promedio, al año se graduaron 1.87 doctores.

Las tesis de doctorado se relacionan con temas como la nutrición vegetal, el germoplasma y la diversidad genética, la relación

planta-patógeno, el cultivo de tejidos *in vitro* y la diferenciación celular, la transformación genética, la expresión génica, la identificación de proteínas, las vías de transducción de señales y la biosíntesis y producción de capsaicinoides, entre otros temas (Anexo 1).

Figura 7
**Tesis de doctorado sobre chile habanero
 realizadas en el CICY durante 2003-2017**



Tesis de maestría

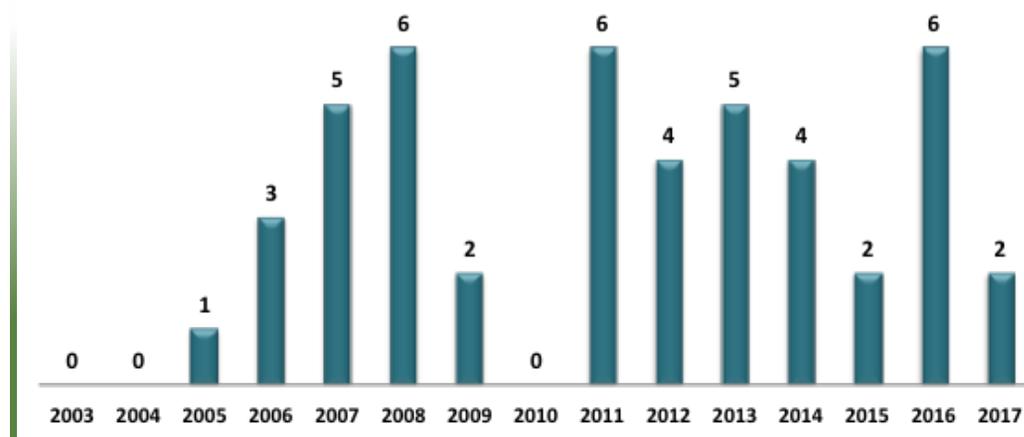
En la Figura 8 se reportan las tesis realizadas por estudiantes inscritos en el programa de Maestría en Ciencias Biológicas, con especialidad en Bioquímica y Biología Molecular del CICY, previamente registrado como Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, junto con algunas llevadas a cabo en colaboración con otros posgrados ofertados por instituciones de educación superior, durante el periodo señalado. Los años 2008, 2011 y 2016 corresponden a los años de mayor producción, con seis tesis por año respectivamente. Las tesis de maestría generadas durante estos tres años representan el 39% de la producción total

del periodo. En promedio se graduaron 3.0 estudiantes de maestría por año en temas relacionados con el chile habanero.

Entre los temas abordados en las tesis de maestría se consideran el estrés ambiental, la nutrición vegetal, el germoplasma y la diversidad genética, el mejoramiento genético, la transformación genética, la relación planta-patógeno, el cultivo de tejidos *in vitro* y la diferenciación celular, la expresión génica, la identificación de proteínas, las vías de transducción de señales y la biosíntesis y producción de capsaicinoides, entre otros temas (Anexo 1).

Figura 8

Tesis de maestría sobre chile habanero realizadas en el CICY durante 2003-2017

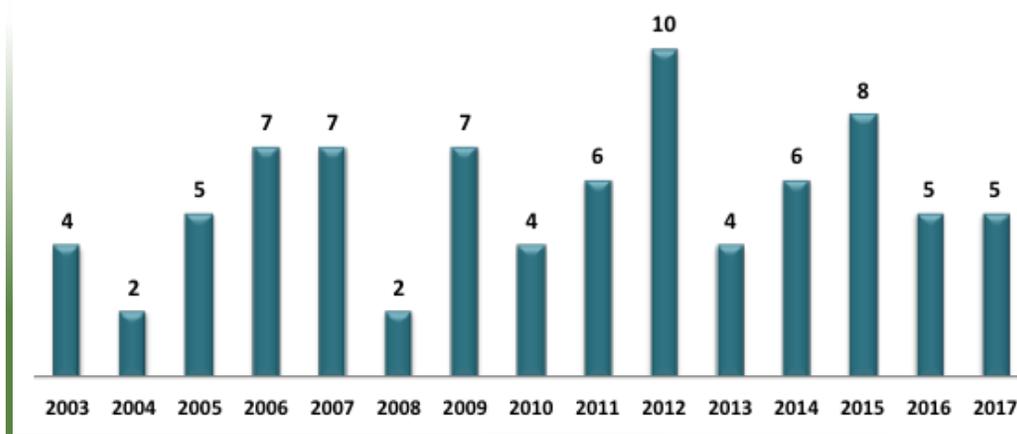


Tesis de licenciatura

Las tesis de licenciatura realizadas en el periodo se reportan en la Figura 9. Destacan los años 2012 y 2008 con diez tesis y ocho tesis, respectivamente; seguidos por los años 2006, 2007 y 2009, con siete tesis cada uno. En conjunto, estos cinco años representan el 47.5% del total de 82 tesis de licenciatura realizadas durante el periodo. Respecto del promedio de estudiantes de licenciatura graduados, se tuvieron 5.5 estudiantes graduados por año.

Los temas abordados en las tesis de licenciatura, al igual que las de maestría y doctorado, han sido diversos. Entre otros, se incluyen el estrés ambiental, la nutrición vegetal, el germoplasma y la diversidad genética, el mejoramiento genético, la transformación genética, la relación planta-patógeno, el cultivo de tejidos *in vitro* y la diferenciación celular, la expresión génica, la identificación de proteínas, las vías de transducción de señales y la biosíntesis y producción de capsaicinoides (Anexo 1).

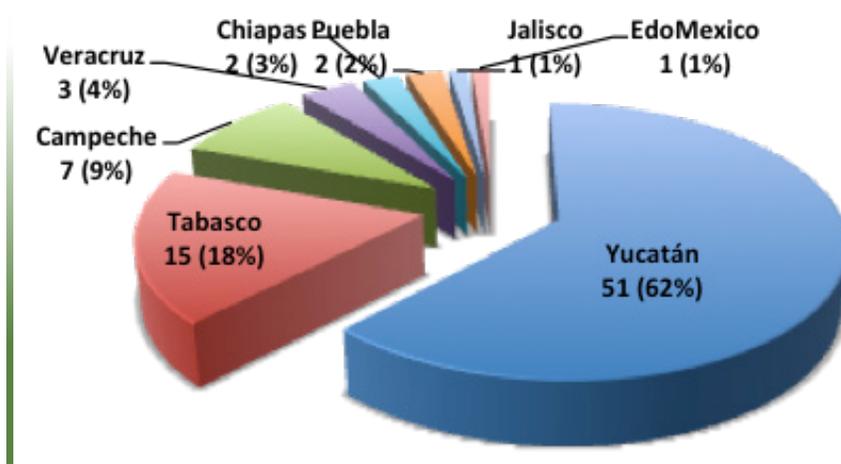
Figura 9
Tesis de licenciatura sobre chile habanero realizadas en el CICY durante 2003-2017



Cabe señalar que los estudiantes que realizaron dichas tesis provienen de instituciones de educación superior localizadas en Campeche, Chiapas, Estado de México, Jalisco, Puebla, Tabasco y Yucatán (Figura 10 y Anexo 1). Destaca la cobertura regional del origen de los estudiantes de licenciatura, ya

que abarca la región sur-sureste del país. Si bien los estudiantes originarios de Yucatán representan el 51% del total, los estudiantes provenientes de Campeche y Tabasco representan el 27% y la diferencia se distribuye entre los estados restantes.

Figura 10
Estado de origen de los estudiantes de licenciatura que realizaron su tesis sobre chile habanero en el CICY, 2003-2017

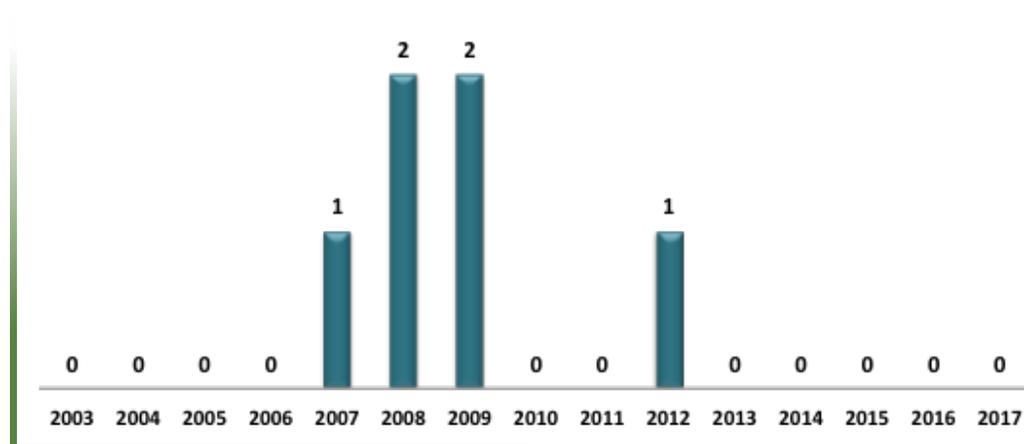


Posdoctorado

En la Figura 11 se reportan las estancias posdoctorales realizadas en los laboratorios y grupos de investigación de la UBBMP relacionadas con chile habanero durante el

periodo de análisis. Se observa que se han realizado seis estancias y que la mayoría se realizaron en 2008 y 2009. En dos casos, los posdoctorantes prolongaron su estancia por un año adicional (Anexo 1).

Figura 11
Estancias de posdoctorado sobre chile habanero realizadas en el CICY durante 2003-2017



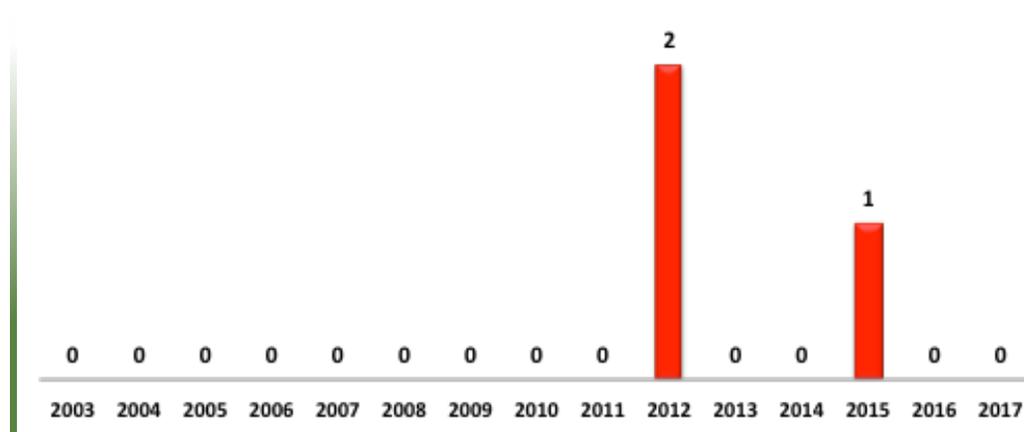
Registro de variedades mejoradas

Derechos de obtentor

La Figura 12 reporta los derechos de obtentor de variedades mejoradas de chile habanero gestionadas y autorizadas por

la Sagarpa durante el periodo. De los tres derechos otorgados, dos corresponden al 2012 y uno al 2015. Por tanto, ambos están vigentes.

Figura 12
Derechos de obtentor de variedades mejoradas de chile habanero otorgadas al CICY durante 2003-2017

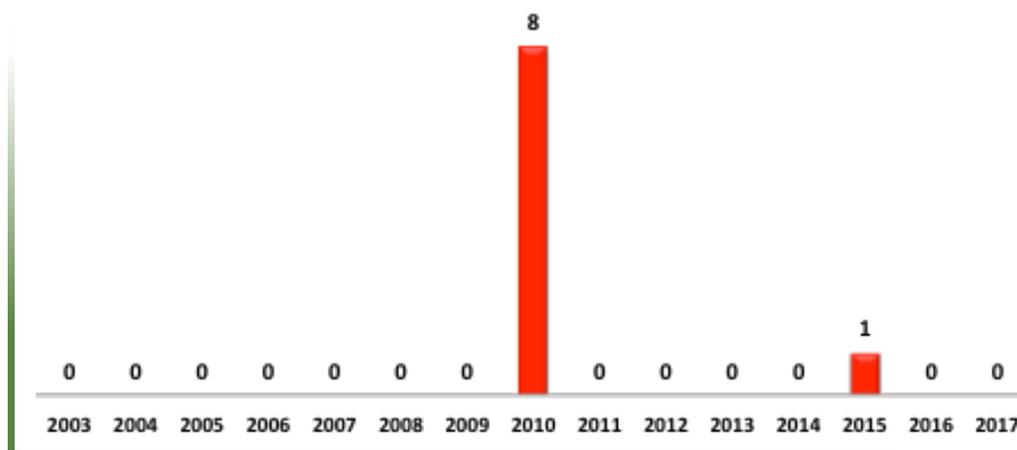


Variedades mejoradas

La Figura 13 reporta las variedades mejoradas de chile habanero que han sido registradas en el SNICS durante el periodo. De las nueve variedades registradas, ocho se

aceptaron por el SNICS en 2010 y una variedad en el 2015. Como se ha señalado, estas variedades mejoradas se encuentran disponibles en el CICY para su comercialización.

Figura 13
Variedades mejoradas de chile habanero registradas en el SNICS por el CICY durante 2003-2017



Conclusiones

Con base en la información recopilada y analizada se puede concluir que la producción académica sobre el chile habanero del CICY, y en particular de la UBBMP, ha contribuido a generar conocimiento científico, básico y aplicado, en los campos de la genética, la biología celular, la biología molecular, la bioquímica y la fisiología de plantas; así como en generar desarrollos tecnológicos con impacto productivo, económico y social para la región sureste de México y que han sido transferidos al sector productivo. Algunos de estos desarrollos están basados en innovaciones realizadas en los laboratorios del CICY y, a su vez, están permitiendo innovar a nivel productivo.

Aunado a su producción científico-académica, el grupo de investigadores del CICY que estudia el chile habanero de la Península

de Yucatán, ha contribuido a formar numerosos profesionistas a nivel de licenciatura, maestría, doctorado y posdoctorado que actualmente laboran en diversos ámbitos académicos, científicos y productivos en el sureste del país.

De especial relevancia han sido la selección de las variedades mejoradas de chile habanero y la creación de la Unidad Productora de Semillas que permite multiplicar dichas variedades, y las que en un futuro se generen, para ponerlas a disposición de los productores de la región de manera que puedan aprovechar el potencial de la Denominación de Origen del Chile Habanero de la Península de Yucatán y cumplir con la normativa de su correspondiente Norma Oficial Mexicana.

Agradecimientos

En relación con el financiamiento para llevar a cabo los diversos proyectos de investigación y generar los productos que se enlistan, ha sido fundamental el apoyo económico de diversas fuentes de financiamiento como la Fundación Produce Yucatán A.C. los Fondos Sectoriales y de Investigación Básica del Conacyt y la Secretaría de Educación Pública (SEP), el Fondo Mixto Conacyt-Gobierno del Estado de Yucatán (FOMIX), el Fondo de Desarrollo Regional (FORDECYT) y el Fondo PYME de la Secretaría de Economía.

Es importante hacer un reconocimiento a las autoridades de las instituciones de educación superior y centros públicos de investigación que a lo largo de este tiempo han colaborado con el CICY proporcionando los espacios, los laboratorios y la libertad académica para que sus académicos e investigadores generen sus productos académicos en colaboración. Especialmente, brindando las facilidades a sus estudiantes para que puedan realizar sus tesis de licenciatura, maestría y doctorado en el CICY.

Asimismo, es fundamental reconocer y agradecer el apoyo y colaboración de los productores e industriales del chile habanero de la Península de Yucatán que, en mayor o menor medida, permitieron entender los aspectos importantes de la cadena de valor para focalizar la pertinencia del trabajo de investigación.

Anexo 1. Listado de productos académicos, formación de recursos humanos y registro de variedades mejoradas de chile habanero generados en el CICY, 2003-2017

1. Publicaciones

1.1. Artículos publicados de investigación original

2005

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Montalvo-Peniche M.C., Zapata-Castillo P., Solís-Ruiz A., Zaldívar-Collí A., Gutiérrez-Alonso O., Miranda-Ham M.L. 2005. "Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis". *HortScience* 40(6): 1829-1831.

2006

López-Puc G., Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Zapata-Castillo P., Montalvo-Peniche M.C., Barahona-Pérez F., Iglesias-Andre L., Santana-Buzzy N. 2006. "Direct Somatic Embryogenesis: A highly efficient protocol for in vitro regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 41(7): 1645-1650.

Martínez-Estévez M., Ruiz-Lau N., May-Uluac R., Guzmán-Antonio A., Quintal-Tun F., Pacheco-Arjona R. 2006. "Dynamics and distribution of nutrients during the development of plantlets of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 41 (2): 477-479.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L., Montalvo-Peniche M.C., López Puc G., Barahona-Pérez F. 2006. "Improvement of in vitro culturing of *Capsicum chinense* Jacq. by inhibition of ethylene effects". *HortScience* 41(2): 405-409.

2007

Cisneros-Pineda O., Torres-Tapia L., Gutiérrez-Pacheco L.C., Contreras-Martín F., González-Estrada T., Peraza-Sánchez S.R. 2007. "Capsaicinoids quantification in chili peppers cultivated in the state of Yucatan, Mexico". *Food Chemistry* 104: 1755-1760.

Moguel-Salazar F., Quijano-Ramayo A., Keb-Llanes M., Moreno-Valenzuela O., Islas-Flores I. 2007. "Isolation of *Pseudomonas* spp. from diseased *Capsicum chinense* (habanero pepper) plants in Yucatan, Mexico". *Journal of Phytopathology* 155: 470-474.

Monforte-González M., Medina-Lara F., Gutiérrez-Carbajal M.G., Vázquez-Flota F. 2007. "Capsaicinoid quantitation by *in situ* densitometry of thin layer chromatography plates". *Journal of Liquid Chromatography & Related Technology* 30: 1697-1704.

Montalvo-Peniche M.C., Iglesias-Andreu L., Mijangos-Cortés J., Nahuat-Dzib S., Barahona-Pérez F., Canto-Flick A., Santana-Buzzy N. 2007. "In vitro germplasm conservation of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 42(5):1247-1252.

Vázquez-Flota F., Miranda-Ham M.L., Monforte-González M., Gutiérrez-Carbajal M.G., Velázquez-García C., Nieto-Pelayo Y. 2007. "La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile". *Rev Fitotec Mex* 30: 353-360.

Zapata-Castillo P.Y., López Puc G., Canto-Flick A., Solís-Ruiz A., Barahona-Pérez F., Santana-Buzzy N. 2007. "Somatic embryogenesis in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) from cell suspensions". *HortScience* 42(2): 329-333.

2008

Borgez-Gómez L., González-Estrada T., Soria-Fregoso M. 2008. "Predicción de la demanda nutrimental de potasio para la producción de *Capsicum chinense* Jacq. en el sureste de México". *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 8: 69-80.

Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L.G., Balam-Uc E., Bello-Bello J., Lecona-Guzmán C., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., Gómez-Uc E., López-Puc G., Santana-Buzzy N. 2008. "Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) hottest known cultivars". *HortScience* 43(5): 1344-1349.

Medina-Lara F., Echevarría-Machado I., Pacheco-Arjona R., Ruiz-Lau N., Guzmán-Antonio A., Martínez-Estévez M. 2008. "Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and pungency in habanero pepper *Capsicum chinense* Jacq.". *HortScience* 43 (5): 1549-1554.

2009

Brito-Argáez L., Moguel-Salazar F., Zamudio F., González-Estrada T., Islas-Flores I. 2009. "Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity". *Asian J Biochem* 4(3): 77-87.

Santana-Buzzy N., López-Puc G., Canto-Flick A., Barredo-Pool F., Balam-Uc E., Avilés-Viñas S., Solís-Marroquín D., Lecona-Guzmán C., Bello-Bello J., Gómez-Uc E., Mijangos-Cortés J.O. 2009. "Ontogenesis of the somatic embryogenesis of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 44(1):113-118.

Solís-Ramos L.Y, González-Estrada T., Nahuath-Dzib S., Zapata-Rodríguez L.C., Castaño E. 2009. "Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis". *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96: 279-287.

2010

Arcos-Ortega G.F., Chan-Kuuk R., González Kantún W., Souza-Perera R., Nakazawa-Ueji Y., Avilés-Berzunza E., Godoy-Hernández G., Lawton M.A., Zúñiga-Aguilar J. 2010. "*Agrobacterium tumefaciens*-transient genetic transformation of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) leaf explants". *Electronic Journal of Biotechnology* 13(4). DOI:10.2225/vol13-issue4-fulltext-10.

Bello-Bello J.J., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Gómez-Uc E., Robert M.L., Iglesias-Andreu L.G., Santana-Buzzy N. 2010. "Improvement of *in vitro* proliferation and elongation of habanero pepper shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion". *HortScience* 45(7): 1093-1098.

Carballo-Bautista M.A., Moguel-Salazar F., Brito-Argáez L., Cristóbal-Alejo J., Islas-Flores I. 2010. "A brief morphological description of a small internal fruit grown in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) main fruit". *Rev. Fitotec. Mex.* 33(4): 281-285.

Gutiérrez-Carbajal M.G., Monforte-González M., Miranda-Ham M.L., Godoy-Hernández G., Vázquez-Flota F. 2010. "Induction of capsaicinoid synthesis in *Capsicum chinense* cell cultures by salicylic acid or methyl jasmonate". *Biol Plant* 54: 430-434.

Monforte-González M., Guzmán-Antonio A., Uuh-Chim F., Vázquez-Flota F. 2010. "Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.)". *J Sci Food Agric* 90: 764-768.

Mukul-López H., Ortiz-Vázquez E., Zúñiga-Aguilar J.J., Lizama-Uc G. 2010. "Treatment with chitosan protects habanero pepper against the infection with *Phytophthora capsici*". *Israel Journal of Plant Science* 58(1): 61-65.

Nakazawa-Ueji Y.E., Núñez-Pastrana R., Souza-Perera R., Santana-Buzzy N., Zúñiga-Aguilar J.J. 2010. "Mycelium homogenates from a virulent strain of *Phytophthora capsici* promote a defense-related response in cell suspensions from *Capsicum chinense* Jacq." *European Journal of Plant Pathology* 126: 403-415.

Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Minero-García Y., Torres-Tapia L., Peraza-Sánchez S., Martínez-Estévez M. 2010. "Capsaicinoids are absent in vegetative organs of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 45(2): 323-326.

Solís-Ramos L.Y, González-Estrada T., Andrade-Torres A., Godoy-Hernández G., Castaño de la Serna E. 2010. "Endogenous GUS-like activity in *Capsicum chinense* Jacq." *Electronic Journal of Biotechnology* 13 (4) DOI: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-3.

Solís-Ramos L.Y, Nahuath-Dzib S., Andrade-Torres A., Barredo-Pool F. González-Estrada T., Castaño de la Serna E. 2010. "Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis of *Capsicum chinense*". *Biologia* 65(3): 504-511.

2011

Altúzar-Molina A., Muñoz-Sánchez J.A., Vázquez-Flota F., Monforte-González M., Raccagni-DiPalma G., Hernández-Sotomayor S.M.T. 2011. "Phospholipidic signaling and vanillin production in response to salicylic acid and methyl jasmonate in *Capsicum chinense* J. Cells". *Plant Physiol Biochem* 49: 151-158.

Caamal-Chan M.G., Souza-Perera R., Zúñiga-Aguilar J.J. 2011. "Systemic induction of a *Capsicum chinense* nitrate reductase by the infection with *Phytophthora capsici* and defence phytohormones". *Plant Physiology and Biochemistry* 49(10): 1238-1243.

Celis-Aramburo T.J., Carrillo-Pech M., Castro-Concha L., Miranda-Ham M.L., Martínez-Estévez M., Echevarría-Machado I. 2011. "Exogenous nitrate induces root branching and inhibits primary root growth in *Capsicum chinense* Jacq.". *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 1456-1464.

Pacheco-Arjona J.R., Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Minero-García Y., Echevarría-Machado I., De los Santos-Briones C., Martínez-Estévez M. 2011. "Effects of ammonium nitrate, cesium chloride and tetraethylammonium on high-affinity potassium uptake in habanero pepper plantlets (*Capsicum chinense* Jacq.)". *African Journal of Biotechnology* 10 (62): 13418-13429.

Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Minero-García Y., Guzmán-Antonio A., Echevarría-Machado I., Martínez-Estévez M. 2011. "Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq.". *HortScience* 46 (3): 487-492.

Moguel-Salazar F., Brito-Argáez L., Díaz-Brito M., Islas-Flores I. 2011. "A review of a promising therapeutic and agronomical alternative: Antimicrobial peptides from *Capsicum* sp". *Afr. J. Biotechnol.* 10(86): 19918-19928.

Núñez-Pastrana R., Arcos-Ortega F., Souza-Perera R., Sánchez-Borges C., Nakasawa-Uejia Y., García-Villalobos F., Guzmán-Antonio A., Zúñiga Aguilar J. 2011. "Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a defence response against *Phytophthora capsici* in habanero pepper". *European Journal of Plant Pathology* 131(4): 669-683.

Solís-Marroquín D., Lecona-Guzmán C., Canto-Flick A., Bello-Bello J., Santana-Buzzy N. 2011. "In vitro selection of a salt tolerant embryogenic line in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *HortScience* 46(12):1666-1671.

2012

Avilés-Viñas S., Lecona-Guzmán C., Canto-Flick A., López Erosa E., Santana-Buzzy N. 2012. "Morpho-histological and ultrastructural study on direct somatic embryogenesis of *Capsicum chinense* Jacq. in liquid medium". *Plant Biotechnol Reporter* DOI 10.1007/s11816-012-0261-0.

Bojórquez-Quintal J.E., Echevarría-Machado I., Medina-Lara F., Martínez-Estévez M. 2012. "Plants challengers in a salinized world. The *Capsicum* case". *African Journal of Biotechnology* 11 (72): 13614-13626.

Garruña-Hernández R., Canto-Flick A., Mijangos-Cortés J.O., Islas-Flores I., Pinzón L., Orellana R. 2012. "Changes in flowering and fruiting of habanero pepper in response to higher temperature and CO₂". *Journal of Food and Environment* 10(3&4): 802-808.

Guzmán-Antonio A., Borges-Gómez L., Pinzón-López L., Ruiz-Sánchez E., Zúñiga-Aguilar J.J. 2012. "Efecto del ácido salicílico y la nutrición mineral sobre la calidad de plántulas de chile habanero". *Agronomía Mesoamericana* 23(2): 247-257.

Lecona-Guzmán C.A., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., De los Santos-Briones C., Santana-Buzzy N. 2012. "Changes in the protein profile of habanero pepper (*Capsicum chinense* J.) somatic embryos during development". *African Journal of Biotechnology* 11(47):10761-10768.

2013

Ballina-Gómez H., Ruiz-Sánchez E., Chan-Cupul W., Latournerie-Moreno L., Hernández-Alvarado L., Islas-Flores I., Zúñiga-Aguilar J.J. 2013. "Response of *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: *Aleyrodidae*) biotype B to genotypes of pepper *Capsicum annuum* L. (Solanales: *Solanaceae*)". *Neotropical Entomology* 42 (2): 205-210.

Domínguez-May A.V., Carrillo-Pech M., Barredo-Pool F., Martínez-Estévez M., Us-Camas R., Moreno-Valenzuela O., Echevarría-Machado I. 2013. "A novel effect for glycine on root system growth of habanero pepper". *Journal of American Society of Horticultural Science* 138 (6): 433-442.

Flores-Giubi M.E., Brito-Argáez L., García-Sosa K., Escalante-Erosa F., Islas-Flores I., Peña-Rodríguez L.M. 2013. "Optimization of culturing conditions of a strain of *Phytophthora capsici* pathogenic to habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *Journal of Phytopathology* 161: 807-813.

Garruña-Hernández R., Monforte-González M., Canto-Aguilar A., Vázquez-Flota F., Orellana R. 2013. "Enrichment of CO₂ atmosphere increases capsaicinoids content in habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.)". *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1385-1388.

2014

Bello-Bello J., Iglesias-Andreu L., Avilés-Viñas S., Gómez-Uc E., Canto-Flick A., Santana-Buzzy N. 2014. "Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers". *Hortscience* 49(4): 481-485.

Bojórquez-Quintal E., Velarde-Buendía A., Ku-González A., Carillo-Pech M., Ortega-Camacho D., Echevarría-Machado I., Martínez Estévez M. 2014. "Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): Proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation". *Front. Plant Sci.* 12 November 2014 | doi: 10.3389/fpls.2014.00605 (4.49 JCR).

Flores-Giubi M.E., Díaz-Brito M., Brito-Argáez L., García-Sosa K., Escalante-Erosa F., Peña-Rodríguez L.M., Islas-Flores I. 2014. "Purification of p47f, a necrosis inducing protein fraction from the secretome of *Phytophthora capsici*". *Journal of Phytopathology* 162: 788-800.

Zamudio-Moreno E., Echevarría-Machado I., Medina-Lara F., Calva-Calva G., Miranda-Ham L.M., Martínez-Estévez M. 2014. "Role of peroxidases in the degradation of capsaicinoids in habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) plants ground under watering deficit". *Australian Journal of Crop Science* 8 (3): 448-454.

2015

Aldana-luit J.G., Sauri-Duch E., Miranda-Ham M.L., Castro-Concha L., Cuevas-Glory L., Vázquez-Flota F. 2015. "Nitrate promotes capsaicin accumulation in *Capsicum chinense* immobilized placentas". *BioMedical Research International* DOI: 10.1155/2738/794084, ISSN: 2314-614.

Bello-Bello J.J., Canto-Flick A., Avilés-Viñas S., Valle-Gough R., Santana-Buzzy N. 2015. "In vitro selection of a PEG-tolerant somatic embryogenic line in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *Wulfenia Journal* 22 (7).

Latournerie-Moreno L., Ic-Caamal A., Ruiz-Sánchez E., Ballina-Gómez H., Islas-Flores I., Chan-Cupul W., González-Mendoza D. 2015. "Survival of *Bemisia tabaci* and activity of plant defense-related enzymes in genotypes of *Capsicum annum* L." *Chilean Journal of Agricultural Research* 75 (1): 71-77.

Valle-Gough R.E., Avilés-Viñas S., López-Erosa S., Canto-Flick A., Gómez-Uc E., Sáenz-Carbonell L., Ochoa-Alejo N., Santana-Buzzy N. 2015. "Polyamines and WOX genes in the recalcitrance to plant conversion of somatic embryos of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.)". *African Journal of Biotechnology* 14(7): 569-581.

2016

Bojórquez-Quintal E., Ruiz-Lau N., Velarde-Buendía A., Echevarría-Machado I., Potosin I., Martínez-Estévez M. 2016. "Natural variation in primary root growth and K⁺ retention in pepper roots under salt stress in habanero pepper". *Functional Plant Biology* 43 (12): 1114-1125.

Brito-Argáez L., Tamayo-Sansores J., Madera-Piña J., García-Villalobos D., Moo-Puc R.E., Kú-González A., Villanueva-Marco A., Islas-Flores I. 2016. "Biochemical characterization and immunolocalization studies of a *Capsicum chinense* Jacq. protein fraction containing DING proteins and anti-microbial activity". *Plant Physiology and Biochemistry* 109: 502-514.

Regla-Márquez C.F., Canto-Flick A., Avilés-Viñas S., Valle-Gough R., Pérez-Pastrana J., García-Villalobos F., Santana-Buzzy N. 2016. "Cadaverine: a common polyamine in zygotic embryos and somatic embryos of the species *Capsicum chinense* Jacq." *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 124: 253-264.

Ruiz-Lau N., Bojórquez-Quintal E., Benito B., Echevarría-Machado I., Sánchez-Cach L.A., Medina-Lara F., Martínez-Estévez M. 2016. "Molecular cloning and functional analysis of a Na⁺-insensitive K⁺ transporter of *Capsicum chinense* Jacq". *Frontiers in Plant Science* 7. JCR. 4.49 doi:10.3389/fpls.201.019800.

Sánchez-Borges C.A., Souza-Perera R., Zúñiga-Aguilar J.J., Shrestha S., Lamour K. 2016. "First report of *Phytophthora capsici* causing damping-off of *Capsicum chinense* Jacq. in the Yucatan Peninsula". *Plant Disease* 100(6): 1247.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Álvarez-Gil M. 2016. "Mayan Kisin, a high-yielding, red-fruited, habanero-type hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivar". *HortScience* 51(5):1-2.

2017

Guillen-Chablé F., Arenas-Sosa I., Islas-Flores I., Corzo G., Martínez-Liu C., Estrada G. 2017. "Antibacterial activity and phospholipid recognition of recombinant defensin J1.1 from *Capsicum* genus". *Prot. Expr. Purif.* 13: 45-41.

Vázquez-Flota F., Monforte-González M., Miranda-Ham M.L., Castro-Concha L. 2017. "Transformation of ferulic acid and vanillin by isolated placentas of *Capsicum chinense* and *Capsicum annum*". *Journal of the Mexican Chemical Society* 61: 54-59.

Torres-Calzada C., Tapia-Tussell R., Higuera-Ciapara I., Huchin-Poot E., Martin-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., Pérez-Brito D. 2017. "Characterization of *Colletotrichum truncatum* from papaya, pepper and physic nut based on phylogeny, morphology and pathogenicity". *Plant Pathology* Doi: 10.1111/ppa.12800.

1.2 Libros

De la Cruz-Castillo C., Zúñiga-Aguilar J.J. (Comp.). 2015. *Manual de producción en invernadero de plántulas certificadas de chile habanero de la Península de Yucatán*. Mérida-México. ISBN 978-607-7823-31-5.

González-Estrada T.A. (Edit.). 2015. *Estudio estratégico de los mercados de chile habanero de la Península de Yucatán: mercado nacional en fresco*. Mérida-México. ISBN 978-607-8424-07-8.

_____ 2015. *Estudio estratégico de los mercados de chile habanero de la Península de Yucatán: mercado estadounidense*. Mérida-México. ISBN 978-607-8424-06-1.

_____ 2015. *Estudio estratégico de los mercados de chile habanero de la Península de Yucatán: mercado nacional procesado*. Mérida-México. ISBN 978-607-8424-09-2.

_____ 2015. *Estudio estratégico de los mercados de chile habanero de la Península de Yucatán: mercado europeo*. Mérida-México. ISBN 978-607-8424-15-3.

1.3 Capítulos de libro

2005

Islas-Flores I., González-Estrada T., Villanueva M.A. 2005. "The capsaicin just as hot as hell". In: Pandalai S.G. *Recent Res. Devel. Biochem.* 6 (2005): 121-132. Research Signpost. Kerala, India. ISBN 978-81-7736-297-6.

2010

Brito-Argáez L., Canché-Fuentes R., Carballo-Bautista M., Cristóbal-Alejo J., Zúñiga-Aguilar J.J., Islas-Flores I. 2010. "Pathogenesis related proteins in pathogen-challenged plants: chitinase and β -1,3-glucanase activities in the *Capsicum chinense-Phytophthora capsici* interaction". In: *Recent Research Advances in Plant Science*. Martínez-Estévez M. (ed): 57-76 pp. Transworld Research Network, Trivandrum-695 023, Kerala, India. ISBN: 978-81-7895-476-9.

González T., Casanova C., Gutiérrez L., Torres L., Contreras F., Peraza S. 2010. "Los chiles cultivados en Yucatán". In: Durán R. y Méndez M. (Eds). *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. CICY, PPD-FMAM, Conabio, Seduma. Mérida-México. ISBN 978-607-7823-05-6.

Mijangos-Cortés J., Santana-Buzzy N., Latournerie-Moreno L. 2010. "Los recursos genéticos vegetales *in vitro*: una alternativa de conservación". In: Durán R. y Méndez M. (Eds). *Biodiversidad y desarrollo humano en Yucatán*. CICY, PPD-FMAM, Conabio, Seduma. Mérida-México. ISBN 978-607-7823-05-6.

Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Echevarría-Machado I., Martínez-Estévez M. 2010. "Capsaicinoid synthesis in the habanero pepper under conditions of abiotic stress". *Recent Research Advances in Plant Science*. 2010: 1-18 ISBN: 978-81-7895-476-9.

Santana N. 2010. "Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". In: Del Castillo-Mora L., Robert-Díaz M.L., Larqué-Saavedra A., Higuera-Ciapára I. (Eds): *Treinta años de labor científica y educativa*: 269-277. Mérida-México.

2012

Santana-Buzzy N., Bello-Bello J.J., Iglesias-Andreu N., Zúñiga-Aguilar J.J., Canto-Flick A., Avilés-Viñas S., Lecona-Guzmán C., Solís-Marroquín D., Gómez-Uc E., Balam-Uc E., Arcos-Ortega G., Mijangos-Cortés J. 2012. "Tissue culture of *Capsicum* species (Chapter V)". In: Russo V.M. (Edit.) *Peppers: Botany, Production and uses*. Editorial CABI: 72-87. ISBN-13:987-1-84593-767-6.

Santana-Buzzy N., Lecona-Guzmán C., Bello-Bello J., Avilés-Viñas S., Solís-Marroquín D., Gómez-Uc E., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Marín-Collí E., López-Erosa S., Valle-Gough R., Pereira-Patrón A. 2012. "Avances y perspectivas de la biotecnología en el mejoramiento genético de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán". In: Dumonteil E. (Ed.). *Contribución de la biotecnología al desarrollo de la Península de Yucatán*: 392-406.

Vázquez-Flota F., Guzmán-Antonio A., Miranda-Ham M.L., Monforte-González M., Castro-Concha L. 2012. "Mineral composition of habanero pepper pods (*Capsicum chinense* Jacq.) from plants hydroponically cultured on different doses of nitrogen and potassium". In: Salazar M.A., Ortega J.M. *Peppers: Nutrition, Consumption and Health*, Nova Science Publishers, New York: 145-158. ISBN 978-61942-085-4.

2017

Vázquez-Flota F.A., Miranda-Ham M.L. 2017. "Induction of specialized metabolism in *in vitro* cultures of *Capsicum chinense* Jacq.". In: Loyola-Vargas V.M., Ochoa-Alejo N. (Ed). *Plant Cell Culture Protocols*, 4th edition. The Humana Press/Springer, New York. Aceptado.

1.4 Memorias en extenso**2003**

Montalvo-Peniche M.C., Canto-Flick A., Nahuat-Dzib S., Pérez-Brito D., Santana-Buzzy N. 2003. "Estudios para el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y su caracterización molecular". *Memorias del V Taller Internacional sobre Recursos Fitogenéticos*, FITOGEN 2003, Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Sancti Spiritus, Cuba, 2 al 4 de diciembre de 2003. p.26-27.

2005

González T., Gutiérrez L., Contreras F., Peraza S., Xool E., Trujillo J. 2005. "Desarrollo de homocigosis para el contenido de capsaicina mediante la selección de líneas clonales de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". *II Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. 20-22 enero de 2005, Mérida, Yucatán.

Martín-Mex R., López-Gutiérrez R., Medina-Arceo J.L., Cruz-Campos J., Nexticapan-Garcéz A., González-Rodríguez F., Larqué-Saavedra A. 2005. "Evaluación del efecto del ácido salicílico en el rendimiento de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". *II Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. Fundación Produce Yucatán A.C. 20-22 enero de 2005. Mérida, Yucatán. pp. 284-286.

2006

Carballo B., Contreras F., Islas-Flores I. 2006. "Detección de actividad enzimática de las b-1,3-glucanasa en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*)". *III Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. 19-21 enero de 2006. Mérida, Yucatán.

González T., Espadas G., Villanueva L., Gutiérrez L., Contreras F. 2006. "Análisis de la morfología del fruto de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de Yucatán". *III Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria Forestal y Pesca*. 19-21 enero de 2006. Mérida, Yucatán.

Martín-Mex R., Nexticapán-Garcéz A., May-Pat J., Baak-Polanco A., Larqué-Saavedra A. 2006. "Efecto de salicilatos en chile habanero en invernadero". *III Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. Fundación Produce Yucatán A.C. 19-21 enero de 2006. Mérida, Yucatán. pp. 263-264.

Moguel-Salazar F., Quijano-Ramayo A., Islas-Flores I. 2006. "Búsqueda de péptidos con actividad inhibitoria del crecimiento de los patógenos de chile habanero *Xanthomonas campestris* y *Phytophthora capsici*". *III Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. 19-21 enero de 2006. Mérida, Yucatán.

2007

Avilés-Baeza W.I., Buzzy-Santana N., Islas-Flores I., Rodríguez-Buenfil I.M., Sauri-Duch E., Ramírez-Jaramillo G., Dzib-Echeverría R., Moguel-Ordóñez Y. 2007. "Tendencias de la investigación realizada en México sobre el cultivo de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". *IV Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. 20-24 enero de 2007. Mérida, Yucatán.

Brito-Argáez L., Moguel-Salazar F., Islas-Flores I. 2007. "Purificación parcial de una defensina de *Capsicum chinense*". *IV Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. 20-24 enero de 2007. Mérida, Yucatán.

_____ 2007. "Producción de péptidos antimicrobianos: una estrategia de diversificación para el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". *II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero*. Octubre de 2007.

Carballo-Bautista M.A., Brito-Argáez L., Cristóbal-Alejo J., Contreras-Martín F., Islas-Flores I. 2007. "Avances en la búsqueda de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), con tolerancia al ataque de *Phytophthora capsici*". *II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero*. Octubre de 2007.

_____ 2007. "Efecto de *Phytophthora capsici* sobre plantas de *Capsicum chinense* seleccionadas por su elevada actividad de β -1,3-glucanasa". *IV Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. Fundación Produce Yucatán, 20-24 enero de 2007. Mérida, Yucatán.

Casanova C., Gutiérrez L., Torres L., Contreras F., Peraza S., González T. 2007. "Caracterización morfológica y cuantificación de capsaicinoides de los chiles cultivados en Yucatán, México". *IV Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria Forestal y Pesca*. 20-24 enero de 2007. Mérida, Yucatán.

Flores-Giubi M.E., Brito-Argáez L., García-Sosa K., Contreras-Martín F., Peña-Rodríguez L.M., Islas-Flores I. 2007. "Optimización de las condiciones de cultivo de *Phytophthora capsici* para la producción de metabolitos con actividad fitotóxica sobre chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". *II Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero*. Octubre de 2007.

Gutiérrez-Carbajal M.G., Velázquez-García C., Nieto-Pelayo Y., Monforte-González M., Guzmán-Antonio A., Medina-Lara F., Vázquez-Flota F. 2007. "Estudio de la biosíntesis de capsaicina en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". *IV Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. 20-24 enero de 2007. Mérida, Yucatán.

Monforte-González M., Guzmán-Antonio A., Velázquez-García C., Aladana-luit J., Gutiérrez-Carvajal M.G., Uuh-Chim F., González-Rodríguez F., Vázquez-Flota F. 2007. "Estudios sobre la síntesis de capsaicina en chile habanero". *Segundo Seminario de Investigación Científica y Tecnológica del Chile Habanero*. Octubre de 2007, Mérida Yucatán.

Nexticapan-Garcés C., Guzmán-Arcos C.N., Tun-Aké F., Barahona-Pérez, Martín-Mex M., Barroso-Castro J., Larqué-Saavedra A. 2007. "Tratamientos de ácido salicílico afectan la calidad de poscosecha de frutos de chile habanero". *Fourth World Pepper Convention*. 15-17 de julio de 2007. Querétaro, Qro., México. pp. 167-169.

2008

Ramírez G., Avilés W., Dzib R., Góngora E., Pérez L.A., Chel L., González T., Islas I., Santana N., Magaña M., Cristóbal M., Pereyra G., Tun J., Leyva C., Escalante E., Rodríguez I., Sauri E., Muñoz C., Ledón J.C., Castillo J. 2008. "Estudio estratégico de la cadena agroindustrial: chile habanero". *V Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca 2008 y II Semana Estatal de Innovación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. Mérida, Yucatán.

Martín-Mex R., Nexticapan-Garcés A., Canché-Kuyoc J.C., Cocom-Uc S., Itzincab-Sánchez R.M., Larqué-Saavedra A. 2008. "Manejo integrado de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) y picudo (*Anthonomus eugenii* Cano) en chile habanero en Tizimín, Yucatán". *V Reunión Estatal de Investigación Agropecuaria, Forestal y Pesca*. Fundación Produce Yucatán A.C. 21-22 enero de 2008. Mérida, Yucatán.

2009

Martín-Mex R., Nexticapan-Garcés A., Larqué-Saavedra A. 2009. "Manejo de plagas en chile habanero en campo abierto en Campeche, México". *Sixth World Pepper Convention*. 25-27 octubre de 2009. Mérida, Yucatán, México. pp. 128-133.

2014

Islas-Flores I., Brito-Argáez L., Díaz-Brito M., Chuc-Uc J., Peña-Rodríguez L.M. 2014. "Una breve mirada a la vida fitopatogena de *Mycosphaerella fijiensis* y *Phytophthora capsici*, patógenos respectivos de banano y chile". *III Simposio Nacional de Herramientas de Biotecnología para una Agricultura Sustentable*. 23- 26 septiembre de 2014. Zacatecas, Zacatecas, México. 55-61 pp.

1.5 Publicaciones de divulgación**2005**

Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., González-Rodríguez F., Larqué-Saavedra A. 2005. "Incremento de la productividad de chile habanero por salicilatos". *Uuy u T'aan* 1 (1): 11-12.

2006

González T. 2006. "Habanero growing systems". *Fiery Foods and Barbeque* 42: 21-23.

González T., Gutiérrez L., Contreras F. 2006. "El chile habanero de Yucatán". *Ciencia y Desarrollo* 32 (195): 8-15.

González T., Islas I., Santana N., Vázquez F. 2006. "La investigación sobre chile habanero en Yucatán". *Revista Juvenil Kanik* Núm. 5. <http://www.cienciaytecnologia.yucatan.gob.mx/noticias/contenido.php>

Medina-Lara F., Monforte-González M., Guzmán-Antonio A., Vázquez-Flota F. 2006. "Acumulación de capsaicina, el principio pungente del chile, en chile habanero". *Uuy u T'aan* 2: 8-9.

2007

González T. 2007. "L'Habanero dello Yucatan". *Pic Mondo Peperoncino* 5: 18-23.

Medina-Lara F., Ruiz-Lau N., Martínez-Estévez M. 2007. "Importancia de determinar la distribución de nutrientes en chile habanero". *Uuy u T'aan* 3 (1).

2008

Vázquez-Flota F., Miranda-Ham M.L., Vázquez-Miranda S. 2008. "¿Por qué pican los chiles?". *Helix*, Suplemento para Niños, *Revista Ciencia y Desarrollo*, 34: S/P. Agosto 2008.

Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., Larqué-Saavedra A. 2008. "El picudo del chile, lo que se necesita saber acerca de su biología y control". *Uuy u T'aan* 4 (1): 3-5.

2009

Islas-Flores I., Brito-Argáez L., Moguel-Salazar F., González-Estrada T. 2009. "Diversificación en los usos del chile habanero como alternativa para incrementar su valor agregado: el caso de los compuestos antimicrobianos de origen natural". *OEIDRUS-Yucatán*: 3-4.

Martín-Mex R., Larqué-Saavedra A. 2009. "Mosca blanca: Control químico". *Desafío (Fundación Produce Yucatán)* 1 (6): 34-35.

Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., Larqué-Saavedra A. 2009. "Manejo integrado de plagas en chile habanero en Yucatán, México". *De Riego* 7(46): 6-9.

Santana N., Echevarría I., Vázquez F., Islas I., Martínez M., Zúñiga Aguilar J.J. 2009. "El chile habanero de Yucatán: ciencia y denominación de origen". *Ciencia Conocimiento y Tecnología* 89: 76-79.

2011

Martín-Mex R., Nexticapan-Garcéz A., Larqué-Saavedra A. 2011. "Las 3 principales plagas del chile habanero". *De Riego* 10 (59): 56-61.

Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Martínez-Estévez M. 2011. "El chile habanero: el estrés abiótico y su relación con los capsaicinoides". *Revista Ciencia* 62 (3): 70-77.

2013

Martín-Mex R. 2013. "Picudo del chile ¡Una plaga de cuidado!". *Cultivare* 1 (1): 10-13.

2. Formación de Recursos Humanos

2.1. Tesis de Doctorado

2006

Borges Gómez, Lizette del Carmen. 2006. "Predicción de la absorción de potasio por las raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2007

Montalvo Peniche, María del Carmen. 2007. "Conservación *in vitro* y caracterización molecular del germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la Península de Yucatán". Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2008

López Puc, Guadalupe. 2008. "Inducción y caracterización de la embriogénesis somática *in vitro* del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Moguel Salazar, Fernando Feder. 2008. "Bioprospección de proteínas de *Capsicum chinense* con actividad antimicrobiana sobre *Xanthomonas campestris* y *Phytophthora capsici*". Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2009

Nakazawa Ueji, Yumi Elena. 2009. "Efecto de homogeneizados fúngicos sobre la vía de transducción de señales mediada por MAPK en células en suspensión de *Capsicum chinense* Jacq.". Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Solís Ramos, Laura Yesenia. 2009. "Transformación genética de *Capsicum chinense* Jacq. mediante *Agrobacterium tumefaciens*". Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2010

Aguilar Sánchez, Nelly Cristina. 2010. "Estudio sobre el papel del estrés oxidativo durante la interacción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y el PEPGMV". Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.

Bello Bello, Jericó Jabin. 2010. "Estudio sobre la variación somaclonal en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y su aplicación en la obtención de líneas tolerantes al estrés hídrico". Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Gómez Uc, Eunice. 2010. "Estudio de la expresión génica diferencial durante el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. en presencia de etileno". Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2011

Caamal Chan, María Goretty. 2011. "Identificación de genes de *Capsicum chinense* asociados con la tolerancia contra *Phytophthora capsici*". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Celis Arámbulo, Teresita de Jesús. 2011. "Efecto de la distribución heterogénea de nitrato sobre el sistema radicular de *Capsicum chinense* Jacq.". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Núñez Pastrana, Rosalía. 2011. "Papel del etileno en la expresión génica de *Capsicum chinense* durante la interacción planta-patógeno". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Solís Marroquín, Daniela. 2011. "Efecto del cloruro de sodio (NaCl) sobre el comportamiento de los embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2012

Avilés Viñas, Susana Alejandra. 2012. "Estudios morfológicos y moleculares durante la histogénesis de los embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en presencia de 2,4-D". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Garruña Hernández, René. 2012. "Efecto del aumento de temperatura y CO₂ como consecuencia del cambio climático sobre *Capsicum chinense* Jacq.". Doctorado en Ciencias Biológicas (Recursos Naturales), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Lecona Guzmán, Carlos Alberto. 2012. "Estudio de las proteínas en embriogénesis somática chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Ruiz Lau, Nancy. 2012. "Clonación y caracterización funcional de un transportador de potasio de alta afinidad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2013

Domínguez May, Ángel Virgilio. 2013. "Efecto de la glicina y el glutamato sobre el crecimiento radicular de *Capsicum chinense*". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Escalante, Wendy del Rosario. 2013. "Estudios sobre la regulación de las enzimas del metabolito primario del nitrógeno en placentas de chile habanero". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Santiago Antonio, Gladys. 2013. "Comportamiento de dos variedades de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) durante un periodo de déficit de nitrógeno". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Zamudio Moreno, Enid. 2013. "Estudio del estrés hídrico sobre el metabolismo de capsaicinoides en frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2014

Rodas Junco, Beatriz Adriana. 2014. "Estudio de la señalización fosfolipídica en la regulación de la producción de vainillina estimulada por el ácido salicílico en suspensiones celulares de *C. chinense* Jacq.". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2015

Aldana luit, Jeanny Guadalupe. 2015. "La influencia de la composición del medio de cultivo en la biosíntesis de capsaicinoides en placentas inmovilizadas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología, Instituto Tecnológico de Mérida, codirección con el Dr. Enrique Sauri Duch.

Baas Espínola, Fray Martín. 2015. "Estudio de la relación entre la síntesis de valina y fenilalanina y la síntesis de capsaicinoides en tejido placentario de *Capsicum chinense* Jacq.". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Bojórquez Quintal, Jesús Emanuel de Atocha. 2015. "Mecanismos de tolerancia a salinidad en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Valle Gough, Raúl Enrique. 2015. "Análisis de la expresión de genes tipo WOX en la embriogénesis de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2016

Madera Piña, D. de J. 2016. "Inmunodetección de la proteína DING en diferentes estadios de semillas y hojas de chile habanero *Capsicum chinense* Jacq.". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2017

Regla Márquez, Carlos Fernando. 2017. "Análisis de la expresión de genes involucrados en la formación y desarrollo del meristemo caulinar en embriones cigóticos y somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2.2 Tesis de Maestría

2005

Zapata Castillo, Patricia Yolanda. 2005. "Estudio sobre la morfogénesis *in vitro* del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2006

Gutiérrez Carbajal, María Guadalupe. 2006. "Estudios sobre la síntesis de capsaicina en cultivos *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Solís Ruiz, Anabel. 2006. "Estudio del efecto de diferentes factores sobre la inducción de brotes múltiples en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) *in vitro*". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Zapata Castillo, Patricia Yolanda. 2006. "Estudio sobre la morfogénesis *in vitro* del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.

2007

Avilés Viñas, Susana Alejandra. 2007. "Papel del etileno durante la embriogénesis somática de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Becerril Chi, Karen. 2007. "Caracterización de la expresión del gen CcPR10 en *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Bello Bello, Jericó Jabín. 2007. "Regeneración *in vitro* de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de cultivo. Efecto del paclobutrazol y el sistema de inmersión temporal (SIT)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Canto Flick, Adriana. 2007. "Caracterización morfológica y determinación de los niveles de capsaicina en 18 accesiones de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Maldonado Borges, Josefina Inés. 2007. "Filogenia molecular en *Capsicum*". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2008

Altúzar Molina, Alma Rosa. 2008. "Efecto del ácido salicílico y del jasmonato de metilo en la vía de transducción de señales a través de fosfolípidos en células en suspensión de *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Ayil Gutiérrez, Benjamín Abraham. 2008. "Estudio del mecanismo de acción de las poliaminas en la embriogénesis somática en *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.

Flores Giubi, María Eugenia. 2008. "Evaluación de la actividad fitotóxica de *Phytophthora capsici* sobre chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Lecona Guzmán, Carlos Alberto. 2008. "Estudio de las proteínas en embriones cigóticos y embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Ruiz Lau, Nancy. 2008. "Efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo de capsaicinoides en frutos y órganos vegetativos en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Solís Marroquín, Daniela. 2008. "Variabilidad bioquímica y molecular de 5 accesiones promisorias de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2009

Ancona Escalante, Wendy del Rosario. 2009. "Estudio de las enzimas relacionadas con el metabolismo primario del nitrógeno en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Guzmán Antonio, Adolfo Alberto. 2009. "Efecto del ácido salicílico en la nutrición mineral en plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias en Horticultura Tropical, Instituto Tecnológico de Conkal.

Pacheco Arjona, José Ramón. 2009. "Niveles de expresión de un transportador de alta afinidad permeable a potasio tipo HAK, en raíces de plántulas de chile habanero *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.

2011

Baas Espínola, Fray Martín. 2011. "Estudio de las enzimas involucradas en la asimilación de amonio bajo condiciones de inducción y diferentes contenidos de nitrógeno en placentas inmovilizadas *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias Biológicas (opción Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Medina Lara, María de Fátima. 2011. "Crecimiento radicular de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) sometidas a estrés por aluminio". Maestría en Ciencias Biológicas (opción Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Palacios Medel, Ernesto. 2011. "Caracterización del efecto quimiotrópico del glutamato en raíces de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (opción Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Regla Márquez, Carlos Fernando. 2011. "Estudio de las poliaminas durante el proceso de embriogénesis somática de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (opción Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Roca Mézquita, Carolina. 2011. "Efecto de la fuente nitrogenada y de inductores sobre la actividad de las enzimas nitrito y nitrato reductasas en placentas de *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias Biológicas (opción Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Torres Calzada, Claudia Guadalupe. 2011. "Desarrollo de indicadores específicos para la detección por PCR de *Colletotrichum capsici*". Maestría en Ciencias Biológicas (Opción Biotecnología), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2012

Cuxim Huchim, Ricardo. 2012. "Cambios en la fosforilación de proteínas en respuesta a la exposición del sistema radical de *Capsicum chinense* Jacq. a nitrato". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Lizama Gasca, Marta Guadalupe. 2012. "Caracterización a nivel molecular de un transportador de NO₃-de alta afinidad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) y obtención de un vector de silenciamiento para su estudio funcional". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

López Erosa, Stephanie. 2012. "Efecto de poliamidas exógenas en la embriogénesis somática de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Marín Colli, Emily Elizabeth. 2012. "Embriogénesis somática del género *Capsicum*: validación de un protocolo de regeneración *in vitro* en *Capsicum annum*". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2013

Herrera Díaz, Refugio Guadalupe. 2013. "Estudios moleculares sobre la diversidad genética de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la Península de Yucatán". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Jiménez Guillén, Doribet. 2013. "Caracterización del gen SERK1 de *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Pérez Brito, Daisy. 2013. "Estudios moleculares sobre la diversidad genética de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la Península de Yucatán". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Pereira Patrón, Alejandrina. 2013. "Estudio de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de carotenoides en dos morfotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Pérez Pastrana, Jacobo. 2013. "Efecto de las auxinas durante la inducción e histodiferenciación de la embriogénesis somática de *Capsicum* spp.". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2014

Aguilar Caamal, L. F. 2014. "Papel de la prolina y la glicina betaína en plantas de chile habanero sometidas a estrés hídrico". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Cámara Tzakún, Fanny Beatriz. 2014. "Efecto del nitrato sobre el tráfico vesicular en el ápice radicular de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Serralta Interian, Angélica Anahi. 2014. "Estudio del efecto de los D-aminoácidos sobre el crecimiento de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Zubieta Sánchez, Karime. 2014. "Efecto de la asparagina, glutamina y espermina sobre el desarrollo de embriones somáticos de chile habanero". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2015

Osorio Montalvo, Pedro Manuel. 2015. "Análisis de la expresión de los genes PIN1, PIN4, Y PIN7 durante la embriogénesis de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Puc Chan, Mario Manuel. 2015. "Selección de fuentes parentales para el mejoramiento de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2016

Gómez Aguilar, Luis Maximino. 2016. "Establecimiento de un protocolo para la inducción de la androgénesis en *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Góngora Espínola, José David. 2016. "Análisis de la expresión de genes involucrados en síntesis de valina, fenilalanina y capsaicinoides en placentas de chile habanero durante el desarrollo del fruto y ante diferentes suministros de fertilización nitrogenada". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Madera Piña, Dianeli de Jesús. 2016. "Inmunodetección de la proteína DING en diferentes estadios de semillas y hojas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Pérez Balam, Jesica Valeria. 2016. "Aplicación de ácido salicílico en el crecimiento, floración y acumulación de capsaicinoides en *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Sánchez Borges, Carlos Alberto. 2016. "Evaluación de la presencia de *Phytophthora capsici* en la pudrición de la raíz del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivado en la Península de Yucatán". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Tamayo Sansores, José Aarón. 2016. "Evaluación *in vitro* del efecto de la fracción G10P1.7.57 y la proteína DING de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) sobre el crecimiento de líneas tumorales". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2017

Garnica Torres, Luis. 2017. "Establecimiento de una metodología para la obtención de raíces transformadas de *Capsicum chinense* Jacq. con el transportador CCHAK1". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Guillén Chablé, Francisco. 2017. "Obtención y caracterización funcional de la defen-sina recombinante J1-1 de *Capsicum chinense* Jacq.". Maestría en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular), Centro de Investigación Científica de Yucatán.

2.3 Tesis de Licenciatura

2003

Cisneros Pineda, Olga Guadalupe. 2003. "Cuantificación de capsaicina en chiles ori-ginarios del estado de Yucatán (*Capsicum annum* y *Capsicum chinense* Jacq.) mediante la comparación de dos métodos: cromatografía de capa fina y cromatografía de gases". Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán, México.

López Gutiérrez, Raymundo. 2003. "Reguladores del crecimiento XVIII: el efecto del ácido salicílico en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniero Agrónomo. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 19. Tizimín, Yucatán, México.

Medina Arceo, Juan Luis. 2003. "Reguladores del crecimiento XIX: el efecto del dimetil-sulfóxido en la productividad del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniero Agrónomo. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 19. Tizimín, Yucatán, México.

Saldívar Collí, Amílcar de la Cruz. 2003. "Efecto de la BAP sobre la formación de brotes en diferentes genotipos de chile habanero *C. chinense*". Instituto Tecnológico de Mérida.

2004

Cerón-Viera, Héctor. 2004. "Optimización de condiciones para enraizar esquejes de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniero Agrónomo. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2 Conkal, Yucatán.

Beitia y Páez, Hennesie Janeth. 2004. "Estudio preliminar sobre la caracterización morfológica de una colección de chile habanero (*C. chinense* Jacq.)". Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2, Conkal, Yucatán.

2005

Arcos Arcos, Patricia. 2005. "Estudio de poblaciones de *Bemisia tabaci* Genn. (Hemíptera: Aleyrodidae) en maleza asociadas al cultivo de *Capsicum chinense* Jacq.". Ingeniero en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Castillo López, María Romualda. 2005. "Evaluación de la respuesta androgénica del cultivo de anteras de *Capsicum* spp, en un medio de doble fase". Ingeniero en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Espadas Villamil, G. 2005. "Análisis de las características morfológicas del fruto del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) cv. naranja". Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2 Conkal, Yucatán. Mención especial.

May Pat, Ariel Jorge. 2005. "Reguladores del crecimiento XXVII: Efecto del ácido salicílico en la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en invernadero". Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México.

Velázquez García, Cinthya. 2005. "Respuestas bioquímicas a la exposición al ácido salicílico en cultivos celulares de *Capsicum chinense* Jacq.". Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

2006

Barroso Castro, Juliet Alejandra. 2006. "Reguladores del crecimiento XXVI: Crecimiento de la raíz en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) por el efecto de salicilatos". Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Bastarrachea López, Luis Ariel. 2006. "Identificación parcial de Begomovirus presentes en *Bemisia tabaci* Genn., en agroecosistemas de Yucatán". Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Canché Chay, Cristina Isabel. 2006. "Efectos de inductores de la capsaicina en las vías de transducción de fosfoinosítidos en las suspensiones celulares de *Capsicum chinense* Jacq.". Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

Couoh Uicab, Yeny Lizzet. 2006. "Purificación de una proteína con actividad de β -1,3-glucanasa en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. expuestas a homogenados de paredes celulares de *Phytophthora capsici* Leo". Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

González Escalante, Ana Grysel. 2006. "Establecimiento de las condiciones de crecimiento mínimo para la conservación *in vitro* de germoplasma de chile habanero (*C. chinense* Jacq.)". Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

Nieto Pelayo, Yuriana de la Luz. 2006. "Inducción de la síntesis de capsaicinoides en cultivos de células en suspensión de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán.

Villanueva Pat, Lenyn. 2006. "Establecimiento de metodologías de extracción y cuantificación de capsaicina en frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán.

2007

Acosta Baquedano, Omar Antonio. 2007. "Análisis de la expresión del gen ccPR-10 en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yucatán.

Baak Polanco, Adrián. 2007. "Reguladores del crecimiento XXV: Efecto de ácido salicílico en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en suelos pedregosos de Yucatán". Instituto Tecnológico Agropecuario >Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Canul Pech, Doris Marissa. 2007. "Evaluación de dos generaciones de semilla derivada de una línea clonal de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad naranja". Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Perera Ríos, Lyndia Cristina. 2007. "Evaluación de una población de semilla de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) derivada de una línea clonal con tolerancia a virosis". Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario Núm. 2. Conkal, Yucatán.

Gómez Valencia, Juan Francisco. 2007. "Optimización de un protocolo de embriogénesis somática para chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Licenciatura. Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico de Acayucan, Veracruz.

Tzec Madero, Wendy Janet. 2007. "Efecto de una fuente nitrogenada orgánica sobre el sistema radicular de chile habanero". Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Campeche. Campeche.

Tzeek Huchim, Addy Alicia. 2007. "Manejo de plagas y enfermedades de chile habanero en Calkiní, Campeche". Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche.

2008

Bautista Castellanos, Lisette 2008. "Establecimiento de las condiciones de crecimiento mínimo para la conservación *in vitro* de chile habanero (*C. chinense* Jacq.)". Universidad Veracruzana.

Tucuch Haas, Cesar Jacier. 2008. "Manejo integrado de plagas y enfermedades en chile pimiento (*Capsicum annum* L.) bajo invernadero en Timucuy Yucatán". Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán.

2009

Baas Espínola, Fray Martín. 2009. "Cuantificación de la enzima nitrato reductasa en placentas inmovilizadas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Químico Biólogo Bromatólogo, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

Canché Fuentes, Víctor René. 2009. "Evaluación de las actividades enzimáticas de β -1,3-glucanasa y quitinasa en plántulas F2 de *Capsicum chinense* Jacq. inoculadas con *Phytophthora capsici*". Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

Díaz Brito, Mayra Alejandra. 2009. "Generación de anticuerpos policlonales contra la fracción G10P1.7.57, un péptido antimicrobiano aislado de semillas de *Capsicum chinense*". Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

Marín Collí, Emily Elizabeth. 2009. "Estudio bioquímico relacionado con el desarrollo de la embriogénesis somática del chile habanero". Instituto Tecnológico de Mérida.

Martínez Sánchez, Heidy Guadalupe. 2009. "Patrones proteicos extracelulares en cultivos hidropónicos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo condiciones de inducción". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, Veracruz.

Palacios Medel, Ernesto. 2009. "Efecto quimotrópico del glutamato en la raíz de chile habanero". Ingeniero Bioquímico. Instituto Tecnológico de Mérida.

Roca Mézquita, Carolina. 2009. "Estudio de la enzima nitrito reductasa en un cultivo *in vitro* de placentas inmovilizadas de *Capsicum chinense* Jacq.". Químico Biólogo Bromatólogo, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

2010

Canché Chuc, Ismael. 2010. "Determinación de antioxidantes en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniería en Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche.

Cuxim-Huchim, Ricardo. 2010. "Caracterización bioquímica del efecto del nitrato sobre el sistema radicular de *Capsicum chinense* Jacq.". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Jiménez Guillén, Doribet. 2010. "Identificación del ADNc del gen SERK de *Capsicum chinense* Jacq. como herramienta para el aislamiento del extremo 3' del gen". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Los Ríos. Tabasco.

Marfil Santana, David Miguel. 2010. "Modificaciones en la expresión génica en plantas de chile habanero sometidas a estreses bióticos y abióticos". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mérida.

2011

Cocom Chan, Nayeli. 2011. "Análisis histológico de la infección de la planta de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con el oomiceto *Phytophthora capsici*". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Couoh Nic, José Abraham. 2011. "Estudio de la corismato mutasa en placentas de *Capsicum chinense* Jacq.". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

González Alamilla, Rosalinda. 2011. "La expresión del gen SERK en diferentes órganos de la planta de chile habanero". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Los Ríos, Tabasco.

Lozano Pech, Gretel Carolina. 2011. "Comportamiento del contenido de prolina en embriones somáticos de chile habanero a estrés salino". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mérida.

Zubieta Sánchez, Karime. 2011. "Determinación de la viabilidad de la semilla de veinte variedades de chile habanero". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mérida.

2012

Cab Guillén, Yahaira Aracely. 2012. "Efecto del ácido salicílico en suspensiones celulares de *Coffea arabica* y *Capsicum chinense* Jacq. en respuesta a la toxicidad por aluminio". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Castillo Gutiérrez, Cristina. 2012. "Estudio de calidad de semillas conservadas de ocho variedades de chile habanero registradas en la Península de Yucatán". Universidad Politécnica Mesoamericana. Tenosique, Tabasco.

Guzmán López, Adolfo. 2012. "Contenido de los niveles de prolina en embriones somáticos de chile habanero (*C. chinense* Jacq.) bajo condiciones de estrés osmótico". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco, México.

Hernández Ozuna, Martha de Jesús. 2012. "Análisis de la funcionalidad de promotores de monocotiledóneas expresados en dicotiledóneas". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Herrera Chí, Ernesto. 2012. "Crecimiento y desarrollo de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en respuesta a la presencia exógena de poliaminas". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Puc Chan, Mario Manuel. 2012. "Inducción de brotes en chile pimiento (*C. annum*)". Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Salas-Peraza, Itzamná Quetzalcoatl. 2012. "Evaluación de plagas y enfermedades en ocho variantes de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Chicxulub Pueblo, Yucatán". Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico de Conkal.

Sánchez Borges, Carlos Alberto. 2012. "Papel del ácido salicílico y el ácido jasmónico en la respuesta de defensa contra *Phytophthora capsici* en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de Conkal. Yucatán.

Sánchez Gutiérrez, Mariana. 2012. "Efecto de la asparagina en las proteínas de embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniería Bioquímica Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Chiapas.

Tuyub-Ché, Jemina Salomé. 2012. "Capacidad antioxidante de extractos de frutos de *Capsicum chinense* Jacq.". Ingeniería en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche.

2013

Alonso Cortés, Nayeli. 2013. "Embriogénesis somática e histología de chile habanero naranja". Universidad Tecnológica de Tehuacán. Puebla.

Cab Ucán, Yusira. 2013. "Evaluación de metodologías para establecer la embriogénesis somática en chile habanero". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

Osorio Montalvo, Pedro Manuel. 2013. "Estudio del efecto de combinaciones de auxinas y citocininas en la histodiferenciación de embriones somáticos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida.

Rodríguez Ruiz, Yasmín. 2013. "Embriogénesis somática e histología de chile habanero rojo". Ingeniero en Biotecnología. Universidad Tecnológica de Tehuacán. Puebla.

2014

Borges García, Fátima Alejandra. 2014. "Estudio de la expresión del gen de la CCS (Capsantina capsorrubina sintasa) implicado en la síntesis de carotenoides de diferentes morfotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida.

Chi Poot, Martha Florencia. 2014. "Inmunodetección con el anticuerpo COM1 de la proteína DING presente en la fracción G10P1.7.57 y sus homólogo en una línea celular derivada de semilla de chile habanero". Ingeniería en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche.

Coronado Navarro, Juan Humberto. 2014. "Evaluación de plagas y enfermedades en seis variedades de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con manejo orgánico". Ingeniería Agronómica. Instituto Tecnológico de Tizimín. Yucatán.

Escamilla Pérez, Wilma Guadalupe. 2014. "Establecimiento de un método eficiente de desinfección de anteras florales de chile habanero *in vitro*". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida.

Muñoz Ramírez, Liliana Saraí. 2014. "Establecimiento de un protocolo de propagación clonal del género *Capsicum*". Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, Jalisco.

Uc Ku, Rita Ramona. 2014. "Implementación de la metodología de *far western* en proteínas de semilla de chile habanero utilizando como sonda la fracción G10P1.7.57 o al polipéptido CCHDINGP39KDA". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche.

2015

Chan Campos, Julieta María. 2015. "Respuesta antioxidante del ácido salicílico en los niveles de peróxido de hidrógeno en suspensiones celulares de *Capsicum chinense* Jacq.". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Mérida.

Chí Chí, Lucía del Carmen. 2015. "Estudio de las condiciones de cultivo que afectan a la embriogénesis somática en *Capsicum chinense* Jacq. y *Capsicum anuum* L.". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de Calkiní en el estado de Campeche.

García Laynes, Sergio. 2015. "Aislamiento, clonación y análisis *in silico* del ADNc de un gen de actina de chile habanero". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Gómez López, Víctor Manuel. 2015. "Obtención y caracterización molecular de un fragmento de ADNc de un gen tipo GLR en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Herrera Sáenz, María Guadalupe. 2015. "Regeneración *in vitro* de plantas de chile habanero a partir de segmentos nodales y ápices". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior del Sur del estado de Yucatán.

Manzanilla Rivas, Raúl Alejandro. 2015. "Detección de enzimas involucradas en el metabolismo nitrogenado en *Capsicum chinense* Jacq. mediante técnicas de hibridación *in situ*". Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Yucatán.

Morales Couoh, Luz Margarita. 2015. "Inmunopurificación de una proteína DING de chile habanero (*Capsicum chinense*)". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mérida.

Pech Chablé, Sergio Alonso. 2015. "Detección de los transcritos de la enzima co-rismato mutasa en placentas de chile habanero (*Capsicum chinense*)". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Mérida.

2016

Díaz Zacarías, Josefina. 2016. "Identificación de micro RNAs expresados durante la embriogénesis cigótica de *Capsicum chinense* Jacq.". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

García Laynes, Federico. 2016. "Generación de un protocolo para la transformación genética de plantas de chile habanero". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

González Tejero, Eduardo. 2016. "Estandarización de los parámetros para el tamizado de la semilla en la tamizadora por peso de la Unidad Productora de Semillas". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Parceró Pérez, Diana. 2016. "Estandarización de los parámetros para el tamizado de semilla en la tamizadora por tamaño de la Unidad Productora de Semillas". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Rodríguez Naal, Brianda Jaqueline. 2016. "Etiología de la mancha foliar en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)". Licenciatura en Biología, Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán.

2017

Castañeda Chan, Virginia. 2017. "Optimización de parámetros físicos de la incubadora para germinación de semillas de la Unidad Productora de Semillas". Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Cervantes Hernández, Izamar. 2017. "Establecimiento de parámetros para el beneficio de semillas de dos variedades certificadas de chile habanero, en la Unidad Productora de Semillas del Centro de Investigación Científica de Yucatán". Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Oleta Pérez, Ana. 2017. "Establecimiento de parámetros para el beneficio de semillas de dos variedades certificadas de chile habanero, en la Unidad Productora de Semillas del Centro de Investigación Científica de Yucatán". Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Sánchez Arcos, Verónica. 2017. "Optimización de parámetros físicos de la incubadora para germinación de semillas de la Unidad Productora de Semillas". Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco.

Sosa Martínez, Rafaela Margarita. 2017. "Multiplicación y aclimatación de plantas de chile habanero obtenidas *in vitro*". Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán.

2.4 Estancias posdoctorales

Guadalupe Fabiola Arcos Ortega. 2007-2008

Guadalupe Fabiola Arcos Ortega. 2008-2009

Ana Luisa Ramos Díaz. 2008-2009

Lourdes Georgina Iglesias Andreu. 2009-2010

Yumi Elena Nakazawa Ueji. 2009-2011

María de Lourdes Villalonga Santana. 2012 -2013

3. Registro de variedades vegetales

3.1. Derechos de Obtentor

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2012. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Ek". Título de Obtentor 0822. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2012. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Kiin". Título de Obtentor 0823 Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2015. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Boox iik". Título de Obtentor 1368. Sagarpa, Ciudad de México, México.

3.2 Registros de variedades

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Baálché ". SNICS CHL 012 291110 . Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Chac". SNICS CHL 013 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Chan". SNICS 014 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Ek". SNICS CHL 015 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Ixchel". SNICS CHL 016 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Kauil". SNICS CHL 017 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Kiin". SNICS CHL 018 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2010. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Kisin". SNICS CHL 019 291110. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. 2015. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) variedad "Mayan Boox iik". SNICS CHL 032 100415. Sagarpa, Ciudad de México, México.

Índice de autores



A

Ancona-Escalante, Wendy
Arcos Ortega, Fabiola Guadalupe
Avilés Berzunza, Elidé
Ayil Gutiérrez, Benjamín Abraham

B

Baas Espínola, Fray Martín
Bacab Pérez, Imelda Maricela
Balam Uc, Eduardo
Bautista Castellanos, Lisette
Becerril Chí, Karen Margarita
Brito Argáez, Ligia Guadalupe

C

Caamal Chan, María Goretty
Canché Fuentes, Víctor René
Canto Flick, Adriana
Carrillo Pech, Mildred Rubí
Castaño de la Serna, Enrique
Castillo Aguilar, Crescencio de la Cruz
Castro-Concha, Lizbeth
Cauich Sánchez, Porfirio Roberto
Celis Arámburo, Teresita de Jesús
Cocom Chan, Nallely Dolores

D

Díaz Brito, Mayra Alejandra
Domínguez, Ángel

E

Echevarría Machado, Ileana de la Caridad
Ek Caamal, Gerson Simeon
Escobedo Gracia-Medrano, Rosa María

F

Flores Giubi, María Eugenia

G

Galaz Ávalos, Rosa María
García Villalobos, Francisco Javier
Godoy Hernández, Gregorio del Carmen
González Alamilla, Rosalinda
González Estrada, Tomás Augusto
González Kantún, Wilma Aracely
Gutiérrez-Carbajal, María Guadalupe
Gutiérrez Pacheco, Luis Carlos
Guzmán Antonio, Adolfo Alberto

H

Hernández Sotomayor, Soledad María Teresa
Higuera Ciapara, Inocencio

I

Islas Flores, Rodrigo Ignacio

J

Jiménez Guillén, Doribet

K

Kantún Can, Rosa María
Kú Cauich, José Roberto
Kú González, Ángela Francisca

L

López Puc, Guadalupe
Loyola-Vargas, Víctor

M

Maldonado Borges, Josefina Inés
Marfil Santana, Miguel David
Marín Collí, Emily Elizabeth
Martínez Estévez, Manuel
Martínez Sánchez, Heidy Guadalupe
Medina Lara, María de Fátima
Minero García, Yereni
Miranda Ham, María de Lourdes
Moguel Salazar, Fernando Feder
Monforte González, Miriam del Socorro
Montalvo Peniche, María del Carmen
Montero Jiménez, Isaías
Moreno Valenzuela, Oscar Alberto
Muñoz Sánchez, José Armando

N

Nakazawa Ueji, Yumi Elena
Núñez Pastrana, Rosalía

P

Pacheco Arjona, José Ramón
Palacios Medel, Ernesto
Pérez Pascual, Daniel

R

Roca Mézquita, Carolina
Rodas Junco, Beatriz Adriana
Rubio Piña, Jorge
Ruiz Lau, Nancy

S

Sánchez Bojórquez, Carlos Alberto
Santana Buzzy, Nancy
Solís Marroquín, Daniela
Solís Ramos, Laura Yesenia
Souza Perera, Ramón Armando

T

Trujillo Aguirre, Jorge

V

Vázquez Flota, Felipe Augusto

Z

Zetina Rosado, Guillermo
Zúñiga Aguilar, José Juan
Zúñiga Martínez, Paulina



Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán

El cuidado de la edición y corrección de textos estuvo a cargo de Alejandrina Garza de León
y el diseño de interiores y de cubierta fue de Adrián Rolando Ramos Garza.

Mérida-México

El presente libro representa el esfuerzo conjunto de casi quince años de investigación llevada a cabo por el personal académico del CICY y da cuenta de las colaboraciones establecidas con otras instituciones durante este periodo.

La obra incluye temas relacionados con los Recursos Genéticos, la Interacción con el Medio Ambiente, el Metabolismo Secundario y los Desarrollos Biotecnológicos del Chile Habanero de la Península de Yucatán. 🌿



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
