

Inducción de embriones androgénicos y regeneración de plantas haploides en genotipos experimentales de chile poblano a través de cultivo de anteras

Mario Martín González-Chavira¹
Brenda Zulema Guerrero-Aguilar¹
José Luís Pons-Hernández^{1,2}
María de los Ángeles Escobedo-Landín¹
José Francisco García-Reyna¹
María Alejandra Mora-Avilés^{1§}

¹Programa de Biotecnología-Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende s/n, km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110. ²Programa de Hortalizas/Chile-Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende s/n, km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110.

§Autora para correspondencia: mora-alejandra@yahoo.com.

Resumen

Los métodos tradicionales para obtener líneas puras u homocigotas involucran varias generaciones de autofecundación con un requerimiento importante de tiempo. La obtención de plantas haploides y doble haploides, representa una alternativa que reduce a una generación, la producción de líneas con alelos idénticos en todos sus cromosomas. El objetivo de este trabajo fue implementar el protocolo de obtención de embriones androgénicos en poblaciones de chile mulato y ancho del programa de mejoramiento de chile en el Campo Experimental Bajío del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias durante 2019 y 2020. Treinta genotipos de chile comprendidos en dos poblaciones. a) población criolla heterogénea de chiles mulato y ancho con característica de esterilidad masculina citoplasmática; y b) población de cruzas interespecíficas de chile ancho con chile habanero (*C. annuum* x *C. chinense*) resistentes a geminivirus (PepGMV) y *Phytophthora* sp., fueron sometidas a tratamiento de inducción androgénica. El tratamiento consistió en N 6 -furfuriladenina (cinetina) (0.01 mg L⁻¹) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.01 mg L⁻¹) para la inducción de embriogénesis somática y posteriormente de cinetina (0.1 mg L⁻¹) para la inducción de germinación de embriones. La duplicación cromosómica se realizó por medio de colchicina (0.5%) previo a su adaptación *in vivo*. La población conformada por genotipos derivados de cruzas interespecíficas obtuvo mayor eficiencia de plantas regeneradas doble haploides entre 4.29% y 14.67%, mientras que la población criolla generó embriones en menor proporción entre 1.02% y 5.26%. Estos resultados son los primeros reportados para obtención de plantas doble haploides de chiles mulato y ancho.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, homocigosis, regeneración de plantas.

Recibido: octubre de 2022

Aceptado: febrero de 2023

Introducción

La obtención de plantas doble haploides (DH) a partir de una célula germinal es una de las herramientas biotecnológicas que forma parte de programas de mejoramiento de cultivos alrededor del mundo, y establece la posibilidad de reducir los tiempos para obtener una planta homocigota. Otras ventajas de usar DH incluyen hacer la selección más eficiente, de caracteres cualitativos y cuantitativos, ya que se facilita la fijación de alelos recesivos benéficos, facilita la recuperación de recombinaciones únicas y se eliminan los efectos de la dominancia y la segregación dentro de las familias. En especies de polinización libre, los DH pueden ser utilizados como líneas parentales de una variedad sintética y son útiles para estimar los valores aditivos o la aptitud combinatoria general si son utilizados en cruza con otros materiales de interés (Snape, 1989).

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una hortaliza muy importante a nivel económico por su valor comercial a nivel internacional. En México, el chile crece en ambientes tanto tropicales como templados y su diversidad genética fundamenta la gran variabilidad de tipos de chile, así como su valor biológico, culinario e industrial. La androgénesis es el método más ampliamente utilizado para la obtención de haploides de *C. annuum*.

En la androgénesis un gametofito inmaduro es desviado de su desarrollo normal y es inducido a su desarrollo esporofítico (Jha *et al.*, 2021). La obtención de plantas haploides de chile basada en el cultivo de anteras o microsporas (precursores del polen), es el método más reportado para la inducción embriogénica a partir de células gametofíticas masculinas. Las experiencias hasta ahora publicadas incluyen a las especies cultivadas de *C. annuum* (Comlekcioglu y Ellialtıođlu, 2018), así como especies silvestres y cruza interespecíficas (Munyon *et al.*, 1989). Sin embargo, es a partir de la publicación de Dumas *et al.* (1981) que el protocolo para obtención de plantas doble haploide de chile ha venido desarrollándose para incrementar la eficiencia de inducción androgénica y reconversión a plantas completas de diferentes genotipos de chile.

Varios estudios han demostrado la alta frecuencia de embriones derivados de anteras; sin embargo, pocos de ellos fueron capaces de desarrollar plantas normales (Supena y Custers, 2011). Grozeva *et al.* (2009) establecieron que la formación de embriones oscilaba entre 0 y 9% de los cuales obtuvieron ocho plantas completas. Por su parte, Ercan y Ayar (2011) reportaron resultados similares los cuales variaron de 0 a 7.69% de formación de embriones; sin embargo, únicamente obtuvieron 12 plantas completas. El efecto de edad de la planta donante del explante (Kristiansen y Andersen, 1993), las condiciones de crecimiento (Büyükalaca *et al.*, 2004), la temporada de crecimiento (Ata *et al.*, 2019), los reguladores de crecimiento (Nowaczyk *et al.*, 2016) y el genotipo de la planta donante afectan la eficiencia y éxito de la embriogénesis y ulterior desarrollo a planta completa; sin embargo, es el genotipo el factor principal que define la embriogénesis exitosa de microsporas a partir del cultivo de anteras (Niklas *et al.*, 2012; Keles *et al.*, 2015).

Uno de los principales objetivos de mejoramiento en chile de tipo mulato y ancho en el Programa de Mejoramiento de Chile en el Campo Experimental Bajío del INIFAP es obtener líneas con resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. y a los geminivirus PepGMV y PHYVV, así como líneas 'B' o mantenedoras de esterilidad masculina citoplasmática. Avances importantes en la selección de materiales resistentes fueron obtenidos por lo que se hace necesario obtener líneas homocigotas de genotipos élite para la generación de híbridos comerciales.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue implementar y desarrollar un protocolo que permita regenerar plantas haploides y doble haploides en genotipos avanzados de chile mulato y ancho vía cultivo de anteras, y caracterizar la respuesta, eficiencia de inducción y obtención de plantas.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon 27 genotipos experimentales de chile tipo mulato y ancho provenientes de dos poblaciones principales: a) población criolla heterogénea de chiles mulato y ancho con característica de esterilidad masculina citoplasmática (CMS), por sus siglas en inglés; b) población de cruza interespecíficas (*C. annuum* x *C. chinense*) resistentes a geminivirus (PepGMV) y *Phytophthora* sp.; y c) variedades de chile comerciales ancho San Luis y ancho 3015, susceptibles a geminivirus (PepGMV) y *Phytophthora* sp. Las plantas donantes de los explantes experimentales, fueron sembradas en invernadero las cuales se les aplicó riego cada tres días por sistema de goteo y fertilizante foliar al inicio de floración y producción con Maxi-Grow Excel[®] 20 ml 25 L⁻¹.

Colecta de botones florales

Los botones florales fueron colectados de las plantas de chile durante los meses de otoño e invierno boreal de 2019-2020. La etapa de colecta de los botones florales de chiles fue cuando éstos tenían aproximadamente un tamaño 6 a 6.8 mm y los pétalos aproximadamente 1 mm más largos que los sépalos, esto es cinco días a partir de la etapa fenológica de 50% de floración. Los botones florales se cortaron con una tijera desinfectada y fueron depositados en tubos Falcon[®] de 50 ml con agua destilada estéril.

Desinfección de botones florales

El agua donde se recolectaron los botones florales se desechó de los tubos Falcon[®] y se añadieron 30 ml de etanol al 70% en agitación (100 rpm) durante dos minutos. Al término de este tiempo se decantó el etanol y se añadieron 30 ml de cloro comercial al 10% (Cloralex[®]; 6% de cloro activo), permaneciendo en agitación durante 10 min. Finalmente, la solución de cloro se decantó y se realizaron tres lavados con agua destilada esterilizada, de 1 minuto cada uno. Después del proceso de desinfección, los botones florales se mantuvieron en baño de hielo o en el refrigerador a aproximadamente 4 °C, hasta el momento del aislamiento de las anteras.

Cultivo de anteras en medio de inducción

Los botones florales desinfectados se colocaron sobre una caja de Petri esterilizada para extraer las anteras con la ayuda de dos pinzas quirúrgicas estériles. Los sépalos se separaron de los pétalos cuidadosamente para mantener la integridad de las anteras y éstas se disectaron con bisturí. Las anteras se cultivaron del lado convexo en contacto con el medio de inducción macroelementos: (NH₄)₂SO₄ 0.034 g L⁻¹, NH₄NO₃ 1.238 g L⁻¹, CaCl₂.2H₂O 0.313 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0.142 g L⁻¹, Ca (NO₃)₂.4H₂O 0.05 g L⁻¹, Mg SO₄.7H₂O 0.412 g L⁻¹, KNO₃ 2.15 g L⁻¹, NaH₂PO₄.H₂O, 0.038 g L⁻¹, KCl 0.007 g L⁻¹; microelementos: H₃BO₃ 3.15 mg L⁻¹, CoCl₂.6H₂O (stock 2.5 mg ml⁻¹) 0.016 mg L⁻¹, CuSO₄.5H₂O (stock 2.5 mg ml⁻¹) 0.016 mg L⁻¹, MnSO₄.H₂O 22.13 mg L⁻¹, NaMoO₄.2H₂O 0.19

mg L⁻¹, KI 0.7 mg L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 3.625 mg L⁻¹ (Dumas de Vault *et al.*, 1981), suplementado con 0.01 mg L⁻¹ de cinetina y 0.01 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), sacarosa 30 g L⁻¹, vitaminas: tiamina 2 mg L⁻¹, piridoxina HCl 1 mg L⁻¹, ácido nicotínico 1 mg L⁻¹, pantotenato de calcio 1 mg L⁻¹, glicina 2 mg L⁻¹, ácido fólico 1 mg L⁻¹, biotina 1 mg L⁻¹, mio-inositol 10 g L⁻¹ y agar-agar 8 g L⁻¹. El pH se ajustó a 5.9 previo a su esterilización a 121 °C y 15 libras sobre pulgada cuadrada durante 20 min, el medio fue vertido en cajas Petri esterilizadas de 90 × 15 mm.

Las anteras cultivadas fueron seleccionadas por tener un tamaño aproximado de 2.5 a 3 mm de longitud. Las cajas Petri se sellaron con cinta Micropore® y se incubaron a 32 °C en oscuridad durante ocho días. Después, las cajas Petri con anteras se llevaron a una cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz a una intensidad lumínica de 45-70 μmol·m⁻² s⁻¹ durante cuatro días en el mismo medio de inducción.

Cultivo de anteras en medio de germinación

Las anteras fueron transferidas a medio de germinación con los mismos macroelementos y concentración que el medio de inducción y microelementos en concentraciones como sigue: H₃BO₃ 1.55 mg L⁻¹, CoCl₂·6H₂O (stock 2.5 mg ml⁻¹) 0.011 mg L⁻¹, CuSO₄·5H₂O (stock 2.5 mg ml⁻¹) 0.011 mg L⁻¹, MnSO₄·H₂O 20.13 mg L⁻¹, NaMoO₄·2H₂O 0.14 mg L⁻¹, KI 0.33 mg L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 3.255 mg L⁻¹ (Dumas de Vault *et al.*, 1981), adicionado con cinetina 0.1 mg L⁻¹, sacarosa 30 g L⁻¹, vitaminas (ver medio de inducción) y agar-agar (8 g L⁻¹), el pH se ajustó a 5.9 previo a su esterilización. Las cajas Petri con las anteras se incubaron bajo las mismas condiciones de fotoperiodo y temperatura antes mencionadas.

Aislamiento y desarrollo de los embriones

Una vez que los embriones germinaron y mostraron sus polos apical y radicular, fueron transferidos a medio de elongación y enraizamiento libre de hormonas (Chambonnet, 1988) Macroelementos: KNO₃ 1.9 g L⁻¹, NH₄NO₃ 1.65 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.37 g L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0.44 g L⁻¹, KH₂PO₄ 0.17 g L⁻¹, microelementos: MnSO₄·H₂O 0.076 mg L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 1 mg L⁻¹, H₃BO₃ 1 mg L⁻¹, KI 0.01 mg L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0.03 mg L⁻¹, AlCl₃·6H₂O 0.05 mg L⁻¹, NiCl₂·6H₂O 0.03 mg L⁻¹ suplementado con sacarosa 30 g L⁻¹, mio-inositol 10 g L⁻¹, FeSO₄·7H₂O 18.65 mg L⁻¹, Na₂-EDTA 13.9 mg L⁻¹ y agar-agar 8 g L⁻¹. El pH se ajustó a 5.9 previo a su esterilización.

En una primera etapa de elongación, los embriones se transfirieron a cajas Petri 90 x 25 mm y conforme aumentaron su tamaño y la necesidad de espacio, se transfirieron a frascos tipo Gerber® de 170 ml Los frascos se sellaron con cinta micropore® e incubaron en la cámara de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz, a una intensidad lumínica de 45-70 μmol m⁻² s⁻¹, hasta que las plántulas formaron cuatro pares de hojas verdaderas y raíces secundarias.

Determinación del nivel de ploidía

Ápices radiculares de dos raíces de 1 a 2 cm se disectaron y analizaron por medio de tinción de ploidía con la técnica de squash (Ahloowalia, 1965). Las raíces se colocaron en una solución de ácido acético (45%) y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas en agitación suave (100 rpm). Posteriormente, las raíces se transfirieron a una solución de etanol al 70% en agitación por dos horas y se refrigeraron a 4 °C hasta su análisis.

Las raíces almacenadas en alcohol fueron transferidas a un microtubo de 1.5 ml con 600 µl del inhibidor 8-hidroxiquinolina al 0.002 M por cuatro horas en oscuridad a temperatura ambiente (Valladolid *et al.*, 2004). Transcurridas las cuatro horas de pretratamiento, se eliminó el inhibidor y se adicionaron 600 µl de la solución de Farmer (etanol absoluto + ácido acético glacial en proporción 3:1). Las muestras se incubaron durante 24 h a 4 °C. Se retiró la solución de Farmer con micropipeta y se realizó una hidrólisis ácida con HCl al 1 N por 15 min a 60 °C y posteriormente una hidrólisis enzimática con celulosa al 0.2% por 15 min a 37 °C. Se retiró la última solución de hidrólisis con la micropipeta y se realizaron dos lavados adicionando 600 µl de la solución EDTA 1 mM y se adicionaron 500 µl de colorante acetocarmín al 1% por 30 min. Se tomaron las raíces con ayuda de una pinza y se colocaron en un portaobjetos. Se adicionó una gota de ácido acético glacial al 45%, se colocó el cubreobjetos y se realizó presión suave (Squash).

Observación al microscopio

Posterior a la técnica de squash, la muestra se observó bajo el microscopio óptico, con el objetivo de aumento de 10X y 40X. Una vez localizadas las células se ajustó el objetivo 100X, para la observación de los cromosomas.

Duplicación cromosómica

Las plántulas fueron extraídas cuidadosamente del medio de cultivo y se eliminaron los restos del medio de cultivo de las raíces con agua destilada esterilizada. Cada plántula se sumergió hasta la base del tallo en un frasco con tapa que contenía una solución de colchicina (Sigma[®]) al 0.5%, durante 8 h a 25 °C (Arjunappa *et al.*, 2016). Transcurrido este tiempo las plántulas fueron enjuagadas con agua esterilizada.

Aclimatación de las plántulas de chile

Posterior al tratamiento de colchicina las plántulas fueron transferidas a macetas de 250 ml con sustrato tipo Sunshine[®] previamente esterilizado. Las plántulas se mantuvieron en la misma cámara a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz, a una intensidad lumínica de 45-70 µmol m⁻² s⁻¹. Se realizó un riego ligero al sustrato cada tercer día con una solución de macronutrientes y micronutrientes (Chambonnet, 1988) al 50%. Una vez que la plántula alcanzó 25 a 30 cm de longitud se tomó nuevamente una muestra radicular para comprobar la duplicación cromosómica.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorizado donde se analizaron 27 genotipos experimentales de chile. La unidad experimental fue una caja con 25 anteras por caja Petri y 6 repeticiones por genotipo de chile. El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza y comparación de medias a través de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), con el paquete estadístico Minitab 17 (Minitab Statistical Software).

Resultados y discusión

Inducción y germinación de embriones haploides

Las anteras mostraron respuesta a la inducción de desarrollo embriogénico entre 4 y 6 semanas posterior a su cultivo. La primera evidencia de inducción de androgénesis fue la aparición en los conductos polínicos de la antera, de un embrión en etapa globular de un tono verde claro a partir de la semana 4 y 5 de cultivo (Figura 1A). Luego el embrión aumentó de tamaño e inició el proceso de diferenciación, la estructura que se define primero son las yemas radiculares, esto inicia con la formación de vellosidades en uno de los extremos del embrión (Figura 1B). Posteriormente, se diferenció la yema apical que conforma los cotiledones, en el lado opuesto en donde se originó la yema radicular (Figura 1C). Tras la separación de la antera (Figura 1D), los embriones germinaron mostrando definición de raíz, hipocotilo y cotiledones (Figura 1E).

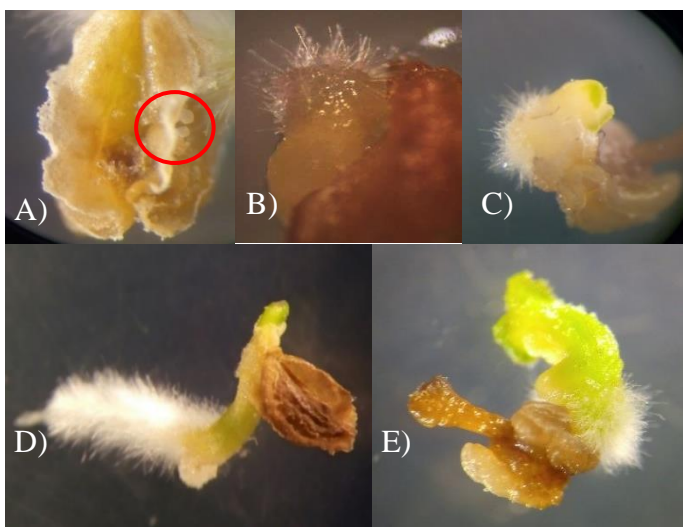


Figura 1. Germinación de embriones y desarrollo de plantas haploides durante el cultivo de anteras del genotipo 3328 de chile ancho. A) pro-embriónes en el conducto polínico de la antera; B) formación de yema radicular; C) embrión con inicio de diferenciación de yema apical; D) embrión independizado de la antera; y E) etapas diferenciales de germinación de embrión y elongación de plántula.

Fue posible detectar la pérdida de la capacidad de diferenciación de cotiledones en algunos embriones, es común que los pro-embriónes y embriones detengan su desarrollo en alguna parte del proceso, esto se observó en 80% de los pro-embriónes y embriones obtenidos con los genotipos de chile probados. Esto se puede atribuir a que las rutas de diferenciación no están genéticamente determinadas al tratarse de tejido haploide y el proceso de inducción (medio de cultivo y shock térmico), no necesariamente culmina en una estructura morfológicamente completa.

Varios reportes coinciden en la importancia de la temperatura sobre los mecanismos celulares (Bajaj 1978; Touraev *et al.*, 1997) así como el efecto en la expresión genética que ocasiona el cambio de microsporas a embriogénesis (Gonzalez-Melendi *et al.*, 1996; Testillano *et al.*, 2000; Barany *et al.*, 2001) desviando de un desarrollo normal a la transición gametofítica a esporofítica. La estimulación por choque térmico ha sido fundamental particularmente en los genotipos con

pobre respuesta; sin embargo, aun en los genotipos sin respuesta, será conveniente considerar otros factores como medio de cultivo, reguladores, suplementos, genotipo, condiciones de crecimiento de la planta donante, estadio de desarrollo de las microsporas, entre otros.

Diez de los 27 genotipos de chile empleados no mostraron respuesta a los medios de inducción y germinación. Estos genotipos mostraron anteras no viables en su mayoría y aquellas que iniciaron la germinación en embriones inducidos se detuvieron en algún punto de su diferenciación. Por su parte, los 17 genotipos que mostraron señales de inducción mostraron variabilidad en la eficiencia de respuesta y obtención de plantas haploides de 0.67 a 14.67% con respecto a las anteras viables (Cuadro 1).

Cuadro 1. Eficiencia de regeneración de plantas haploides mediante la inducción de androgénesis en chile.

Genotipos de chile	Característica	Tipo	Núm. de anteras cultivadas viables ⁺	Núm. de plantas derivadas de anteras	Eficiencia (%) [*]
3239	Tamaño de fruto susceptible	mulato	123	1 b [†]	0.81
3328	Mantenedoras de CMS	ancho	150	7 bc	4.67
3334	Mantenedoras de CMS	mulato	136	7 bc	5.15
3335	Mantenedoras de CMS	mulato	150	0 a	0
3336	Mantenedoras de CMS	mulato	98	1 b	1.02
3337	Mantenedoras de CMS	mulato	132	3 b	2.27
3338	Mantenedoras de CMS	mulato	133	7 bc	5.26
3339	Mantenedoras de CMS	mulato	148	0 a	0
3340	Mantenedoras de CMS	mulato	80	5 bc	6.25
3341	Mantenedoras de CMS	mulato	124	3 b	2.42
3342	Mantenedoras de CMS	ancho	98	2 b	2.04
3343	Mantenedoras de CMS	mulato	107	0 a	0
3344	Mantenedoras de CMS	mulato	126	3 b	2.38
3345	Mantenedoras de CMS	mulato	82	0 a	0
3346	Mantenedoras de CMS	mulato	150	1 b	0.67
3359	Mantenedoras de CMS	ancho	114	2 b	1.75
3375	Mantenedoras de CMS	ancho	115	4 b	3.48
3378	Mantenedoras de CMS	ancho	138	0 a	0
3381	PepGMV ^{R, BC3}	ancho	82	0 a	0
3382	PepGMV ^{R, BC3}	ancho	150	0 a	0
3383	PepGMV y <i>P. capsici</i> ^{R, BC3}	ancho	150	22 c	14.67
3384	PepGMV ^{R, BC3}	ancho	147	12 c	8.16
3385	PepGMV ^{R, BC3}	ancho	140	6 bc	4.29
3386	Oidium ^{R, BC3}	ancho	68	0 a	0
3387	PepGMV ^{R, BC3}	ancho	133	0 a	0

Genotipos de Chile	Característica	Tipo	Núm. de anteras cultivadas viables ⁺	Núm. de plantas derivadas de anteras	Eficiencia (%) [*]
Ancho San Luis	Susceptible	ancho	133	9 c	6.77
Ancho 3015	Susceptible	ancho	142	2 b	1.41

Susceptible= genotipos susceptibles a *Phytophthora capsici*, PepGMV y Cenicilla; R= genotipos segregantes resistentes; BC3= cruce interespecífica ancho 3015 x habanero BG3821 y retrocruza con ancho 3015; ⁺= número de anteras viables proviene de la población de 150 anteras divididas en seis repeticiones de 25 anteras cada una; ^{*}= número de plantas por cada 100 anteras cultivadas; [†]= medias con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Lo anterior ha sido reportado de manera uniforme por diversos autores quienes establecen que uno de los principales factores para la inducción de androgénesis con fines de obtención de plantas haploides es el genotipo, encontrando que hay genotipos de Chile que no responden a la inducción de androgénesis (Comlekcioglu y Ellialtıoglu, 2018; Shimira *et al.*, 2019).

Aun cuando en este trabajo no se empleó pretratamiento a bajas temperaturas (4 °C), no hay consenso de que proporcione alguna ventaja relevante; sin embargo, el choque térmico a 35 °C fue mencionado como fundamental para la estimulación de la división de microsporas de Chile (Kim *et al.*, 2004; Barany *et al.*, 2005; Vivek *et al.*, 2017; Shimira *et al.*, 2019). De acuerdo con Barany *et al.* (2005), la morfogénesis de los embriones derivados de microsporas con la misma estimulación de altas temperaturas reveló cambios en la organización celular, la secuencia en el tiempo de los eventos estructurales relacionados con la actividad proliferativa y de diferenciación.

Estos cambios principalmente afectan los plastidios, el compartimento vacuolar, la pared celular y el núcleo. En este trabajo, las anteras se incubaron a 32 °C debido a que a 35 °C las anteras se deshidrataban hasta el punto de su inviabilidad. De esta manera, la reducción del tratamiento de inducción a 32 °C permitió mantener la viabilidad de las microsporas, la inducción de androgénesis y posterior germinación de embriones.

Una vez que se observaron estructuras de pro-embriones, la siguiente etapa fue la germinación del embrión a partir de la elongación de la yema radicular a partir de los 28 días en medio de germinación (Figura 2A), así como el engrosamiento y separación de los bordes laterales de la antera aproximadamente a los 40 días de cultivo en medio de germinación (Figura 2B). Posteriormente, a 50-60 días de cultivo se apreció la aparición de primordios foliares (Figura 2C).

Se ha reportado otra ruta de diferenciación con la producción de callo derivado del cultivo de anteras en medio Murashige y Skoog suplementado con zeatina 1 mg L⁻¹, 2, 4-D 0.2 mg L⁻¹ y AgNO₃ 15 mg L⁻¹ con tratamiento a 35 °C por 8 días, de entre 54.02% a 60.92%. Sin embargo, aun cuando los callos manifestaron coloración verde, éstos no mostraron diferenciación de brotes en los híbridos F1 de Chile dulce Bharat e Indra, respectivamente (Vivek *et al.*, 2017). De acuerdo con lo obtenido en este trabajo, la formación de callo se observó en baja proporción y no constituyó una limitante para el desarrollo androgénico de las microsporas.

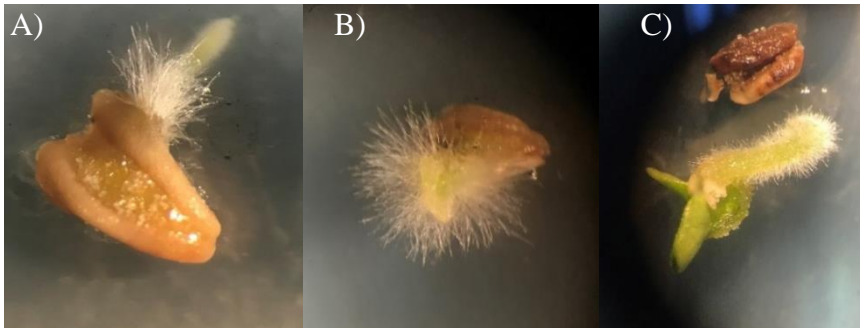


Figura 2. Anteras con evidencias de androgénesis y germinación de embrión. A) yema radicular de una antera perteneciente a la línea 3385 a los 28 días en medio de germinación; B) separación de los bordes laterales de la antera de la línea 3384 a los 42 días en medio de germinación; y C) primordios foliares de la línea 3344 a 56 días en medio de germinación.

Determinación del nivel de ploidía

La duplicación cromosómica de plantas haploide de chile ($n=12$) es necesaria para restablecer el estatus diploide ($2n=24$) y con ello la fertilidad. En este trabajo no se observó doble haploides espontáneos por lo que fue necesario establecer la incubación con colchicina para todas las plantas derivadas de androgénesis y embriogénesis (Figura 3A). La concentración de colchicina empleada (0.5%) durante 8 h de exposición (Figura 3B), coincide con la mayoría de los reportes de doble haploides en Chile, el método de identificación del contenido cromosómico en estadio de metafase (Figura 3C), fue eficiente y la duplicación cromosómica fue comprobada días después en etapa de aclimatación (Figura 3D). Comlekcioglu (2021) reporta que la inclusión de colchicina (0.3%), desde el medio de inducción, incrementa la tasa de duplicación cromosómica espontánea de 33% a 57.6%, lo cual se contempla dentro de las perspectivas para incorporar en futuros ensayos. Las plantas de Chile doble haploides desarrollaron un porte normal en invernadero, recobraron su fertilidad y produjeron frutos (Figura 3E).

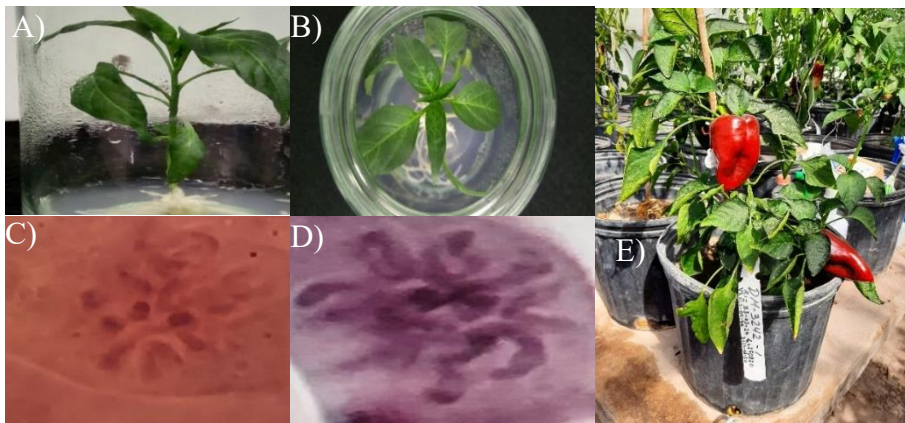


Figura 3. Duplicación y método de tinción de cromosomas por el método squash. A) plántula de Chile mulato 3342 (n); B) tratamiento con colchicina (0.5 %) por 8 h; C) cromosomas en metafase antes de la duplicación cromosómica; D) cromosomas después de la duplicación cromosómica; y E) planta de Chile mulato 3242 doble haploide, en invernadero.

Conclusiones

El protocolo desarrollado en esta investigación para obtención de plantas de chile poblano doble haploides establece tasas diferenciales de inducción de androgénesis y germinación de embriones en las poblaciones empleadas. Los resultados plantean que, si bien los genotipos de chile empleados tienen características genómicas y genéticas diferentes, se establecen las bases generales de inducción de embriones androgénicos, las cuales constituyen perspectivas de mejora.

Agradecimientos

Los resultados son parte del proyecto fiscal: ‘adecuación de tecnología de producción de plantas dobles haploides para el mejoramiento genético’ No. SIGI: 13232234789.

Literatura citada

- Ahloowalia, B. S. 1965. A root tip squash technique for screening chromosome-number in *Lolium*. *Euphytica*. 14(1):170-172. <https://doi.org/10.1007/BF00038983>.
- Arjunappa, H. M.; Sateesh, K. P. and Prema, L. D. 2016. Studies on ploidy analysis and chromosome doubling in androgenic plants of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Inter. J. Agric. Innov. Res.* 4(4):627-633.
- Ata, A.; Keles, D.; Taskin, H. and Buyukalaca, S. 2019. Effects of season, genotype, and nutrient medium on pepper anther culture and microspore development. *Turk. J. Agric. For.* 43(2):123-137. <https://doi:10.3906/tar-1802-35>.
- Bajaj, Y. P. S. 1978. Regeneration of haploid tobacco plants from isolated pollen grown in drop culture. *Indian J. Exp. Biol.* 16(1):407-409.
- Barany, I.; Gonzalez-Melendi, P.; Fadon, B.; Mityko, J.; Risueno, M. C. and Testillano, P. S. 2005. Microspore-derived embryogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.): subcellular rearrangements through development. *Biol. Cell.* 97(9):709-722.
- Barany, I.; Testillano, P. S.; Mityko, J. and Risueno, M. C. 2001. The switch of the microspore developmental program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *Int. J. Dev. Biol.* 45(S1):39-40.
- Büyükalaca, S.; Comlekcioglu, N.; Abak, K.; Ekbic, E. and Kilic, N. 2004. Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *Eur. J. Hort. Sci.* 69(5):206-209.
- Chambonnet, D. 1988. Production of haploid eggplant plants. *Bulletin interne de la Station d'Amelioration des Plantes Maraicheres d'Avignon-Montfavet, France.* 1-10 pp.
- Comlekcioglu, N. 2021. Effect of colchicine addition to culture medium on induction of androgenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Pak. J. Bot.* 53(3):1001-1005. [http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-3\(14\)](http://dx.doi.org/10.30848/PJB2021-3(14)).
- Comlekcioglu, N. and Ellialtıođlu, S. S. 2018. Review on the research carried out on *in vitro* androgenesis of peppers (*Capsicum annuum* L.) in Turkey. *Res. J. Biotech.* 13(6):75-84.
- Dumas de Vault, R.; Chambonnet, D. and Pochard, E. 1981. Culture *in vitro* d'anthères de piment (*Capsicum annuum* L.): amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35 °C. *Agronomie, EDP Sciences.* 1(10):859-864. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00884205>.
- Ercan N and Ayar Şensoy, F. 2011. Androgenic responses of different *Capsicum annuum* L. cultivars, *Biyoloji Bilimleri Arastirma Dergise.* 4(2):59-61.

- Gonzalez, M. P.; Testillano, P. S.; Prestamo, G.; Fadon, B. and Risueno, M. C. 1996. Cellular characterization of key developmental stage for pollen embryogenesis induction. *Plant Dev. Biol.* 127S-128S. <http://hdl.handle.net/10261/252482>.
- Grozeva, S.; Rodeva, V.; Todorova, V. and Pundeva, R. 2009. Obtaining of pepper plants via anther culture. *Genet. Breed.* 38(1):25-31.
- Jha, K.; Kumar, P. C. and Agarwal, A. 2021. Doubled haploid production in *Capsicum annuum* L. using anther culture: a review. *Plant Archiv.* 21(1):168-173. <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2021.v21.S1.031>.
- Kim, M.; Kim, J.; Yoon, M.; Choi, D. and Lee, K. 2004. Origin of multicellular pollen and pollen embryos in cultured anthers of pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77(1):63-72.
- Kristiansen, K. and Andersen, S. B. 1993. Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on another culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica.* 67(1):105-109. <https://doi.org/10.1007/BF00022732>.
- Munyon, I. P.; Hubstenberger, J. F. and Phillips, C. 1989. Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 25(3):293-296. <https://doi.org/10.1007/BF02628469>.
- Niklas, N. A.; Olszewska, D.; Kisiała, A. and Nowaczyk, P. 2012. Study of individual plant responsiveness in anther cultures of selected pepper (*Capsicum* spp.) genotypes. *Folia Hort.* 24(2):141-146. <https://doi:10.2478/v10245-012-0017-x>.
- Nowaczyk, L.; Nowaczyk, P. and Olszewska, D. 2016. Treating donor plants with 2,4-dicholophenoxyacetic acid can increase the effectiveness of induced androgenesis in *Capsicum* spp, *Sci. Hortic.* 205(23):1-6. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.044>.
- Shimira, F.; Keleş, D.; Taşkın, H. and Abak, K. 2019. The assessment of androgenic response of two nematode resistant pepper (*C. annuum* L.) genotypes. *Turkish J. Agric. Food Sci. Technol.* 7(12):2103-2110. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i12.2103-2110.2828>.
- Snape, J. W. 1989. Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. *In: review of advances in plant biotechnology 1985-1988. 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops.* Mujeeb-Kazi A. and Sitch, L. A. Eds. (Mexico y Filipinas). International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) and International Rice Research Institute (IRRI). 19-30 pp.
- Supena, E. D. J. and Custers, J. B. M. 2011. Refinement of shed-microspore culture protocol to increase normal embryos production in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Sci. Hor.* 130(4):769-774. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.037>.
- Testillano, P. S.; Coronado, M. J.; Segui, J. M.; Domenech, J.; González, M. P.; Raska, I. and Risueno, M. C. 2000. Defined nuclear changes accompany the reprogramming of the microspore to embryogenesis. *J Struct Biol.* 129(2-3):223-232. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4249>.
- Touraev, A.; Vicente, O. and Heberle-Bors, E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.* 2(8):297-302. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)89951-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)89951-7).
- Valladolid, A.; Blas, R. and Gonzáles, R. 2004. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas. *In: seminario J. Ed. Raíces Andinas. Contribuciones al conocimiento y la capacitación. Serie: conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos* núm. 6. CIP. Agencia Suiza para el desarrollo y la cooperación. Lima, Perú. 96-99 pp.
- Vivek, H.; Partap, P. S.; Yadav, R. C. and Baswana, K. S. 2017. *In vitro* androgenesis in *Capsicum* (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6(5):925-933. <https://doi:https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.102>.