



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum L.***

**TESIS**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN  
BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

**PRESENTA:**

**FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA**

**BAJO LA SUPERVISIÓN DE:  
DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O**

**CHAPINGO, MÉXICO, JULIO DE 2021**



**APROBADA**



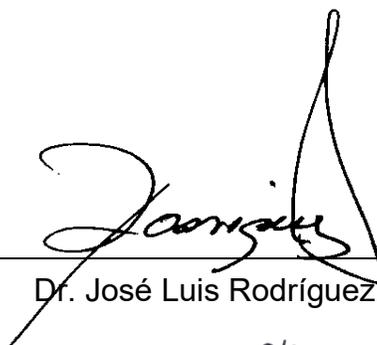
**Instituto de Horticultura**

## AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum* L.

Tesis realizada por el C. **Franco Armando Guerrero Valencia**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

### MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Director:



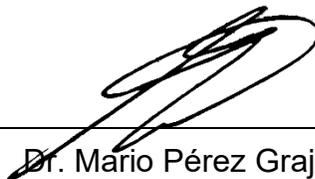
Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesor:



Dr. José Óscar Mascorro Gallardo

Asesor:



Dr. Mario Pérez Grajales

Chapingo, México. Julio de 2021.

## ÍNDICE

DATOS BIOGRÁFICOS .....	vii
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO .....	3
2.1 Origen y distribución .....	4
2.2 Clasificación taxonómica .....	5
2.3 Descripción botánica .....	5
2.3.1 Raíz .....	5
2.3.2 Tallo .....	5
2.3.3 Hoja .....	6
2.3.4 Flor .....	6
2.3.5 Fruto .....	6
2.3.6 Semilla .....	7
2.4 Requerimientos edafoclimáticos .....	7
2.4.1 Temperatura .....	7
2.4.2 Irrigación .....	7
2.4.3 Suelo .....	7
2.5 Usos .....	8
3. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL .....	8
3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales .....	8
3.2 Transformación genética de plantas .....	9
3.3 Biotecnología de los chiles .....	10
3.3.1 Problemas asociados con la biotecnología de chiles .....	10
3.3.1.1 Naturaleza recalcitrante .....	11
3.3.1.2 Arrosetamiento de brotes adventicios .....	11
3.3.1.3 Genotipo-dependencia .....	11
4. SISTEMAS DE REGENERACIÓN <i>in vitro</i> .....	12
4.1 Organogénesis .....	12
4.2 Embriogénesis somática .....	13
4.2.1 Tipos de explantes .....	14

4.2.2 Componentes del medio de cultivo .....	14
4.2.2.1 Inducción de callos embriogénicos .....	15
4.2.2.2 Embriogénesis somática directa .....	17
4.2.2.3 Maduración de embriones .....	19
4.2.2.4 Germinación de embriones.....	19
4.3 Cultivo de anteras para la generación de haploides .....	20
4.3.1 Condiciones de crecimiento y edad de la planta .....	21
4.3.2 Estado de desarrollo de la microespora .....	21
4.3.3 Medio de cultivo .....	22
4.3.3.1 Reguladores de crecimiento vegetal.....	22
4.3.3.2 Suplementos del medio de cultivo .....	22
4.3.4 Tratamiento de estrés por temperatura .....	23
4.3.5 Determinación del nivel de ploidía.....	23
4.3.6 Duplicación del genoma haploide .....	23
4.4 Rescate de embriones .....	24
4.5 Cultivo de protoplastos .....	26
4.5.1 Aislamiento.....	26
4.5.2 Cultivo .....	27
4.5.3 Hibridación somática.....	28
4.5.4 Regeneración de plantas .....	28
5. ETAPAS DEL CULTIVO <i>in vitro</i> DE CHILES .....	28
5.1 Etapa I (establecimiento) .....	29
5.1.1 Fuente de material vegetal.....	29
5.1.2 Desinfestación del material vegetal.....	29
5.1.3 Obtención de explantes.....	30
5.2 Etapa II (multiplicación).....	30
5.3 Etapa III (enraizamiento).....	31
5.4 Etapa IV (aclimatización) .....	32
6. VARIACIÓN SOMACLONAL.....	33
6.1 Identificación de variantes somaclonales.....	34
6.2 Aprovechamiento de las variantes .....	34
7. MUTAGÉNESIS .....	34

7.1 Métodos físicos.....	35
7.2 Métodos químicos.....	36
8. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	37
8.1 Métodos de análisis de la diversidad genética.....	37
8.1.1 Marcadores moleculares .....	37
8.1.1.1 RAPD.....	38
8.1.1.2 SSR .....	38
8.1.1.3 ISSR .....	39
8.1.1.4 AFLP.....	40
8.1.1.5 RFLP .....	40
8.1.1.6 Métodos filogenéticos .....	41
9. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA .....	41
9.1 Transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	42
9.2 Transformación genética por biobalística .....	43
10. BIOINFORMÁTICA .....	44
10.1 Análisis de transcriptomas .....	45
10.2 Identificación de genes .....	45
11. CASO DE ESTUDIO: RESISTENCIA A <i>Phytophthora capsici</i> Leonian .....	46
11.1 Fuentes de resistencia.....	47
11.2 Mecanismos de resistencia.....	47
11.3 Alternativas biotecnológicas .....	49
12. FITOQUÍMICA.....	50
12.1 Capsaicinoides .....	50
12.2 Carotenoides .....	51
12.3 Flavonoides .....	52
12.4 Compuestos volátiles.....	52
13. EDICIÓN GENÉTICA .....	53
13.1 Edición genética mediante CRISPR/Cas9 .....	53
14. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	54
15. BIBLIOGRAFÍA .....	56

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por haberme otorgado el financiamiento que hizo posible mis estudios de maestría.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** y al **Instituto de Horticultura**. En sus aulas me formé y me preparé para salir a conquistar el mundo. Caminaré recordando cada momento de esfuerzo, consagración y la satisfacción de los logros alcanzados, como inspiración para los nuevos retos y planes que me depara la vida. ¡Gracias mi noble Universidad!

A los miembros de mi comité asesor, **Dr. José Luis Rodríguez de la O**, **Dr. José Óscar Mascorro Gallardo** y **Dr. Mario Pérez Grajales**. Les doy las gracias por todas las enseñanzas impartidas, por los infaltables consejos y por los conocimientos que han contribuido para enriquecer mi formación profesional.

A los profesores del posgrado en **Biología Agrícola**. Existen muchas personas que se dedican a la docencia, pero son muy pocos aquellos que lo hacen de corazón y estos son los que marcan la diferencia porque son capaces de cambiar la vida de sus alumnos para siempre.

A la Lic. **Gisela García** por todo el apoyo y dedicación que día a día transmitió en mí y por su valioso asesoramiento en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Al personal administrativo del posgrado, **Ángeles**, **Anita** y **Rogelio** por todo el apoyo incondicional brindado durante mi estancia en esta universidad.

A todas aquellas personas que incondicionalmente me apoyaron en la realización de este trabajo de investigación y cumplir con una meta más.

## DEDICATORIAS

Dedico sinceramente este trabajo a mis padres, **Don Armando Antonio Guerrero Vázquez** y **Doña María de Lourdes Valencia Sosa**, porque a pesar de las dificultades que presenta la vida siempre han sabido enseñarme a salir adelante y a no rendirme. Sin su apoyo incondicional en todos los ámbitos no hubiera podido llegar a donde estoy. Muchas gracias por apoyarme incondicionalmente, este triunfo que he alcanzado también es de ustedes.

A mis hermanos, **Juan José, Verónica Jaqueline, Luis Antonio, Diana Yasmín y Brenda Roxana**. No fue fácil el camino para llegar hasta donde estoy, pero gracias a su apoyo, a su amor incondicional, a su enorme amabilidad y acompañamiento, lo difícil se hizo más fácil y llevar a feliz término este proyecto se hizo una realidad. Les agradezco, y hago eco de mi enorme aprecio hacia ustedes.

A mi familia. No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta meta se ha notado menos. Les agradezco, y hago presente mi gran afecto hacia ustedes.

A **Mayra Ramírez**, mi inspiración y mi motivación. Tu ayuda ha sido fundamental, has estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos. Este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían.

A mis amigos **Édgar, Eliseo, Rocío, Nancy y Juan Carlos** por todos los buenos momentos que hemos compartido. Creo que todos hemos aprendido y aprendemos continuamente de todos y de nosotros mismos, tanto profesional como personalmente. Y eso es enriquecedor en ambos ámbitos.

## DATOS BIOGRÁFICOS

### Datos personales

Nombre: Franco Armando Guerrero Valencia.

Fecha de nacimiento: 12 de enero de 1993.

Lugar de nacimiento: Ejido Loma Bonita, Ocosingo, Chiapas.

CURP: GUVF930112HCSRLR02

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia

Cédula Profesional: 11511915



### Desarrollo académico

Primaria (1999-2005): Escuela Primaria Enrique C. Rébsamen, Ejido Boca de Chajul, Marqués de Comillas, Chiapas.

Secundaria (2005-2008): Escuela Telesecundaria 710 Benito Juárez García, Ejido Boca de Chajul, Marqués de Comillas, Chiapas.

Bachillerato (2008-2011): Telebachillerato 72 Porfirio Díaz Mori, Ejido Boca de Chajul, Marqués de Comillas, Chiapas.

Licenciatura (2012-2017): Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Texcoco, Estado de México.

Maestría (2019-2020): Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Horticultura, Texcoco, Estado de México.

## RESUMEN

### AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum* L.

Guerrero-Valencia, Franco Armando<sup>1</sup>; Rodríguez-de la O, José Luis<sup>2</sup>

El chile es un cultivo muy importante a nivel mundial. Perteneció al género *Capsicum*, el cual forma parte de la familia Solanaceae e incluye diferentes variantes de chiles que se reconocen fácilmente por su tamaño, forma, color y grado de pungencia. Además de ser un alimento nutritivo, también es fuente de colorantes naturales y compuestos secundarios, todos ellos utilizados en la elaboración de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos. A pesar de su importancia, la producción de chiles frecuentemente se ve afectada por factores bióticos (causado por animales, plantas, hongos, bacterias, virus, etc.) y abióticos, como sequía, calor, heladas y salinidad, lo cual influye en su desarrollo, rendimiento y productividad. Existen ciertas limitaciones en el uso de las técnicas clásicas del mejoramiento genético vegetal, por ejemplo, se requiere de muchos años de trabajo para obtener plantas con caracteres deseados, no es posible controlar los genes de interés que se transfieren de los progenitores a la descendencia, y en muchos casos los resultados son inciertos. Por consiguiente, el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y la transformación genética, entre otras, proveen de alternativas viables en los programas de mejoramiento para conseguir mejores cultivares de chile. Esta revisión aborda los avances biotecnológicos que se han logrado hasta la fecha con respecto al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, transformación genética, mutagénesis, análisis de la diversidad genética, bioinformática, fitoquímica y edición genética que se han realizado en el género *Capsicum*, recalcando la importancia y aplicaciones prácticas de estos estudios en el mejoramiento genético vegetal.

**Palabras clave:** Chiles, Biotecnología, Genotecnia, Estrés, Producción, *Agrobacterium*.

<sup>1</sup>Tesista

<sup>2</sup>Director de tesis

## ABSTRACT

### BIOTECHNOLOGICAL ADVANCES IN *Capsicum* L.

Guerrero-Valencia, Franco Armando<sup>1</sup>; Rodríguez-de la O, José Luis<sup>2</sup>

Chili is an important crop worldwide. It belongs to the genus *Capsicum*, which is part of the Solanaceae family and includes different varieties of chili peppers that are recognized by their size, shape, color, and level of pungency. In addition to being a nutritious food, it is also a source of natural dyes and secondary compounds, all of them used in the elaboration of food products, cosmetics, and pharmaceuticals. Despite its importance, the production of chili peppers is often affected by biotic factors (caused by animals, plants, fungi, bacteria, viruses, etc.) and abiotic factors, such as drought, heat, frost, and salinity, which influence their development, performance, and yield. There are certain limitations in the use of the classic techniques of plant breeding, for example, it requires many years of work to obtain plants with desired characters, it is not possible to control the genes of interest that are transferred from the parents to the offspring, and in many cases the results are uncertain. Therefore, the use of biotechnological tools such as plant tissue culture and genetic transformation, among others, provide viable alternatives in breeding programs to obtain better chili cultivars. This review addresses the biotechnological advances that have been achieved to date concerning the plant tissue culture, genetic transformation, mutagenesis, genetic diversity analysis, bioinformatics, phytochemistry, and gene editing that have been performed in the genus *Capsicum*, emphasizing the importance and practical applications of these studies in plant breeding.

**Keywords:** Chili peppers, Biotechnology, Plant breeding, Stress, Production, *Agrobacterium*.

<sup>1</sup>Thesis author

<sup>2</sup>Thesis advisor

## 1. INTRODUCCIÓN

El chile es un cultivo muy importante a nivel mundial. Pertenece al género *Capsicum*, el cual forma parte de la familia Solanaceae e incluye diferentes variantes de chiles que se reconocen fácilmente por su tamaño, forma, color y grado de pungencia (Pérez-Castañeda, Castañón-Nájera, Ramírez-Meraz, & Mayek-Pérez, 2015). Este género es originario de las regiones tropicales de América, donde se distribuye desde México hasta Brasil, Paraguay y Argentina (Carrizo-García *et al.*, 2016). Consta de 35 especies, cinco de las cuales se cultivan como hortalizas: *Capsicum annum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum pubescens* Ruiz & Pavón (Barboza, Carrizo-García, Leiva-González, Scaldaferro, & Reyes, 2019; Ibiza, Blanca, Cañizares, & Nuez, 2012).

Además de ser un alimento nutritivo, también es fuente de colorantes naturales y compuestos secundarios, todos ellos utilizados en la elaboración de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos (Aguirre-Hernández & Muñoz-Ocotero, 2015). Es un cultivo importante, desde los puntos de vista cultural, agronómico, nutricional y económico (Aguirre-Mancilla *et al.*, 2017). En el año 2018 se sembraron alrededor de 3.7 millones de hectáreas destinadas a la producción de esta hortaliza a lo largo de todo el mundo (FAOSTAT, 2021).

A pesar de su importancia, la producción de chiles frecuentemente se ve afectada por factores bióticos (causado por animales, plantas, hongos, bacterias, virus, etc.) y abióticos, como sequía, calor, heladas y salinidad (Chhapekar, Jaiswal, Ahmad, Gaur, & Ramchiary, 2018), lo cual influye en su desarrollo, rendimiento y productividad.

El mejoramiento genético convencional en combinación con el uso de buenas prácticas agrícolas ha contribuido con avances sustanciales en el cultivo de chiles, ya que de este modo se han obtenido variedades con mejores características (Kothari, Joshi, Kachhwaha, & Ochoa-Alejo, 2010). Sin embargo, existen ciertas

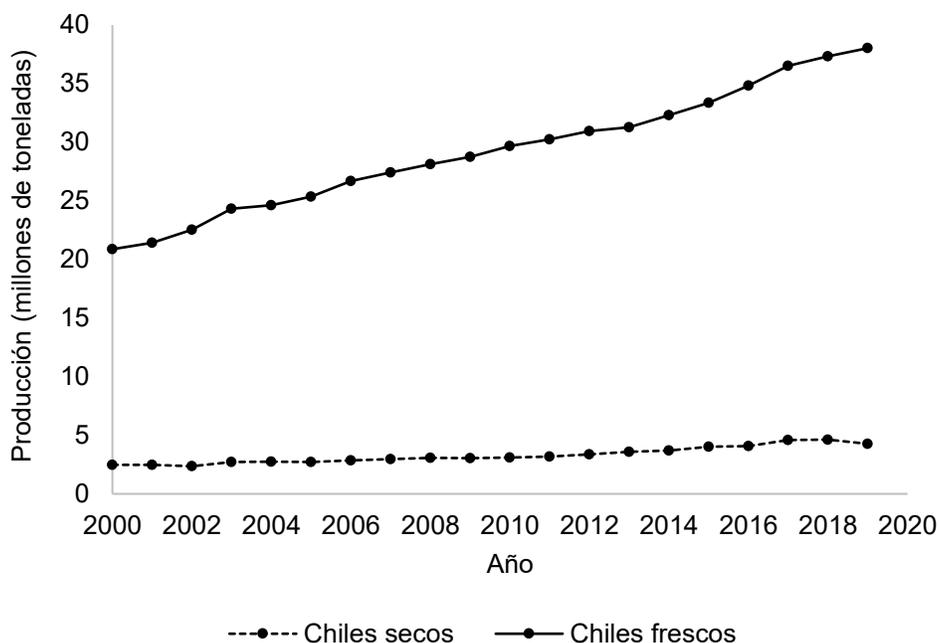
limitaciones en el uso de estas técnicas, por ejemplo, se requiere de muchos años de trabajo para obtener plantas con caracteres deseados, no es posible controlar los genes de interés que se transfieren de los progenitores a la descendencia, y en muchos casos los resultados son inciertos (Ulukan, 2009). Por consiguiente, el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y la transformación genética, entre otras, proveen de alternativas viables en los programas de mejoramiento para conseguir mejores cultivares de Chile (Kothari *et al.*, 2010). Con esta tecnología es posible crear y preservar variabilidad genética, seleccionar y clonar de genotipos superiores, eliminar bacterias y virus fitopatógenos, rescatar embriones como resultado de cruza intra e interespecíficas, preseleccionar materiales tolerantes a estrés (biótico y abiótico), y acelerar los programas de mejoramiento genético para *Capsicum* (Monteiro do Rego, Ramalho do Rego, & Barroso, 2016).

Hoy en día se dispone de la secuencia completa del genoma del Chile Criollo de Morelos (*C. annuum* cv. CM334) (Kim *et al.*, 2014), del cultivar Zunla-1 (*C. annuum* L.) y su progenitor silvestre, el chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*) (Qin *et al.*, 2014). Esta información representa grandes avances con respecto al conocimiento del Chile, lo cual permitirá a mediano plazo entender los mecanismos moleculares que modulan la forma y tamaño del fruto, la arquitectura de la planta, el contenido de capsaicina, así como también los factores que intervienen durante el ataque de plagas y enfermedades, con lo que será posible desarrollar mejores variedades en un menor tiempo utilizando las nuevas herramientas (Ahn *et al.*, 2018).

Esta revisión aborda los avances biotecnológicos que se han logrado hasta la fecha con respecto al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, transformación genética, mutagénesis, análisis de la diversidad genética, bioinformática, fitoquímica y edición genética que se han realizado en el género *Capsicum*, recalcando la importancia y aplicaciones prácticas de estos estudios en el mejoramiento genético vegetal.

## 2. IMPORTANCIA DEL CULTIVO

La producción mundial de chiles ha crecido considerablemente en las últimas dos décadas (2000-2019), de 2.4 a más de 4.2 millones de toneladas de chiles secos y de 20.8 a 38 millones de toneladas de producto fresco (Figura 1).

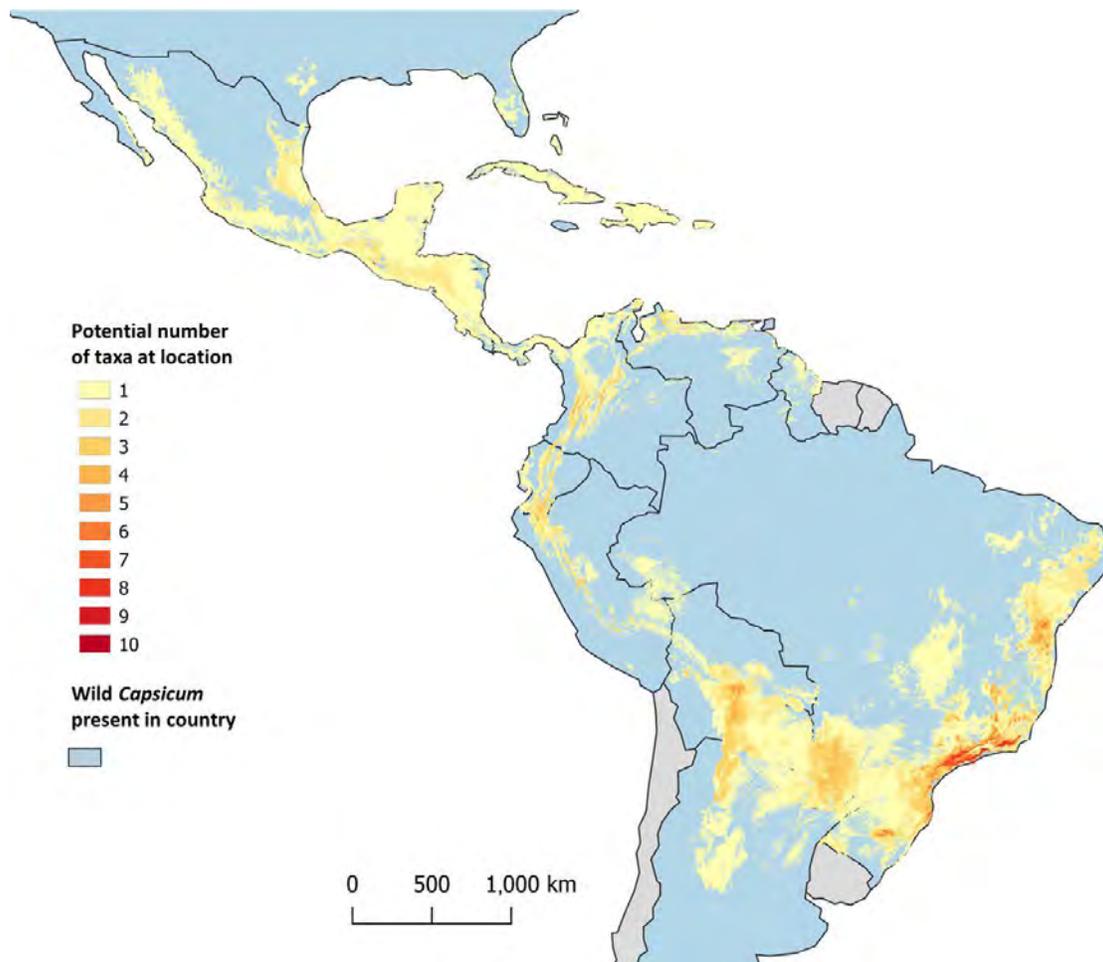


**Figura 1.** Producción mundial de chiles frescos y secos del año 2000 al 2019. Fuente: Con base en datos de FAOSTAT (2021).

El área cultivada ha seguido una tendencia similar, con un incremento de la superficie dedicada a este cultivo de alrededor del 35% en los últimos 20 años, con un total de 3.7 millones de hectáreas. Los chiles frescos se cultivan en 126 países, y el principal productor es China con 18.9 millones de toneladas anuales, seguido de México con 3.2 millones de toneladas. Los chiles secos se cultivan en 70 países y la India es el principal productor con 1.7 millones de toneladas, seguido por Tailandia con 348 mil toneladas (FAOSTAT, 2021). El valor económico de la producción mundial de chiles se ha incrementado desde 1991 y se ha convertido en una buena fuente de ingresos para los productores en muchos países, dando de este modo un rol importante en el comercio internacional (Tripodi & Kumar, 2019).

## 2.1 Origen y distribución

El género *Capsicum* L., el cual pertenece a la familia Solanaceae e incluye a otros miembros de importancia económica como el tomate (*Solanum lycopersicum*), la papa (*Solanum tuberosum*) y el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Xiao-Zhen *et al.*, 2019), es nativo de las regiones tropicales y templadas de América, donde se distribuye desde México hasta Brasil, Paraguay y el centro de Argentina (Barboza *et al.*, 2019; Carrizo-García *et al.*, 2016). Consta de 35-37 especies, cinco de las cuales se cultivan como hortalizas: *Capsicum annum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum pubescens* Ruiz & Pavón (Barboza *et al.*, 2019; Ibiza *et al.*, 2012; Khoury *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Mapa de distribución taxonómica potencial de especies silvestres de *Capsicum* L. Fuente: Khoury *et al.* (2020).

## 2.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo con Roskov *et al.* (2020), la clasificación taxonómica del género *Capsicum* es la siguiente:

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Filo:</b>	Tracheophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Solanales
<b>Familia:</b>	Solanaceae
<b>Género:</b>	<i>Capsicum</i> L.

## 2.3 Descripción botánica

### 2.3.1 Raíz

El eje radical consiste en una raíz principal vigorosa con raíces laterales localizadas en el eje. La mayoría de las raíces se localizan cerca de la superficie del suelo. Horizontalmente se distribuyen a una longitud de 30 a 50 cm y crecen de 30 a 60 cm de profundidad. En los cultivares modernos, la masa radical es relativamente pequeña en comparación con el resto de la planta. Como regla general, las raíces representan aproximadamente el 10% del peso total. Este radio declina gradualmente conforme la planta aumenta su porcentaje de hojas y tallos (Bosland & Votava, 2012).

### 2.3.2 Tallo

Los tallos son altamente variables. Los jóvenes son angulares, y usualmente se vuelven circulares en la sección transversal cuando maduran. Pueden tener antocianinas en su longitud y pueden estar presentes o no en los nudos. Pueden ser glabros, pubescentes o una gradación entre completamente glabro o pubescente (Bosland & Votava, 2012).

### 2.3.3 Hoja

La mayoría de cultivares de *C. annuum* desarrollan un tallo único, con ocho a 15 hojas antes de la aparición de la primera flor. El número de hojas que aparecen antes de la primera flor parece estar controlado por la temperatura y el genotipo. Las hojas varían en tamaño, forma y color. La mayoría son simples, enteras y simétricas. Pueden ser plantas y lisas o constreñidas y glabras. Algunas son pubescentes, como en los chiles de tipo serrano y especialmente en *C. pubescens* (Pérez-Grajales & Castro-Brindis, 2008). La lámina foliar puede ser ovada, elíptica o lanceolada (Bosland & Votava, 2012).

### 2.3.4 Flor

Las flores típicas de *Capsicum* son pentámeras, hermafroditas y de ovario súpero. La corola es rotada en la mayoría de las especies, con cinco a siete pétalos que miden de 10 a 20 mm de longitud, con excepción de *C. cardenasii* y *C. tovarii*, que tienen corolas campanuladas. El diámetro de las flores de *C. annuum* es de 10 a 15 mm, aunque en las especies silvestres son más pequeñas. La corola es de color sólido o con mancha y depende de la especie, pero la mayoría son blancas. En *C. annuum* hay un pequeño número de accesiones que tienen corolas moradas, mientras que en *C. frutescens* son de color verde claro y en *C. eximium*, *C. pubescens* y *C. cardenasii* de color púrpura (Bosland & Votava, 2012).

### 2.3.5 Fruto

Existe una gran diversidad con respecto a la forma de los frutos, tamaño y color dentro del género *Capsicum*. Entre los distintos tipos, la longitud puede variar desde menos de 1 cm hasta 32.5 cm. Los niveles de pungencia, causado por los capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) también varía entre cultivares y estados de desarrollo del fruto. Normalmente presenta semillas y tiene dos o más lóculos, cada uno dividido por una placenta central. La placenta tiene vesículas que producen los capsaicinoides, y su rol más importante es el suministro de nutrientes hacia las semillas (Bosland & Votava, 2012).

### **2.3.6 Semilla**

Las semillas son numerosas, pequeñas, aplanadas y comprimidas, suborbiculares o más o menos reniformes con el margen constreñido, la testa es reticulada-rugosa o lisa, el embrión se encuentra fuertemente curvado o circinado, endospermo carnoso, radícula terete en la parte ancha y los cotiledones semicirculares (WFO, 2021).

## **2.4 Requerimientos edafoclimáticos**

### **2.4.1 Temperatura**

Los chiles se cultivan en temporada cálida y requieren de condiciones de crecimiento similares a aquellas para el cultivo de tomate y berenjena. Los chiles se desarrollan bien en temporadas largas libres de heladas, con lo que se pueden obtener buenos rendimientos. Las plantas son altamente susceptibles a heladas y crecen muy débilmente entre los 5 y 15 °C (Bosland & Votava, 2012).

### **2.4.2 Irrigación**

En regiones con lluvias regulares y abundantes, no se requiere de riego. Sin embargo, en zonas áridas y semi-áridas, esta práctica es esencial para proveer de una humedad adecuada en el suelo, que puede ir desde los 600 hasta los 750 mm durante todo el periodo de cultivo. A pesar de que existe evidencia de que los chiles son tolerantes a sequía, los frutos tienden a constreñirse cuando existen condiciones extremas. Se sabe que los chiles son sensibles al estrés hídrico durante la floración y fructificación (Bosland & Votava, 2012).

### **2.4.3 Suelo**

Como en la mayoría de los cultivos, los suelos ideales para la producción de chiles son los profundos, bien drenados, de textura media a franco-arenosa que retengan humedad y con algo de materia orgánica. La mayoría de los chiles se cultivan en suelos con un pH entre 7.0 y 8.5 (Bosland & Votava, 2012).

## **2.5 Usos**

Pueden comerse frescos, cocidos o como condimentos en platillos típicos. En la industria se elabora una gran variedad de productos: chiles congelados, deshidratados, encurtidos y enlatados; se les encuentra en pastas y en una infinita variedad de salsas. Además, se utilizan como materia prima para la obtención de colorantes y de resinas para fines industriales. También se usan con fines medicinales (Ruiz-Bello, Nava-Tablada, Landeros-Sánchez, & Díaz-Padilla, 2016).

## **3. BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

De acuerdo con la FAO (2013), la biotecnología incluye una amplia gama de tecnologías aplicadas a la agricultura, ganadería, silvicultura, pesca y acuicultura, y la agroindustria que se utilizan para diversos fines, como el mejoramiento genético de plantas y animales para aumentar sus rendimientos o eficiencia, caracterización y conservación de los recursos genéticos para la alimentación y agricultura, diagnóstico de enfermedades de plantas y animales, desarrollo de vacunas o la producción de alimentos fermentados.

Para mejorar la calidad, productividad, utilidad y acelerar la introducción de características superiores en los productos agrícolas, la biotecnología vegetal ha desarrollado métodos para la introducción de genes exógenos en especies económicamente importantes (Prieto, Jordan, Cordeiro, & Durzan, 2005). Esto comprende todos los métodos de modificación genética, fusión de células, cruzamientos controlados, apomixia y cultivo de tejidos conducentes a la obtención de clones y a la fijación de características ventajosas propias de cada zona, región o país (Prieto *et al.*, 2005).

### **3.1 Cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales**

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es una técnica que involucra la manipulación de células, tejidos y órganos vegetales en un medio sintético y aséptico bajo condiciones controladas como la luz, temperatura y humedad (Bhojwani & Dantu, 2013; Dagla, 2012). El desarrollo del cultivo de tejidos vegetales como una ciencia fundamental estuvo muy estrechamente relacionado con el descubrimiento y caracterización de las hormonas vegetales, y ha facilitado el entendimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas (Dagla, 2012).

Las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales son diversas e incluye estudios fisiológicos, modificación de plantas, propagación clonal, formación de productos derivados del metabolismo secundario, almacenamiento de germoplasma y producción de plantas libres de patógenos (Chadipiralla, Gayathri, Rajani, & Reddy, 2020). Las plantas derivadas del cultivo de tejidos son útiles para el estudio de los mecanismos que se ven involucrados durante la regulación de algún gen en particular (Twaij, Jazar, & Hasan, 2020).

### **3.2 Transformación genética de plantas**

La ingeniería genética y otras tecnologías nuevas se encuentran entre muchos avances que se han vuelto populares en el mejoramiento tradicional de plantas, animales y microorganismos con el fin de mejorar la calidad nutritiva e incrementar la productividad. Particularmente, la ingeniería genética de plantas ha representado un punto de referencia muy importante en las ciencias agrícolas modernas. El surgimiento de la tecnología del ADN recombinante en los años 70s y el desarrollo subsecuente de las tecnologías de transferencia de material genético proveyó de grandes oportunidades a los científicos para el aislamiento y utilización de genes de interés de diversos organismos, tanto procariontes como eucariontes para conferir nuevas características en las plantas (Trigiano & Gray, 2011).

Hoy en día, las técnicas clásicas del mejoramiento genético vegetal son las que principalmente se siguen utilizando para el desarrollo de nuevas variedades. No obstante, las nuevas tecnologías en ingeniería genética ofrecen muchas ventajas, por ejemplo, las técnicas de transferencia de ADN *in vitro* permiten la introducción

de genes y otros elementos genéticos entre organismos de diferentes especies, traspasando así, las barreras biológicas (Trigiano & Gray, 2011). Por lo tanto, el uso de la ingeniería genética puede complementar y acelerar los programas de mejoramiento convencional mediante el incremento de la diversidad de los recursos genéticos, mejorar la eficiencia, y reducir los tiempos que se requieren para la fijación de características deseables en las variedades de plantas élite que ya existen (Trigiano & Gray, 2011). La ingeniería genética también permite la utilización de genes exóticos para el desarrollo de plantas transgénicas que produzcan proteínas con nuevas propiedades nutritivas, farmacéuticas, agronómicas, e industriales (Fischer & Emans, 2000).

### **3.3 Biotecnología de los chiles**

Después del redescubrimiento y confirmación del trabajo pionero de Gregorio Mendel a inicios del siglo XX, varias plantas de la familia de las solanáceas se convirtieron en objeto de investigación genética como plantas modelo, además de su importancia agrícola. Estas plantas, que primero funcionaron como modelo en investigación básica y posteriormente en genética celular y molecular, fueron los tomates, la papa, berenjena (*Solanum*), las petunias (*Petunia*) y el tabaco (*Nicotiana*) (Gebhardt, 2016). Sin embargo, los chiles no han figurado como plantas modelo, y los trabajos realizados son escasos. Particularmente en cultivo *in vitro* e ingeniería genética la información es limitada, al respecto, Kothari *et al.* (2010) mencionan que la tasa de progreso en investigación biotecnológica en el género *Capsicum* es relativamente baja con respecto a otras solanáceas debido a la alta genotipo-dependencia y a su naturaleza recalcitrante.

#### **3.3.1 Problemas asociados con la biotecnología de chiles**

Estudios preliminares indican que las plantas del género *Capsicum* son recalcitrantes con respecto al cultivo *in vitro* de células y tejidos, por lo que la manipulación bajo estas condiciones es más complicada que otras solanáceas (Kothari *et al.*, 2010; Seguí-Simarro, Corral-Martínez, Parra-Vega, & González-

García, 2011). También está documentado que durante la multiplicación *in vitro*, los brotes no se definen bien y tienden a agruparse en forma de rosetas, y las respuestas son genotipo-dependientes, por lo que la transformación genética se ve afectada.

#### **3.3.1.1 Naturaleza recalcitrante**

Se dice que una especie es recalcitrante cuando sus células, tejidos u órganos son incapaces de responder a las manipulaciones que se les realiza durante el cultivo de tejidos (Benson, 2000). Con respecto a la regeneración *in vitro*, este fenómeno puede ser uno de los mayores obstáculos para la explotación mediante el uso de la biotecnología de plantas en especies de suma importancia económica (Benson, 2000). Sin embargo, seleccionando el explante adecuado y modificando los diferentes componentes del medio de cultivo puede ayudar a superar este problema (Kothari *et al.*, 2010).

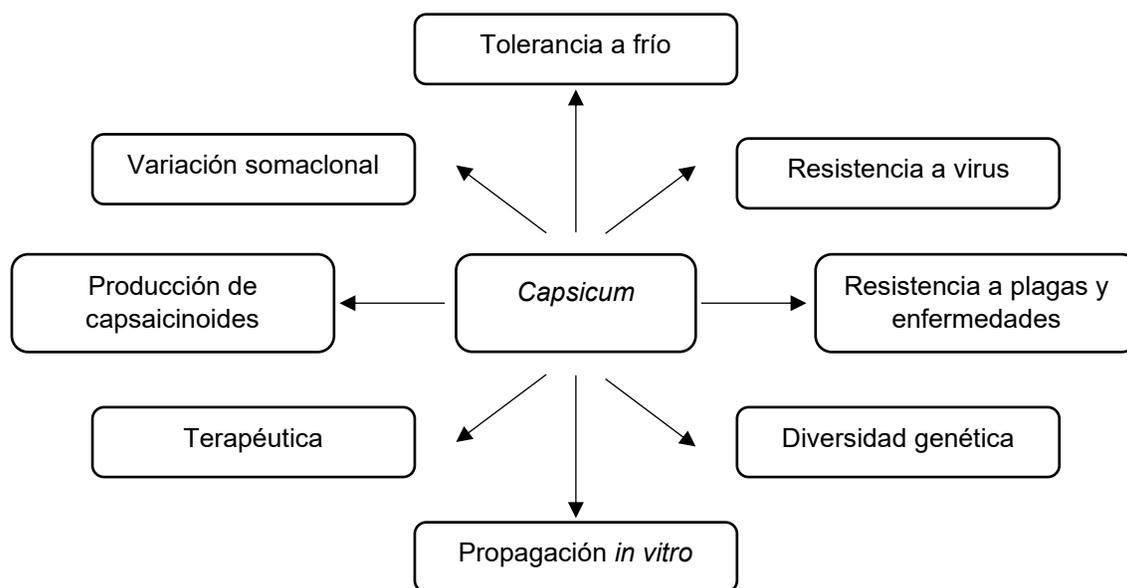
#### **3.3.1.2 Arrosetamiento de brotes adventicios**

El arrosetamiento de los brotes también es un problema muy frecuente durante el cultivo *in vitro* de chiles. Esto limita la posibilidad de multiplicar el material durante cultivo s subsecuentes debido a que no están diferenciados totalmente y es difícil separarlos. Se sabe que el etileno, el cual se puede llegar a liberar dentro de los vasos de cultivo , juega un papel muy importante durante la regeneración de nuevos brotes adventicios, provocando que estos no se desarrollen adecuadamente, por lo que el uso de nitrato de plata ha producido resultados prometedores para sobrellevar este inconveniente (Gammoudi, Pedro, Ferchichi, & Gisbert, 2018).

#### **3.3.1.3 Genotipo-dependencia**

En plantas de Chile, la genotipo-dependencia durante el cultivo *in vitro* es otra de las limitantes, y la mayoría de los estudios han sido para cultivares muy específicos, razón por la cual no se pueden usar protocolos generalizados para cualquier especie o grupo de plantas. La respuesta morfogénica está determinada por la

especie o variedad y las condiciones del medio de cultivo (Beltrán-Burboa, López-Peralta, Hernández-Meneses, & Cruz-Huerta, 2020), por lo que es necesario desarrollar metodologías para cada genotipo en particular (Haque & Ghosh, 2018).



**Figura 3.** Principales Intervenciones biotecnológicas realizadas en chiles. Fuente: modificado de Kothari *et al.* (2010).

#### 4. SISTEMAS DE REGENERACIÓN *in vitro*

A pesar de las limitaciones antes mencionadas con respecto a la biotecnología de los chiles, algunas estrategias han hecho posible la regeneración de plantas a partir de células, tejidos y órganos cultivados *in vitro* mediante organogénesis o embriogénesis (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001). Por ejemplo, el cultivo de anteras ha sido utilizado para regenerar plantas haploides y dobles haploides. Los sistemas organogénicos se han utilizado para micropropagar *in vitro*, así como también para transformación genética. La aplicación del cultivo de tejidos vegetales y la ingeniería genética en chiles ha permitido el desarrollo de cultivares resistentes a virus y estrés biótico y abiótico (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001).

##### 4.1 Organogénesis

La organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o de callos. Este proceso depende del balance de auxinas y citocininas y de la habilidad de los tejidos para responder a los reguladores de crecimiento vegetal durante el cultivo. La organogénesis sucede en tres fases, en la primera las células se vuelven competentes, en la segunda se desdiferencian y en la tercera ocurre propiamente la morfogénesis independientemente de las hormonas exógenas y puede ser de forma directa o indirecta (Stewart, 2016).

#### **4.2 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática se define como un proceso en el cual una estructura bipolar, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla a partir de una célula no cigótica sin una conexión vascular con el tejido original (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok, & Filonova, 2002). Se diferencia de la embriogénesis cigótica en que es observable, las condiciones del cultivo se pueden controlar y la escasez de material no es un factor limitante para llevar a cabo la experimentación (Quiroz-Figueroa, Rojas-Herrera, Galaz-Avalos, & Loyola-Vargas, 2006). Los embriones somáticos se utilizan como modelos para estudios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares sobre la regulación del desarrollo embrionario, así como para realizar propagación vegetativa a gran escala, por lo que ofrece grandes aplicaciones biotecnológicas (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Este proceso sucede en varias etapas e inicia con la formación de masas pro-embriogénicas, seguido por la formación de los embriones somáticos, maduración y regeneración de plantas completas (Von Arnold *et al.*, 2002). A pesar de la importancia que tiene la embriogénesis somática y de la gran cantidad de estudios que se han realizado en diversas especies, aún hay muchos aspectos que no están del todo comprendidos (Jiménez, 2005).

La embriogénesis somática en *Capsicum* se ha reportado solamente para *C. annum*, *C. chinense* y *C. baccatum*, y únicamente para un número limitado de genotipos, cultivares o variedades con eficiencias de regeneración relativamente

bajas debido a la naturaleza recalcitrante del género. Es imperativo llevar a cabo más esfuerzos para solventar los problemas asociados a esto mediante la investigación sobre la capacidad embriogénica de más especies de chiles así como de los factores que podrían influenciar las respuestas (Ochoa-Alejo, 2016).

#### **4.2.1 Tipos de explantes**

Como fuente de explantes para la inducción de embriones somáticos en chiles, se han utilizado principalmente embriones cigóticos maduros (Saadet Buyukalaca & Mavituna, 1996; López-Puc *et al.*, 2006) e inmaduros (Binzel, Sankhla, Joshi, & Sankhla, 1996; Harini & Lakshmi Sita, 1993; Jeong-Yon, Eun-Young, Dongsu, & Kwang-Woong, 1996), cotiledones (Kintzios *et al.*, 1998), segmentos de embriones cigóticos (Solís-Ramos *et al.*, 2010), primordios foliares (Kintzios *et al.*, 1998), hojas jóvenes (Kintzios, Drossopoulos, & Lympelopoulos, 2001; S. Kintzios, Drossopoulos, Shortsiianitis, & Peppes, 2000), segmentos de tallo (Khan, Siddique, & Anis, 2006), ápices (Khan *et al.*, 2006) e hipocótilos (López-Puc *et al.*, 2006).

Los embriones cigóticos inmaduros que se han utilizado como fuente de explantes han sido recolectados a partir de frutos verdes de 2 a 4 semanas después de la anthesis con una longitud de 1 a 7 mm para *C. annuum* cv. Nokkwang (Jeong-Yon *et al.*, 1996), y de 4 a 10 mm en *C. annuum* cv. Nuevo México-6 y Rajur Hirapur (Binzel *et al.*, 1996). Por otra parte, el uso de estructuras vegetativas derivadas de plántulas jóvenes ha implicado la germinación *in vitro* de semillas, por lo que estas se han cultivado en el medio MS (Khan *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007) así como de plantas desarrolladas en invernadero (S. Kintzios *et al.*, 2001, 2000; S. E. Kintzios *et al.*, 1998). Las respuestas de los explantes no se pueden generalizar para todos las especies y cultivares de chiles, ya que estas dependen principalmente del genotipo, los componentes del medio de cultivo y las condiciones de incubación.

#### **4.2.2 Componentes del medio de cultivo**

La embriogénesis somática se ha dividido tradicionalmente en dos etapas principales: inducción y expresión. En la primera, las células somáticas adquieren

características embriogénicas mediante un estado celular de completa reorganización, esto a nivel fisiológico, metabólico y de expresión génica (Jiménez, 2005). Es común que después de un cambio de condiciones (por ejemplo, medio de cultivo, composición de los reguladores de crecimiento vegetal, fuente de carbohidratos, potencial osmótico, etc.) se induzca a las células o tejidos a alcanzar el estado de expresión, en el cual las células exhiben su capacidad embriogénica y se diferencien en embriones somáticos (Jiménez, 2005).

La mayoría de estudios sobre el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal durante la embriogénesis somática se han realizado con los grupos “clásicos” (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno) mientras que otras sustancias que tienen efectos similares a estas apenas comienzan a estudiarse (ácido jasmónico, ácido salicílico, brasinoesteroides y poliaminas) (Jiménez, 2005).

#### **4.2.2.1 Inducción de callos embriogénicos**

Para la inducción de callos embriogénicos en chiles, se han utilizado principalmente auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol 3-acético (AIA), el ácido 1-naftalenacético (ANA), y citocininas como la 6-bencilaminopurina (BAP).

Buyukalaca & Mavituna (1996) cultivaron embriones cigóticos de *C. annuum* cv. Ace en un medio MS sólido suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa. Los callos embriogénicos generados fueron transferidos a un medio MS líquido con 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa para incrementar la masa. De manera general observaron que el AIA estimuló la formación de callo no embriogénico, el ANA en baja frecuencia mientras que el 2,4-D fue el que mejores resultados presentó.

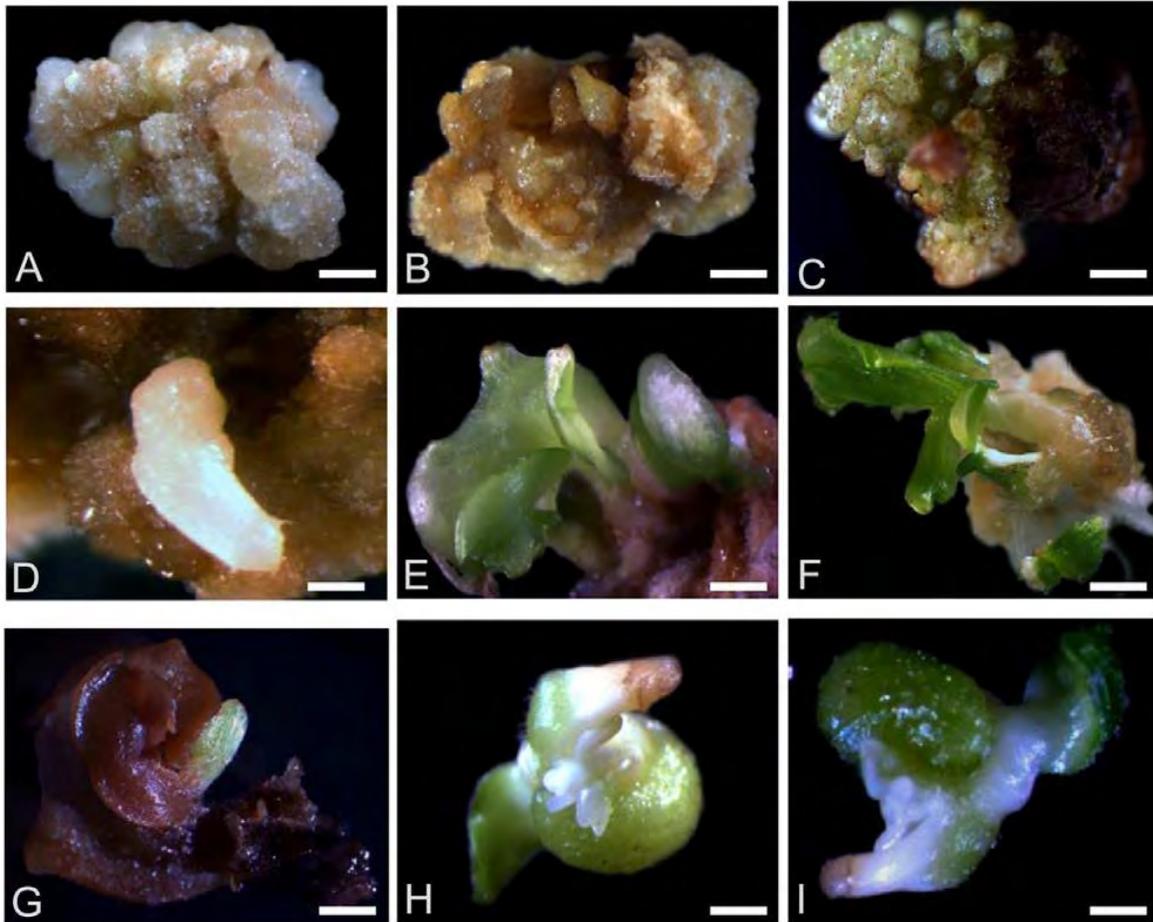
Kintzios *et al.* (1998) utilizaron cotiledones y primordios foliares de *C. annuum* cv. Colombo para inducir la formación de callos y embriones somáticos en un medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 3.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y 100 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa.

Kintzios, Drossopoulos, Shortsianitis, & Peppes (2000) partieron del uso de hojas jóvenes completamente expandidas de plántulas de *C. annuum* cv. Colombo y las cultivaron en un medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 3.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y 80 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y observaron que la formación de callos embriogénicos ocurrió dos semanas después de la siembra y fue mayor en las primeras hojas desde la base hasta el ápice cuando los explantes estuvieron en oscuridad durante tres semanas.

Kintzios, Drossopoulos, & Lympelopoulos (2001) estudiaron el efecto de diferentes vitaminas y micronutrientes inorgánicos sobre la proliferación de callo embriogénico a partir de hojas jóvenes de *C. annuum* cv. Colombo. Utilizaron un medio de cultivo MS con 3.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 80 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL en combinación con diferentes vitaminas. Los resultados indicaron que la embriogénesis somática se ve favorecida con la adición de ácido nicotínico (0.1 mg·L<sup>-1</sup>) y el incremento de la concentración de cobre.

Zapata-Castillo *et al.* (2007) usaron hipocótilos de chile habanero (*C. chinense*) y los cultivaron durante 30 días en un medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa para la inducción de callos embriogénicos. Una vez que los callos se formaron fueron transferidos a un medio líquido con 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D para obtener células en suspensión e inducir la formación de embriones somáticos.

Solís-Ramos *et al.* (2010) utilizaron segmentos de embriones cigóticos para inducir callos embriogénicos en un medio MS semisólido suplementado con 1.6 mg·L<sup>-1</sup> de ANA, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de AIA, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa. A los 60 días después de la siembra observaron estructuras proembriogénicas que se comenzaron a formar en los callos.



**Figura 4.** Estados morfológicos durante la embriogénesis somática en *C. chinense*. (A) callos de 30 días de edad del cual derivan las estructuras embriogénicas; (B) callo embriogénico (40 días); (C) callo con estructuras embriogénicas (60-70 días); (D) embriones en estado torpedo (100 días); (E) germinación de embriones (120 días); (F) embrión germinado unido al callo (150 días); (G) embrión anterior manifestando necrosis y desarrollo atrofiado (160 días); (H) embrión germinado removido del callo (120 días); (I) embrión germinado de 150 días removido del callo que formará una planta aparentemente normal. Barras de escala: A-D 1 mm, E 3 mm, F, 4 mm, G 3 mm, H 2 mm, I 3 mm. Fuente: Solís-Ramos *et al.* (2010).

#### 4.2.2.2 Embriogénesis somática directa

El primer trabajo realizado en Chile sobre embriogénesis somática fue el de Harini & Lakshmi Sita (1993), quienes utilizando embriones cigóticos inmaduros de *C. annuum* cultivados en el medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962) (MS) suplementado con 2,4-D ( $1-5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), agua de coco ( $100 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y altas concentraciones de sacarosa ( $80-100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) consiguieron regenerar directamente

embriones somáticos a los 15 días después de la siembra sin la formación de callos como proceso intermedio. Los nuevos embriones se comenzaron a formar directamente del eje embrionario de los explantes y de los bordes de los cotiledones.

Binzel, Sankhla, Joshi, & Sankhla (1996) usaron embriones inmaduros de dos cultivares de *C. annuum*, Nuevo México-6 y Rajur Hirapur, los cultivaron en un medio de cultivo MS suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $2.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ, agua de coco ( $100 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sacarosa en altas concentraciones ( $60\text{-}100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los embriones somáticos se formaron directamente a partir de los ápices, ejes y cotiledones de los explantes. Las examinaciones histológicas mostraron que también ocurrió embriogénesis secundaria desde los embriones primarios.

Del mismo modo, Jeong-Yon, Eun-Young, Dongsu, & Kwang-Woong (1996) partieron del uso de embriones inmaduros de *C. annuum* cv. Nokkwang como fuente de explantes. La generación directa de embriones somáticos (88.9%) ocurrió cuando los explantes se cultivaron en un medio MS modificado (la concentración de Fe-EDTA se redujo a la mitad) con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D después de 3 semanas de incubación en oscuridad. Los embriones se generaron desde el ápice y los cotiledones de los explantes.

Khan, Siddique, & Anis (2006) usaron segmentos de tallo y ápices de chile "Pusa Jwala" (*C. annuum*) y los cultivaron en un medio MS con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, con lo que observaron la generación directa de embriones, específicamente en la etapa globular a las dos semanas después de la siembra.

López-Puc *et al.* (2006) usaron diversos explantes de chile habanero BVII-03 (*C. chinense*) y los cultivaron en un medio MS con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. Se observó la presencia de embriones somáticos en cotiledones, embriones cigóticos e hipocótilos.

Kaparakis & Alderson (2008) cultivaron embriones inmaduros de tres cultivares de *C. annuum* en un medio MS suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $100 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de agua de coco y  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa como medio básico, al cual le añadieron distintas citocininas para evaluar el efecto sobre la capacidad embriogénica. Los

embriones somáticos se comenzaron a generar a partir de las dos semanas directamente de los meristemas apicales y los cotiledones de los explantes. No encontraron diferencias significativas con la adición de 2iP, y KIN.

Aboshama (2011) utilizó hipocótilos de dos cultivares de *C. annuum* (California Wonder y Baldy) y encontró que la generación de embriones somáticos se vio favorecida en un medio de cultivo WPM suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D o TDZ. Además, la adición de AgNO<sub>3</sub> al medio de cultivo mejora sustancialmente las respuestas.

Venkataiah, Bhanuprakash, Suman Kalyan, & Subhash (2016) desarrollaron una metodología para la generación directa de embriones somáticos de *C. baccatum* cv. PI 260434 utilizando cotiledones y hojas de plántulas germinadas *in vitro*. Para esto, utilizaron el medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de KIN y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa. Los embriones somáticos se comenzaron a formar entre 15 y 20 días después de la siembra.

#### **4.2.2.3 Maduración de embriones**

Un paso crítico durante la embriogénesis somática es el proceso de maduración. La maduración de los embriones somáticos en algunos casos se ha llevado a cabo en el mismo medio de inducción de embriogénesis somática (Binzel *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2006). En otros, se ha realizado con el uso de 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de ácido absísico (López-Puc *et al.*, 2006) y 3.4 mg·L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub> (Jeong-Yon *et al.*, 1996) y con la mitad de la concentración de las sales inorgánicas del medio de cultivo MS (Saadet Buyukalaca & Mavituna, 1996). Aboshama (2011) utilizó 0.1 mg·L<sup>-1</sup> de ABA, 500 mg·L<sup>-1</sup> de L-glutamina y 200 mg·L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada para madurar embriones somáticos de dos cultivares de *C. annuum* (California Wonder y Baldy). Venkataiah *et al.* (2016) usaron 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP para madurar embriones cigóticos de *C. baccatum* en etapa de torpedo.

#### **4.2.2.4 Germinación de embriones**

En *C. annuum* cv. California Wonder, Harini & Lakshmi Sita (1993) lograron germinar embriones somáticos exitosamente con el uso de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, los cuales desarrollaron raíces y brotes a los 15 días y generaron plantas completamente normales una vez que se aclimatizaron. Binzel *et al.* (1996) usaron  $1.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ ,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  o  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ para germinar embriones de dos cultivares de *C. annuum* (Nuevo México-6 y Rajur Hirapur) y se desarrollaron plantas normales una vez que se transfirieron a macetas. López-Puc *et al.* (2006) lograron germinar embriones de chile habanero (*C. chinense*) con  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$ .

### **4.3 Cultivo de anteras para la generación de haploides**

Una planta haploide es aquella que tiene un número cromosómico gametofítico y un doble haploide es un haploide que ha sufrido una duplicación de sus cromosomas (Germanà, 2011). La producción de haploides y dobles haploides mediante embriogénesis gamética permite el desarrollo de líneas completamente homocigóticas a partir de material heterocigótico en un tiempo relativamente corto en comparación con los métodos convencionales los cuales emplean varias generaciones de autofecundación (Germanà, 2011). La producción de haploides provee de una herramienta biotecnológica muy atractiva, y el desarrollo de técnicas y protocolos ha tenido un impacto significativo en los sistemas agrícolas. Actualmente, esta estrategia representa una parte integral de los programas de fitomejoramiento de muchas especies de importancia agronómica (Germanà, 2011).

Los programas tradicionales de mejoramiento genético de chiles son procesos a largo plazo y muy demandante de labores debido al control que se debe tener en la polinización y a la necesidad de aislamiento para prevenir la degeneración del material seleccionado (Irikova, Grozeva, & Rodeva, 2011). Esto se podría sobrellevar mediante los métodos de cultivo *in vitro* para la generación de plantas haploides. En chiles, la generación de haploides incluye la inducción y regeneración de embriogénesis gamética a partir del cultivo de anteras o microesporas. No obstante, todavía no se tiene un protocolo eficiente para todas las especies dentro

de este género y existe variabilidad en los resultados obtenidos (Irikova *et al.*, 2011), por lo que es necesario ajustar los factores que intervienen en este proceso para cada material en particular.

El cultivo *in vitro* de anteras para la regeneración de plantas haploides de Chile inicia en la década de los 70 con los trabajos pioneros de Wang, Sun, Wang, & Chien (1973) con *C. annuum* cv. Yeo Hsien Small Red Pepper, y George & Narayanaswamy (1973) con *C. annuum* var. *grossum*. Desde entonces, existen diversos reportes donde se han estudiado los distintos factores con el fin de mejorar la eficiencia de los protocolos.

#### **4.3.1 Condiciones de crecimiento y edad de la planta**

Las anteras para la generación de haploides mediante el cultivo *in vitro* de microesporas se pueden obtener de plantas crecidas en campo o bajo condiciones controladas (Irikova *et al.*, 2011). Ercan, Sensoy, & Sirri Sensoy (2006) mencionan que la edad de la planta, el genotipo y la temporada de recolección de las anteras afecta el desarrollo *in vitro*.

#### **4.3.2 Estado de desarrollo de la microespora**

El estado de desarrollo de los granos de polen es un factor complejo que influye fuertemente sobre el éxito del cultivo de anteras. La capacidad embriogénica difiere según la especie, pero de manera general, el periodo de sensibilidad para inducir esto se encuentra entre la primera mitosis y la etapa bicelular media (Germanà, 2011).

Wang, Li, & Jiang (1981) estudiaron el efecto del estado del desarrollo de los granos de polen de *C. annuum* y *C. annuum* var. *grossum* y encontraron que durante la etapa uninucleada se presentan las mejores respuestas embriogénicas. Supena, Suharsono, Jacobsen, & Custers (2006) obtuvieron las mejores respuestas cuando los botones florales tenían más del 50% de los granos de polen en etapa unicelular tardía, mientras que Lantos *et al.* (2009) cuando el 80% se encontraba en etapa uninucleada y el 20% en binucleada. Por consiguiente, la mayoría de estudios que

se han realizado, han utilizado los granos de polen cuando se encuentran en estas etapas (Kim *et al.*, 2008).

### **4.3.3 Medio de cultivo**

Existen varios medios de cultivo que se han utilizado para la inducción de embriogénesis gamética en Chile, aunque ha predominado el uso del medio MS y el de Dumas de Vaulx, Chambonnet, & Pochard (1981). La composición final del medio de cultivo se modifica principalmente cambiando la concentración y combinación de reguladores de crecimiento y otros suplementos, como sacarosa, aminoácidos y algunas vitaminas.

#### **4.3.3.1 Reguladores de crecimiento vegetal**

Se ha reportado el uso de ANA ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), KIN ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y BAP ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Wang *et al.*, 1981), así como bajas concentraciones de 2,4-D, picloram o AIA ( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en combinación con KIN o BAP ( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Munyon, Hubstenberger, & Phillips, 1989). Qin & Rotino (1995) probaron anteras de 17 cultivares de *C. annuum* (picantes y no picantes) y las cultivaron en un medio MS suplementado con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN y en  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP. (Supena *et al.*, 2006) usaron  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de zeatina en combinación con  $0.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA durante el cultivo de anteras de varios materiales de *C. annuum* de Indonesia. Olszewska, Kisiala, Niklas-Nowak, & Nowaczyk (2014) trabajaron con 17 genotipos de chiles (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* var. *pendulum*; *C. frutescens* x *C. chinense*, y *C. frutescens* x *C. baccatum*) y observaron las mejores respuestas con el uso de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN y a los 14 días después incrementarse a  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### **4.3.3.2 Suplementos del medio de cultivo**

El uso de sacarosa como fuente de carbono en concentraciones de 30 a 60 ha producido buenos resultados, además de  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de caseína hidrolizada (Wang *et al.*, 1981). La adición de 10 a  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de maltosa, y el enriquecimiento del aire

con  $900 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  generó buenas respuestas en pimiento morrón (*C. annuum*) (Dolcet-Sanjuan, Claveria, & Huerta, 1997). Otro compuesto que mejora sustancialmente las respuestas durante el cultivo de anteras es el  $\text{AgNO}_3$ , y se ha usado en dosis de  $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Buyukalaca, Comlekcioglu, Abak, Ekbic, & Kilic, 2004). También se ha reportado el uso de carbón activado en dosis de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Supena *et al.*, 2006).

#### **4.3.4 Tratamiento de estrés por temperatura**

Kristiansen & Andersen (1993) mencionan que un tratamiento de  $26.4^\circ\text{C}$  a las plantas donadoras de anteras promueve una mayor formación de embriones gaméticos durante el cultivo *in vitro*. La incubación durante una semana a  $9^\circ\text{C}$  ayuda a generar un mayor porcentaje de callos embriogénicos (Supena *et al.*, 2006). Koleva-Gudeva, Spasenoski, & Trajkova (2007) evaluaron distintas condiciones de temperatura y luz en *C. annuum* y encontraron que mediante la incubación de las anteras a  $35^\circ\text{C}$  en oscuridad durante ocho días, seguido de cuatro días en luz (12 horas a  $25^\circ\text{C}$  se generaron embriones).

#### **4.3.5 Determinación del nivel de ploidía**

Para evaluar el origen y nivel de ploidía de las plantas de chile regeneradas mediante cultivo *in vitro* de anteras se han utilizado diversas herramientas, como citometría de flujo (Keleş *et al.*, 2015; Nowaczyk, Nowaczyk, & Olszewska, 2015; Nowaczyk & Kisiała, 2006), caracterización con isoenzimas (Munyon *et al.*, 1989) y marcadores moleculares de tipo SSR (Keleş *et al.*, 2015; Parra-Vega, Renau-Morata, Sifres, & Seguí-Simarro, 2013).

#### **4.3.6 Duplicación del genoma haploide**

En algunos casos, las plántulas derivadas del cultivo *in vitro* de anteras presentan un genoma diploide homogéneo, lo cual sugiere una duplicación espontánea del material genético (Luitel & Kang, 2013). En otros casos, esto se induce mediante el uso de colchicina, como lo reportan Wang *et al.* (1981), quienes usaron un

tratamiento de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 24 horas, mencionando que las plantas regeneradas fueron totalmente fértiles.



**Figura 5.** Desarrollo de regenerantes androgénicos a través del cultivo *in vitro* de anteras de *Capsicum* spp. (A) Embriones emergiendo de anteras de un genotipo híbrido. (B) plántula. (C) aclimatación de planta androgénica en invernadero. Fuente: Olszewska *et al.* (2014).

#### 4.4 Rescate de embriones

El cultivo de embriones ha tenido muchas aplicaciones significativas en el fitomejoramiento, así como también en estudios básicos de fisiología y bioquímica vegetal. El rescate y cultivo de embriones inmaduros es una técnica particularmente atractiva para la recuperación de plantas derivadas de cruza sexuales en donde la mayoría de los embriones cigóticos no pueden sobrevivir *in vivo* o se vuelven latentes por largos periodos de tiempo (Sahijram & Rao, 2015; Shen, Gmitter, & Grosser, 2011). En Chile no se han realizado muchos estudios al respecto, por lo que la información es limitada y los que existen han sido con el objetivo de realizar introgresión génica mediante hibridación entre distintas especies (Manzur, Fita, Prohens, & Rodríguez-Burruezo, 2015), y para acortar los tiempos entre cruza durante el mejoramiento genético.

Hossain, Minami, & Nemoto (2003) usaron un medio MS suplementado con  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de caseína hidrolizada,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de extracto de levaduras,  $150 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de

agua de coco,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA para recuperar embriones cigóticos de un híbrido entre *C. annuum* y *C. frutescens*, y observaron que el mejor momento para coleccionar los embriones se encontró entre los 28 y 33 días después de la polinización. Para confirmar el origen interespecífico de las plantas recuperadas usaron marcadores moleculares de tipo RAPD.

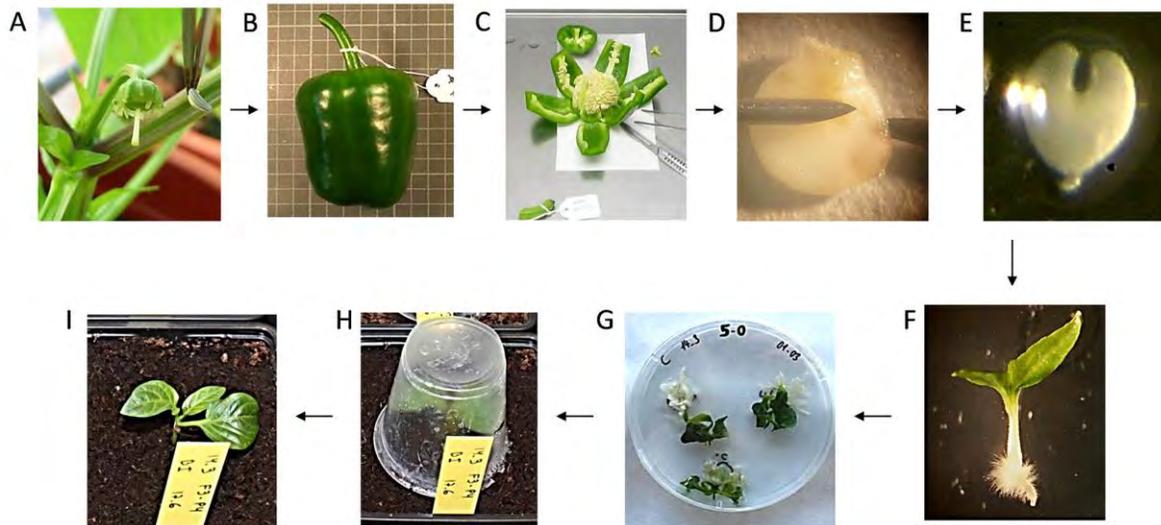
Jae, Dong, Jae, & Hyo (2006) usaron el rescate de embriones para realizar introgresión génica desde *C. baccatum* hacia *C. annuum* mediante hibridación, debido a que con los métodos convencionales los embriones son abortados. Los embriones fueron coleccionados entre 15 y 50 días después de la polinización y los cultivaron en un medio MS suplementado con  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y  $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, mientras que las plántulas regeneradas fueron cultivadas sin reguladores de crecimiento y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa.

Debbarama, Khanna, Tyagi, Rai, & Meetei (2013) realizaron cruces interespecíficas entre *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, y coleccionaron los embriones derivados de esto entre 27 y 33 días después de la polinización para cultivarlos en un medio MS suplementado con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. Para comprobar el origen interespecífico realizaron una caracterización morfológica y molecular con marcadores de tipo RAPD.

Manzur, Penella, & Rodríguez-Burruezo (2013) evaluaron el efecto de los genotipos, el estado de desarrollo de los embriones y la composición del medio de cultivo en 10 materiales de distintas especies de chiles (4 de *C. annuum*, 2 de *C. chinense*, 1 de *C. frutescens*, 2 de *C. baccatum* y 1 de *C. pubescens*). Encontraron que las respuestas dependen altamente del genotipo y que los embriones responden mejor cuando se encuentran más desarrollados, mientras que, con respecto a la composición del medio, una concentración de  $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa y la mitad de las sales MS favorecieron de mejor forma el desarrollo de los embriones *in vitro*.

Manzur, Calvache-Asensio, & Rodríguez-Burruezo (2014) usaron embriones inmaduros de 4 genotipos de *C. annuum* y evaluaron el efecto de la incubación con luz y oscuridad, además de la combinación de diversos reguladores de crecimiento.

Observaron que cuanto mayor sea el estado de desarrollo del embrión, mayores las respuestas, pero en etapa globular (la más temprana) se puede mejorar si se combina con el uso de bajas concentraciones de AIA y ZEA ( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada una) y un periodo de incubación inicial de cinco días en oscuridad.



**Figura 6.** Diagrama del proceso de cultivo *in vitro* de embriones de pimienta “California Wonder”: (A) autopolinización; (B) frutos inmaduros recién cosechados para extraer los embriones; (C) esterilización de los frutos y semillas; (D-E) escisión de los embriones, identificación del estado de desarrollo y siembra *in vitro*; (F) desarrollo del embrión y germinación; (G) evaluación de la plántula; (H-I) aclimatación. Fuente: Manzur *et al.* (2014).

## 4.5 Cultivo de protoplastos

Un protoplasto es una célula vegetal aislada en la cual la pared celular ha sido removida mediante métodos mecánicos o enzimáticos. Los protoplastos son un buen modelo para el estudio de diversos aspectos de la biotecnología moderna. Gracias a esto se han realizado estudios en genómica, proteómica y metabolómica. Actualmente existen procedimientos para la obtención y cultivo de protoplastos de varias especies (Davey, Anthony, Power, & Lowe, 2005).

### 4.5.1 Aislamiento

El aislamiento de protoplastos comúnmente se ha realizado mediante el uso de enzimas que digieren la pared celular de los vegetales. Saxena, Gill, Rashid, & Maheshwari (1981) aislaron protoplastos de *C. annuum* cv. Yolo Wonder a partir de células del mesófilo derivadas de plántulas de 15 días de edad, las cuales fueron colocadas en una solución del 2% de celulasa (Onozuka R10), 0.4% de Macerozima (R10) y 0.5 M de manitol durante 8 a 10 horas. Díaz, Moreno, & Power (1988) usaron brotes (de 3.5 a 4.0 cm de longitud) de plántulas germinadas *in vitro* de 4 genotipos de *C. annuum* (Americano, Dulce Italiano, Florida y Nigrum) y uno de *C. chinense*, los colocaron durante una hora en un medio CPW13M para plasmolizarlos y enseguida los incubaron en una solución enzimática conformada por 1% de celulasa Onozuka R10 y 0.25% de Macerozima durante 14 horas en oscuridad a 25 °C. Prakash, Sankara Rao, & Kumar (1997) usaron hojas jóvenes de tres semanas de edad para aislar protoplastos de *C. annuum* cv. California Wonder, las cuales fueron cortadas en piezas de 2 a 3 mm de longitud e incubadas durante la noche en una solución conformada por las sales CPW (Power & Chapman, 1985), manitol (9%), 0.2 mg·L<sup>-1</sup> de KIN, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 2% de celulasa R10 y 0.5 % de Macerozima R10. Kue-Jae & Wang (2003) probaron distintos tiempos de incubación y proporciones de enzimas digestivas (celulasa y Macerozima) para aislar protoplastos de hojas de *C. annuum* var. *accumnatum* y *C. frutescens* cv. Bird chilli y encontraron que una mezcla de 2% de celulasa, 0.4% de Macerozima y 13% de manitol durante tres horas de incubación genera el mayor rendimiento de protoplastos aislados.

#### **4.5.2 Cultivo**

Saxena *et al.* (1981) usaron el medio NT o DPD con 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, ANA y BAP para cultivar protoplastos de *C. annuum* cv. Yolo Wonder, los cuales se comenzaron a dividir mitóticamente y formar callosa a partir del cuarto día después de la incubación. Prakash *et al.* (1997) utilizaron 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de ANA y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de BAP para generar callos a partir de protoplastos de *C. annuum* cv. California Wonder, los cuales se comenzaron a formar a partir de los 45 días después de la siembra.

### **4.5.3 Hibridación somática**

La hibridación somática en plantas mediante la fusión de protoplastos se ha convertido en una herramienta importante para el fitomejoramiento, permitiendo a los investigadores la combinación de células somáticas (total o parcial) de diferentes cultivares, especies o incluso géneros dando como resultado nuevas combinaciones genéticas (Grosser, Calovi, & Louzada, 2010). Con respecto a chiles, esta estrategia podría ayudar de manera sustancial a generar nuevos materiales aprovechando la diversidad genética que existe en los sitios de distribución natural del género *Capsicum*, pero actualmente no existen reportes de esta temática.

### **4.5.4 Regeneración de plantas**

Saxena, Gill, Rashid, & Maheshwari (1981) aislaron protoplastos de *C. annuum* cv. Yolo Wonder a partir de células del mesófilo. Los protoplastos se comenzaron a dividir mitóticamente y formar callos en un medio NT o DPD con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D, ANA y BAP. A partir de los callos se regeneraron plantas completas sin complicaciones. Prakash *et al.* (1997) usaron  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AG3, y  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP para inducir la formación de nuevos brotes a partir de callos derivados del cultivo de protoplastos y los enraizaron con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP.

## **5. ETAPAS DEL CULTIVO *in vitro* DE CHILES**

El éxito del cultivo *in vitro* se debe ampliamente a que este proceso se separa en etapas de acuerdo con los diferentes estados de desarrollo, y en cada una de estas se manipula la composición del medio de cultivo y el control del ambiente (Davies, Geneve, Wilson, Hartmann, & Kester, 2018). Se reconocen cuatro etapas para la mayoría de las plantas: Establecimiento, se colocan los explantes en un medio de cultivo aséptico; Multiplicación, se induce la formación de brotes múltiples;

Enraizamiento, se induce la formación de raíces en los brotes obtenidos durante la multiplicación; Aclimatización, las plántulas enraizadas se cambian a un ambiente heterotrófico (Davies *et al.*, 2018).

## **5.1 Etapa I (establecimiento)**

El primer paso en cualquier programa exitoso de cultivo *in vitro* es la selección de una fuente de explantes adecuada. Casi cualquier tejido u órgano vegetal se puede usar como explante, pero el grado de éxito obtenido depende del sistema de cultivo usado, el genotipo, y la remoción de contaminantes del explante (Torres, 1989). El objetivo principal del establecimiento es la obtención de un gran porcentaje de explantes libres de patógenos mediante la desinfestación del material vegetal (Davies *et al.*, 2018; Torres, 1989).

### **5.1.1 Fuente de material vegetal**

El primer trabajo relacionado con el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales con plantas de Chile fue realizado por Gunay & Rao (1978), quienes utilizaron semillas de dos variedades de pimiento (*Capsicum annuum*) y un híbrido de *Capsicum frutescens* durante el establecimiento, las cuales fueron puestas a germinar en el medio de cultivo MS. De igual modo, diversos autores (Beltrán-Burboa *et al.*, 2020; Christopher & Rajam, 1994; Ebida & Hu, 1993; Gogoi, Acharjee, & Devi, 2014; Golegaonkar & Kantharajah, 2006; Haque & Ghosh, 2018; N. Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno, 1990; Sripichitt, Nawata, & Shigenaga, 1987) reportan la germinación *in vitro* de semillas como etapa inicial del proceso para la obtención de distintos tipos de explantes.

### **5.1.2 Desinfestación del material vegetal**

Partiendo del uso de semillas como fuente de material vegetal, estas se han desinfestado mediante el uso de etanol (70%), cloro comercial (20-30%), cloruro de mercurio (0.1%), Tween 20<sup>®</sup> (0.5%) y algunos fungicidas como Benlate<sup>®</sup> (4.0 g·L<sup>-1</sup>), Captán<sup>®</sup> (4 g·L<sup>-1</sup>) y Bavistin<sup>®</sup> (2.5%) (Beltrán-Burboa *et al.*, 2020; Haque & Ghosh,

2018; Santana-Buzzy *et al.*, 2005; Sharma, Kumar, Giridhar, & Ravishankar, 2008). Todas las soluciones se preparan con agua destilada estéril y entre cada cambio de agente desinfectante se realizan de tres a cinco enjuagues con agua destilada estéril.

### **5.1.3 Obtención de explantes**

De las plántulas derivadas de semillas germinadas *in vitro* se han utilizado como explantes a los cotiledones, hipocótilos, yemas apicales, hojas jóvenes y segmentos nodales (Beltrán-Burboa *et al.*, 2020; Christopher & Rajam, 1994; Golegaonkar & Kantharajah, 2006; Gunay & Rao, 1978; Haque & Ghosh, 2018; Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno, 1990; Sripichitt *et al.*, 1987). También se han utilizado segmentos de hoja de plántulas en condiciones de invernadero, lo cual posee la ventaja de que se obtiene mayor cantidad de explantes sin la necesidad de utilizar grandes cantidades de semilla (Kim & Lim, 2019).

## **5.2 Etapa II (multiplicación)**

Gunay & Rao (1978) utilizaron cotiledones e hipocótilos de plántulas germinadas *in vitro* de tres variedades de chile y encontraron una fuerte interacción entre BAP y AIA durante la inducción de brotes. Sripichitt *et al.* (1987) observaron más apropiados a los explantes de cotiledones de 12 días de edad en pimiento (*Capsicum annuum*) cultivados en un medio MS suplementado con  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP (11.9 brotes por explante). Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno (1990) reportan el uso de hipocótilos como fuente de explantes en 16 variedades de chile (*Capsicum annuum*), y mencionan que la capacidad de regeneración de nuevos brotes adventicios se encuentra fuertemente influenciada por el genotipo. Ebida & Hu (1993) evaluaron la capacidad morfogénica de cotiledones, yemas apicales, hipocótilos y raíces de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum*) y encontraron que los cotiledones generan mayor número de brotes con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, las yemas apicales con  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y los hipocótilos con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, mientras que las raíces no demostraron poseer

capacidad de regeneración de nuevos brotes. Utilizando yemas apicales, Christopher & Rajam (1994) obtuvieron hasta 11 brotes axilares en *Capsicum praetermissum* con el uso de  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TIBA, mientras que en *Capsicum annum* las mejores respuestas se obtuvieron con  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TIBA con una media de 8 brotes, lo que también indica que las respuestas se encuentran fuertemente influenciadas por el genotipo. Por su parte, Golegaonkar & Kantharajah (2006) evaluaron cinco cultivares de *Capsicum annum* y observaron que los explantes de hojas jóvenes poseen mayor capacidad de formación de nuevos brotes adventicios. Gogoi *et al.* (2014) trabajaron con el cultivar Bhut Jalakia (*Capsicum chinense*) y lograron obtener 4.0 brotes utilizando cotiledones como explantes, con  $7.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $3.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN, mientras que con yemas apicales obtuvieron 5.0 brotes con  $3.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $13.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN. Haque & Ghosh (2018) elaboraron un protocolo para la multiplicación *in vitro* de 10 materiales de chiles (*Capsicum annum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens*) provenientes de la India y México, encontrando que la formación de brotes múltiples depende en gran medida del genotipo. Beltrán-Burboa *et al.* (2020) cultivaron segmentos nodales de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP en combinación con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA, en donde tuvieron las mejores respuestas con una media de 6.6 brotes.

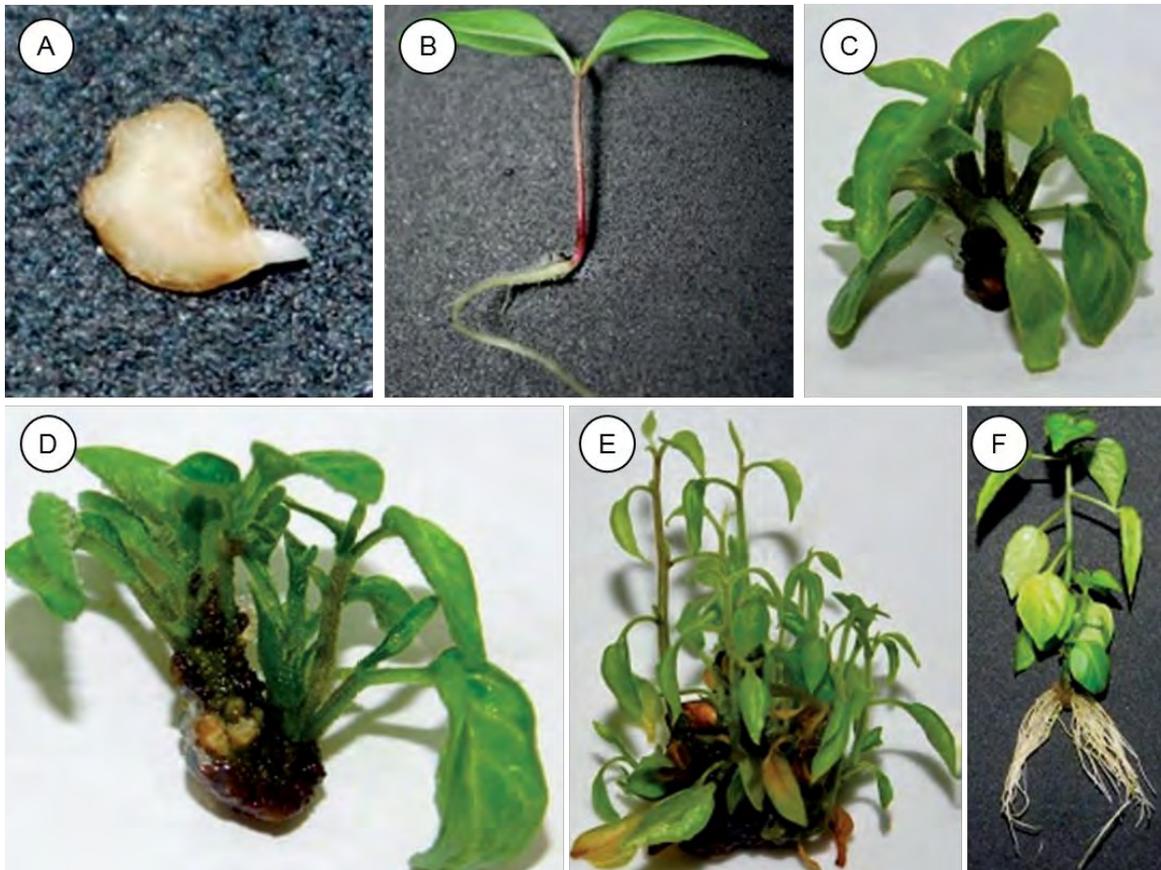
### **5.3 Etapa III (enraizamiento)**

Sripichitt *et al.* (1987) lograron enraizar brotes de pimiento (*Capsicum annum*) con la adición de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA o ANA, indicando que es posible regenerar plántulas completas después de 7 semanas de cultivo *in vitro*. Ebida & Hu (1993) lograron enraizar un 70% de brotes adventicios de pimiento (*Capsicum annum*) con la adición de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA o  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA después de un mes de cultivo. Christopher & Rajam (1994) utilizaron  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA y observaron que la capacidad de enraizamiento de *Capsicum praetermissum* y *Capsicum annum* se ve fuertemente afectada por la presencia de citocininas utilizadas durante la multiplicación, ya solo entre el 40 y 50% de los brotes obtenidos durante la multiplicación con BAP o KIN lograron enraizar, mientras que los tratados con TIBA

enraizaron hasta un 100%. Con el cultivar Bhut Jalakia (*Capsicum chinense*), Gogoi *et al.* (2014) lograron enraizar brotes derivados de cotiledones con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA obteniendo hasta 8.67 raíces por explante, mientras que en aquellos derivados de yemas apicales fue de 16.67 con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB. Barrales-López, Robledo-Paz, Trejo, Espitia-Rangel, & Rodríguez-De La O (2015) estudiaron diversas variables durante el enraizamiento de chile habanero (*Capsicum chinense*) y encontraron que las plántulas se desarrollaron mejor bajo una intensidad luminosa de  $28 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Haque & Ghosh (2018) observaron que el uso de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  AIB y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ANA provocó un efecto estimulante durante el enraizamiento de 10 materiales de chiles (*Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens*), además, la adición de  $0.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de espermidina al medio de cultivo mejoró sustancialmente la capacidad de formación de nuevas raíces, obteniendo así mejores resultados. Beltrán-Burboa *et al.* (2020) obtuvieron 80% de enraizamiento y un promedio de 4.82 raíces en brotes de chile (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) con el uso de  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB.

#### **5.4 Etapa IV (aclimatización)**

Ebida & Hu (1993) aclimatizaron exitosamente plántulas de pimiento (*Capsicum annuum*) en invernadero utilizando contenedores plásticos con sustrato comercial para vegetales. Christopher & Rajam (1994) utilizaron como sustrato una mezcla de suelo y vermiculita (3:1) durante la aclimatización de *Capsicum praetermissum* y *Capsicum annuum*, y cuatro semanas después, las transfirieron directamente al suelo, y obtuvieron una sobrevivencia del 86% en donde todas las plantas fueron completamente normales. Gogoi *et al.* (2014) consiguieron un 40% de sobrevivencia al aclimatizar plántulas del cultivar Bhut Jalakia (*Capsicum chinense*) en contenedores plásticos con un sustrato conformado por arena, suelo y estiércol de ganado bovino (1:1:1). Haque & Ghosh (2018) aclimatizaron 10 cultivares de chiles (*Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens*) en macetas con una mezcla comercial de sustrato hortícola y observaron que la capacidad de sobrevivencia de las plántulas se encuentra influenciada por el genotipo, en donde varió desde 40.0 hasta 86.7%.



**Figura 7.** Germinación *in vitro* de chile chiltepin y regeneración de plantas por organogénesis. (A) Germinación a los 12 días en medio MS al 50%; (B) Plántula de dos semanas de edad; (C) Inducción de brotes en segmentos nodales; (D) Multiplicación de brotes; (E) Alargamiento de brotes cultivados; (F) Planta enraizada después de cuatro semanas. Fuente: Beltrán-Burboa *et al.* (2020).

## 6. VARIACIÓN SOMACLONAL

Los avances realizados con las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales han hecho posible la regeneración de varias especies vegetales mediante métodos de micropropagación y actualmente existen varios protocolos para cultivos de importancia económica (Krishna *et al.*, 2016). La propagación y preservación de clones de genotipos élite, seleccionados por sus características sobresalientes, requieren de un alto grado de uniformidad genética (Krishna *et al.*, 2016). Sin embargo, esto puede generar variabilidad genética, es decir, variación somaclonal

como resultado de mutaciones o cambios epigenéticos, aunque, por el contrario, es una fuente de nuevas variantes con características agronómicas deseables (Bairu, Aremu, & van Staden, 2011).

### **6.1 Identificación de variantes somaclonales**

Hossain, Konisho, Minami, & Nemoto (2003) realizaron una caracterización morfológica y molecular (RAPD) para observar la presencia de variantes de plantas de *C. annuum* cv. Takanotsume y Shishitou derivadas del cultivo *in vitro*, y encontraron cambios en el habido de crecimiento, color de los tallos, hojas y frutos, así como también en los patrones de pigmentación por antocianinas en los frutos inmaduros. También se ha observado que la variación somaclonal es muy dependiente del genotipo (Anu, Babu, & Peter, 2004) y ocurre con mayor frecuencia en callos embriogénicos (debido al uso de 2,4-D) y menor en sistemas de regeneración por organogénesis directa (Bello-Bello *et al.*, 2014).

### **6.2 Aprovechamiento de las variantes**

Se ha reportado la aparición de características agronómicas superiores como floración precoz e incremento en los rendimientos de *C. annuum* cv. Takanotsume y Shishitou por efecto del cultivo de tejidos vegetales (Hossain *et al.*, 2003), lo cual puede aprovecharse eficientemente en programas de mejoramiento genético. De manera similar, Al-Ajeel, Al-Hattab, & El-Kaaby (2016) detectaron variantes de *C. annuum* con mejores características agronómicas, y mayor contenido de vitamina C.

## **7. MUTAGÉNESIS**

El primer paso durante el fitomejoramiento es la identificación de genotipos adecuados que contengan genes de interés entre los materiales existentes. En la naturaleza, las variaciones ocurren principalmente por producto de mutaciones, y, sin este fenómeno, la creación de nuevos materiales sería imposible (Oladosu *et*

*al.*, 2016). A pesar de que las mutaciones ocurren espontáneamente, la frecuencia con que esto sucede es muy baja como para ser aprovechada en programas de mejoramiento genético. No obstante, también es posible inducir estos cambios en el ADN mediante métodos físicos y químicos (Parry *et al.*, 2009). El agente mutagénico causa rupturas en el ADN genómico y durante el proceso de reparación, se inducen aleatoriamente nuevas mutaciones, las cuales son heredables. Estos cambios también pueden ocurrir en los genomas de los organelos presentes en el citoplasma (cloroplastos y mitocondrias), lo que da como resultado en variaciones genéticas que se pueden aprovechar en programas de mejoramiento genético mediante la selección de características útiles, por ejemplo, forma y color de las flores, resistencia a plagas y enfermedades, floración precoz, entre otras (Chaudhary, Deshmukh, & Sonah, 2019; Jain, 2010).

### **7.1 Métodos físicos**

En las últimas 8 décadas, los mutágenos físicos, principalmente la radiación ionizante, se han utilizado ampliamente para inducir aberraciones heredables y más del 70% de las variedades mutantes han sido desarrolladas utilizando estos agentes (Oladosu *et al.*, 2016). La radiación se define como una forma de energía que se mueve a través de una distancia en forma de ondas o partículas, y contienen (relativamente) altos niveles de energía (en el espectro electromagnético), capaces de mover electrones de la órbita nuclear de los átomos, convirtiéndolos de este modo en iones. Estos agentes ionizantes del espectro electromagnético incluyen los rayos X, gamma y cósmicos. Los rayos X fueron los primeros en ser utilizados para inducir mutaciones y desde entonces, varias partículas subatómicas (neutrones, protones, partículas alfa y beta) han sido generadas utilizando reactores nucleares (Oladosu *et al.*, 2016).

Uno de los primeros reportes sobre el uso de mutágenos físicos en Chile fue el de Katiyar (1978), quien utilizó rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) para irradiar semillas de *C. annuum* a 5, 10, 15 y 20 kR, con lo que observó anomalías en los cromosomas durante la meiosis, incluyendo aglutinamiento, asociación alterada, rompimiento,

segregación desigual y microesporas deformes y sus frecuencias fueron dependientes de la dosis empleada. Rao & Lakshmi (1980) irradiaron con rayos gamma semillas de dos cultivares de *C. annuum* (el CA 960 de color rojo y el CA 1968 de color amarillo) en dosis de 10 a 40 kR y llegaron a conclusiones similares. Joshi & Khalatkar (1981) utilizaron  $^{60}\text{Co}$  como fuente de rayos gamma para tratar semillas de *C. annuum* en dosis de 2 a 20 kR, en donde observaron que a dosis bajas incrementaron el tamaño y número de semillas por fruto, mientras que con las dosis más altas estas variables se redujeron. Bhargava & Umalkar (1989) irradiaron semillas de *C. annuum* “Ankur-1” con rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ , 5-20 kR) y observaron que, a mayor dosis de radiación, menor es el tamaño de frutos, el número de ramas y la altura de las plantas. Sri Devi & Mullainathan (2011) indujeron mutaciones en *C. annuum* “K1” con el uso de rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ , 10-50 kR), con lo que obtuvieron distintos mutantes en cuanto a hábitos de crecimiento, deficiencias en la síntesis de clorofila en las hojas y androesterilidad.

## **7.2 Métodos químicos**

Se considera generalmente que los mutágenos químicos provocan un efecto más suave en las plantas. Una ventaja de estos es que se pueden utilizar sin equipos o instalaciones complejas. El procedimiento comúnmente consiste en sumergir el material vegetal en una solución con el ingrediente activo. No obstante, los mutágenos químicos normalmente son cancerígenos, por consiguiente, es necesario tomar precauciones y utilizar equipo de protección adecuado para evitar daños en la salud. A pesar de que existen muchos compuestos químicos que inducen mutaciones, solo un pequeño número de estos se han probado en plantas, entre los que figuran los agentes alquilantes como etil metano sulfonato (EMS), 1-metil-1-nitrosourea y 1-etil-1-nitrosourea (Oladosu *et al.*, 2016).

Bhargava & Umalkar (1989) utilizaron EMS (0.05-0.15%) y azida de sodio (AS) (0.005-0.015%) para tratar semillas de *C. annuum* “Ankur-1” y observaron que, a mayor dosis de los agentes químicos, menor es el tamaño de frutos, el número de ramas y la altura de las plantas. Paran, Borovsky, Nahon, & Cohen (2007) trataron

semillas de *C. annuum* “Maor” con EMS (0.2%), con lo que consiguieron distintos mutantes en cuanto al tipo de ramificación y arquitectura de la planta. Sri Devi & Mullainathan (2011) indujeron mutaciones en *C. annuum* “K1” con el uso de EMS (10-50 mM), con lo que obtuvieron distintos mutantes en cuanto a hábitos de crecimientos, deficiencias en la síntesis de clorofila en las hojas y androesterilidad.

## **8. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA**

Las plantas cultivadas evolucionan en forma natural y a través de la intervención humana, y se basa principalmente en la existencia de diversidad genética en las poblaciones (Bhandari et al., 2017; H. Zhang, Mittal, Leamy, Barazani, & Song, 2017). La diversidad genética se puede definir como el grado de diferenciación dentro o entre especies. La existencia de diferencias intra e interespecíficas es la base de todos los programas de mejoramiento genético. En este contexto, el conocimiento sobre los aspectos de la diversidad genética, como aquellos factores que la afectan, los diferentes métodos para su análisis y medición, así como también los programas informáticos utilizados para estos fines se vuelven imperativos en orden de utilizarlos prudentemente (Bhandari et al., 2017).

### **8.1 Métodos de análisis de la diversidad genética**

Un análisis de diversidad genética se puede realizar mediante caracterización morfológica, citológica, bioquímica y molecular. Los marcadores morfológicos fueron los primeros en utilizarse, y hoy en día siguen vigentes. Después se utilizaron las diferencias citológicas y bioquímicas para evaluar estas diferencias entre genotipos. Con el surgimiento de las herramientas genómicas, los marcadores moleculares se convirtieron en el método preferido para estos fines (Bhandari et al., 2017).

#### **8.1.1 Marcadores moleculares**

Esto involucra el estudio de la variación entre distintos genotipos a nivel de ADN y ARN. Existe distintos tipos de marcadores moleculares, los cuales tienen distintas características, lo que los hace adecuados para diferentes propósitos (Bhandari *et al.*, 2017).

#### **8.1.1.1 RAPD**

Paran, Aftergoot, & Shifriss (1998) estudiaron las relaciones genéticas en 34 cultivares de diferentes tipos de chiles (*C. annuum*) con el uso de 21 iniciadores RAPD, con lo que separaron distintos grupos de acuerdo con el tamaño de los frutos y su nivel de pungencia, y encontraron un polimorfismo de 22% (1.6 productos polimórficos por iniciador). Rodríguez, Berke, Engle, & Nienhuis (1999) evaluaron 134 accesiones de seis especies de chiles (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. chacoense* y *C. pubescens*) con 25 iniciadores RAPD, con lo que detectaron 124 bandas polimórficas y lograron separar las accesiones de acuerdo con su especie. Baral & Bosland (2002) estudiaron 111 accesiones de chiles (*C. annuum* var. *annuum*) provenientes de Nepal y 28 de México y Estados Unidos de América con el uso de 18 iniciadores RAPD, con lo que obtuvieron 146 bandas polimórficas entre todas las accesiones, agrupando a las accesiones según su origen geográfico. Rabelo da Costa *et al.* (2006) cuantificaron la diversidad genética entre 70 materiales de *Capsicum* originarios de Brasil con 8 iniciadores RAPD, distinguiendo mediante esta técnica identificar a 53 individuos (16 de *C. annuum*, 7 de *C. frutescens*, 14 de *C. baccatum* y 5 de *C. chinense*). Bhadragoudar & Patil (2011) caracterizaron 45 accesiones de *C. annuum* del estado de Karnataka, India, con el uso de 25 iniciadores RAPD, con lo que consiguieron un promedio de 3.9 bandas polimórficas y 2.25 monomórficas, concluyendo que existe un nivel alto de diversidad genética entre los materiales estudiados.

#### **8.1.1.2 SSR**

Ibarra-Torres, Valadez-Moctezuma, Pérez-Grajales, Rodríguez-Campos, & Jaramillo-Flores (2015) utilizaron 24 marcadores SSR para diferenciar entre

genotipos de *C. annuum* y *C. pubescens*, así como también entre variedades de tipo jalapeño y serrano de *C. annuum*, con lo que lograron diferenciar adecuadamente entre especies, no obstante, entre variedades de *C. annuum* esto no fue posible. Con el uso de 24 pares de iniciadores SSR, Carvalho *et al.* (2017) evaluaron la diversidad genética entre 103 accesiones de *C. frutescens* originarias de Brasil, y otras 20 de distintas especies de *Capsicum* como referencia, encontrando un polimorfismo desde 0.36 hasta 0.75, con un promedio de 0.57. Sharmin, Hoque, Haque, & Khatun (2018) caracterizaron 20 genotipos locales de chiles (*Capsicum* spp.) de Bangladesh con 11 iniciadores SSR, encontrando un total de 10 alelos para cinco loci polimórficos y la diversidad genética varió desde 0.333 hasta 1.000 con un promedio de 0.567.

#### **8.1.1.3 ISSR**

Ibarra-Torres *et al.* (2015) utilizaron ocho iniciadores ISSR para analizar genotipos de *C. annuum* y *C. pubescens*, así como también entre variedades de tipo jalapeño y serrano de *C. annuum*, con lo que lograron determinar diferencias moleculares entre las dos especies y las dos variedades de *C. annuum*. Alemu, Mullualem, & Adugna (2017) evaluaron la diversidad genética de 73 accesiones de chiles (*Capsicum* spp.) utilizando cinco iniciadores ISSR, con lo que obtuvieron 37 bandas en total, de las cuales 35 fueron polimórficas (94.6%). Tsaballa *et al.* (2015) trabajaron con 30 accesiones criollas de *C. annuum* originarias de Grecia y evaluaron su diversidad genética utilizando 6 iniciadores ISSR, con lo que lograron separar los materiales en 8 grupos utilizando 53 bandas detectadas, con un porcentaje de polimorfismo del 83.6%. Thuy, Ky, Ba, Hien, & Yeap (2016) utilizaron 15 iniciadores ISSR para estudiar la diversidad genética de 16 variedades de chiles utilizadas como portainjertos (*Capsicum* spp.) originarias de Vietnam, con lo que obtuvieron un total de 136 bandas, 102 de las cuales fueron polimórficas, diferenciando claramente a los materiales entre especies y variedades. Por su parte, López-Espinosa *et al.* (2018) estudiaron la diversidad genética de 60 accesiones criollas de chile habanero (*C. chinense*) de la península de Yucatán y Tabasco mediante el uso de 3 iniciadores ISSR, detectando un total de 32 bandas, de las

cuales el 98% fueron polimórficas, concluyendo que la diversidad genética de las poblaciones es alta, en donde el 95.5% de la variación observada se encontró dentro de estas y solo el 4.5% entre ellas. Brilhante *et al.* (2021) utilizaron 69 accesiones de cuatro especies de chiles (*C. chinense*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* y *C. annuum*) colectadas en Brasil para evaluar su diversidad mediante el uso de 17 iniciadores ISSR, con lo que obtuvieron un total 150 fragmentos amplificados, de los cuales 134 fueron polimórficos (90%), siendo *C. chinense* y *C. baccatum* las especies con mayor polimorfismo (88.8%), seguido de *C. frutescens* (56.6%) y *C. annuum* (26.9%).

#### **8.1.1.4 AFLP**

Paran *et al.* (1998) estudiaron las relaciones genéticas en 34 cultivares de chiles (*C. annuum*) con 10 combinaciones de iniciadores AFLP, con lo que observaron un porcentaje de polimorfismo del 13% y un promedio de 6.5 marcadores polimórficos. Toquica, Rodríguez, Martínez, Duque, & Tohme (2003) evaluaron 71 accesiones de 4 especies de chiles (*C. chinense*, *C. baccatum*, *C. annuum* y *C. frutescens*) procedentes de la región amazónica de Colombia con el uso de 4 combinaciones de marcadores AFLP, con lo que consiguieron separar las accesiones en 4 grupos, observando que la variación genética total fue relativamente baja, con un índice de diversidad de 0.331. Guzmán, Ayala, Azurdia, Duque, & De Vicente (2005) trabajaron con 74 accesiones de chiles pertenecientes a 4 especies (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*) (34 accesiones de traspatio y 40 del banco de germoplasma de la Universidad de San Carlos de Guatemala) con el uso de tres combinaciones de iniciadores AFLP, y observaron un total de 68 bandas polimórficas, concluyendo que los huertos de traspatio son una alternativa viable de conservación de recursos fitogenéticos. Baba *et al.* (2016) estudiaron la diversidad genética entre 71 accesiones de *C. chinense* originarias de Brasil con el uso de tres combinaciones de marcadores AFLP, encontrando un total de 302 bandas polimórficas.

#### **8.1.1.5 RFLP**

Lefebvre, Palloix, & Rives (1993) evaluaron la diversidad genética entre 13 accesiones de *C. annuum* (incluyendo materiales criollos de *C. annuum* var. *annuum* y cultivares de pimiento) y una de *C. baccatum* var. *pendulum* (control) con el uso de marcadores RFLP (ADN genómico digerido con 10 enzimas de restricción), con lo que observaron mayor grado de diferenciación entre *C. annuum* var. *annuum* y *C. baccatum* var. *pendulum* (diferenciación interespecífica).

#### **8.1.1.6 Métodos filogenéticos**

Antes del advenimiento de las tecnologías de secuenciación de ADN, los árboles filogenéticos se usaban casi exclusivamente para describir las relaciones entre especies en sistemática y taxonomía. Hoy en día, las filogenias se utilizan en casi todas las ramas de la biología (Yang & Rannala, 2012). Más recientemente, la filogenética molecular se ha convertido en una herramienta indispensable para las comparaciones de genomas. En este contexto, se utiliza para clasificar secuencias metagenómicas, identificar genes, elementos reguladores y ARN no codificantes en genomas recién secuenciados, interpretar genomas individuales modernos y antiguos, y reconstruir genomas ancestrales (Yang & Rannala, 2012).

En el género *Capsicum*, este enfoque se ha utilizado para estudiar su monofilia, delimitar especies dentro del género y para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies (Walsh & Hoot, 2001). Por ejemplo, Sun *et al.* (2014) evaluaron la diversidad genética entre 26 variedades de *C. annuum* y cuatro de *C. eximium* mediante el uso de la región *ITS1-5.8S-ITS2*, con lo que observaron que cada especie formó un grupo independiente por sí misma. Por otra parte, Carrizo-García *et al.* (2016) realizaron un estudio más profundo sobre la filogenia de este género, utilizando un total de 34 especies (de alrededor de 37) utilizando dos marcadores del genoma cloroplástico (*matK* y *psb-trnH*) y uno nuclear (*waxy*), corroborando el origen monofilético, y la separación en 11 clados bien definidos.

## **9. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA**

La transformación genética ha proporcionado un enfoque alternativo para los programas de fitomejoramiento de los chiles. La principal ventaja de la utilización de la transformación genética es que ofrece de una alternativa para superar las barreras genéticas intra o interespecíficas y permite la incorporación de genes útiles o nuevas características en el genoma de los chiles (Srivastava & Mangal, 2019). La naturaleza recalcitrante del género *Capsicum* también afecta a los sistemas de transformación genética, por lo que la aplicación de las tecnologías del ADN recombinante se torna más difícil en estas especies (Kothari *et al.*, 2010). En el caso de los chiles, la transformación genética mediada por *Agrobacterium* es ciertamente una herramienta importante que facilita el mejoramiento genético con el fin de obtener variedades resistentes contra diversos factores que limitan la producción. No obstante, los avances en esta área se han visto limitados debido a la baja eficiencia de regeneración *in vitro* (Kothari *et al.*, 2010).

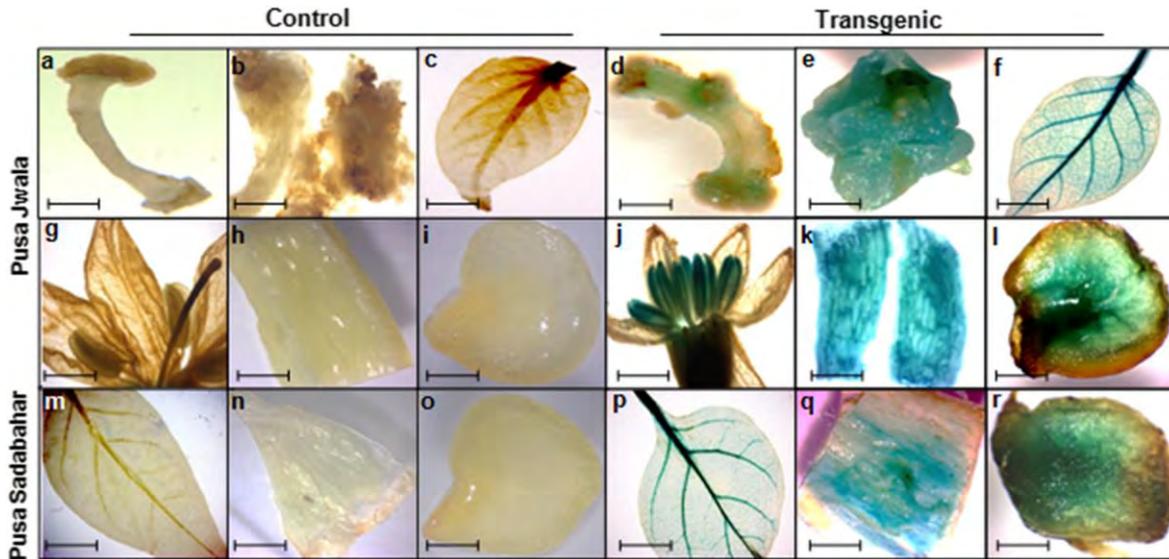
### **9.1 Transformación genética mediada por *Agrobacterium***

El primer estudio realizado sobre modificación genética de chile utilizando *Agrobacterium* fue realizado por Liu, Parrott, Hildebrand, Collins, & Williams (1990), quienes transformaron cotiledones e hipocótilos de pimiento (*Capsicum annuum*) y observaron actividad del gen reportero *GUS*, sin embargo, no lograron regenerar plantas completas. Manoharan, Vidya, & Sita (1998) utilizaron cotiledones durante la transformación genética de chile Pusa Jwala (*Capsicum annuum*) y la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pBI121, el cual porta dentro del T-DNA los genes *GUS* y *NPTII*, obteniendo varias líneas transgénicas independientes que fueron aclimatizadas en invernadero. Li, Zhao, Xie, Zhang, & Luo (2003) utilizaron la cepa LBA4404 con el plásmido pBI121 y transformaron cotiledones de *Capsicum annuum*, en donde obtuvieron una eficiencia de transformación del 40.8%. Kumar, Sharma, Chattopadhyay, & Chakraborty (2012) introdujeron el gen  $\beta$ C1 del virus del enrollamiento de la hoja del chile en el genoma del pimiento rojo (*Capsicum annuum*) con el uso de la cepa EHA 105 de *Agrobacterium* y el plásmido pBinAR $\beta$ C1, indicando que todas las plantas

transgénicas que regeneraron fueron fenotípicamente igual a las no transgénicas cuando se cultivaron en suelo. Maligeppagol *et al.* (2016) trabajaron con el factor de transcripción *Dreb1A* de *Arabidopsis thaliana*, le insertaron el promotor *rd29A* que es inducible por sequía, y lo fusionaron al plásmido pCAMBIA 2301 para transformar dos cultivares de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, en donde obtuvieron líneas transgénicas que mostraron una mayor tolerancia al estrés hídrico. Bulle, Yarra, & Abbagani (2016) transformaron cotiledones de chile “G4” (*Capsicum annuum*) con el gen *TaNHX2* de trigo, el cual insertaron en el plásmido pBin438 y la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, obteniendo plantas tolerantes a estrés salino. Shivakumara *et al.* (2017) utilizaron el gen *PDH45* de chícharo para transformar plántulas de chile (*Capsicum annuum*), el cual fue insertado en el plásmido pBI121 y colocado en la cepa EHA 105 de *Agrobacterium*, con lo que obtuvieron plantas tolerantes a diversos tipos de estrés abiótico, como sequía, salinidad, y estrés oxidativo. Ortega *et al.* (2018) desarrollaron plantas transgénicas de chile (*Capsicum annuum*) resistentes a glifosato bajo un enfoque intergénico, en donde utilizaron el mismo gen (*CaEPSPS*) mutado de la enzima EPSPS de chile utilizando su propio promotor y el 35S del virus del mosaico de la coliflor, con lo que obtuvieron plantas moderadamente resistentes al herbicida. Mahto, Sharma, Rajam, Reddy, & Dhar-Ray (2018) desarrollaron un protocolo para la transformación genética de dos cultivares de chile (*Capsicum annuum*) con el uso de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido pCAMBIA2301, con lo que obtuvieron varias líneas transgénicas independientes y una eficiencia de transformación del 30%.

## **9.2 Transformación genética por biobalística**

Chee, Lycett, Khoo, & Chin (2017) insertaron el gen de vainillina sintasa (*VpVAN*) mediante bombardeo de partículas en hipocótilos de chile “Hot Lava” (*Capsicum frutescens*), y observaron que la expresión heteróloga de este gen en los callos transformados dio como resultado un incremento en los niveles de vainillina y vainillina glucósido de casi 200 veces, con respecto a los tejidos no transformados.



**Figura 8.** Ensayos histoquímicos con el gen reportero *GUS* en plantas transgénicas de *C. annuum* cv. Pusa Jwala (A-I) y Pusa Sadabahar (M-R). (A y D) explantes de hipocótilos; (B y E) explantes de cotiledones; (C, F, M y P) hojas maduras; (G y J) flores; (H, K N y Q) epicarpio de frutos maduros; (I, L, O y R) semillas inmaduras. Barras de escala: 200  $\mu$ m. Fuente: Mahto *et al.* (2018).

## 10. BIOINFORMÁTICA

Las ciencias ómicas y la bioinformática son herramientas esenciales para el entendimiento de los sistemas moleculares que controlan el funcionamiento de las plantas (Mochida & Shinozaki, 2011; Rhee, Dickerson, & Xu, 2006). Este conocimiento es fundamental para permitir el aprovechamiento de los recursos biológicos mediante el desarrollo de nuevos cultivares con características mejoradas a bajos costos tanto económicos como ambientales (Vassilev, Leunissen, Atanassov, Nenov, & Dimov, 2005). Hoy en día se dispone de la secuencia completa del genoma del chile criollo de Morelos (*C. annuum* cv. CM334) (Kim *et al.*, 2014), del cultivar Zunla-1 (*C. annuum* L.) y su progenitor silvestre, el chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*) (Qin *et al.*, 2014). Esta información representa grandes avances con respecto al conocimiento del chile, lo cual permitirá a mediano plazo entender los mecanismos moleculares que modulan la forma y

tamaño del fruto, la arquitectura de la planta, el contenido de capsaicina, así como también los factores que intervienen durante el ataque de plagas y enfermedades, con lo que será posible desarrollar mejores variedades en un menor tiempo utilizando las nuevas herramientas (Ahn *et al.*, 2018).

### **10.1 Análisis de transcriptomas**

Antes de la publicación del primer genoma de Chile, Góngora-Castillo *et al.* (2012) publicaron un transcriptoma de dos cultivares de *C. annuum* (Serrano Tampiqueño 74 y Sonora Anaheim), el cual incluye librerías de ADNc derivadas de diferentes órganos (raíces, tallos, hojas, flores y frutos) y distintas condiciones de estrés. Las secuencias ensambladas constan de un total de 32,314 contigs y 59,991 singletons. Esta base integra información comprensiva incluyendo anotaciones funcionales, ontología de genes y procesos metabólicos.

Lee *et al.* (2020) realizaron un estudio del transcriptoma de *C. annuum* cv. Bukang bajo el efecto de cuatro fitohormonas principales (ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y ácido abscísico) mediante secuenciación de ARN de alto rendimiento, con lo que generaron un total de 78 muestras de tres réplicas y seis tiempos, constituyendo un total de 187.8 Gb de datos transcriptómicos. Los datos de este transcriptoma proveen de información valiosa para el entendimiento de las relaciones y redes moleculares que regulan la expresión de genes relacionados con las fitohormonas que se encuentran involucrados en el desarrollo vegetal y la adaptación al estrés ambiental.

### **10.2 Identificación de genes**

Tang *et al.* (2019) realizaron una caracterización sobre los genes mitocondriales responsables de la terminación de la transcripción (*mTERFs*) en *C. annuum*, con lo que encontraron 35 genes (*CaMERFs*), divididos en ocho grupos principales. El análisis de los promotores de estos genes reveló la presencia de muchos elementos

*cis* relacionados con la regulación de la respiración celular, fotosíntesis, regulación de fitohormonas y respuestas a estrés.

Arce-Rodríguez, Martínez, & Ochoa-Alejo (2021) realizaron una identificación de la familia génica de factores de transcripción *MYB* en *C. annuum*, encontrando un total de 235 proteínas no redundantes. La comparación de secuencias de *CaMYBs* con otras especies reveló que los genes son conservados, así como algunos potencialmente especializados. Los perfiles de expresión en tejidos mostraron que se expresan diferencialmente, sugiriendo que son divergentemente funcionales. Además, existen algunos candidatos que podrían estar participando en la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides, lignina, capsaicinoides, carotenoides y vitamina C, lo que provee de nuevas pistas sobre el rol de los estos factores de transcripción en el metabolismo secundario.

## **11. CASO DE ESTUDIO: RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* Leonian**

El oomiceto filamentoso *Phytophthora capsici* es un patógeno vegetal altamente dinámico y destructivo, el cual ataca a cucurbitáceas (pepino, melón, calabaza), tomate, berenjena y chiles (Lamour, Stam, Jupe, & Huitema, 2012). En este último los problemas pueden presentarse en todos los estados de desarrollo y tejidos, en donde causa varios síntomas, incluyendo la pudrición de raíces, corona y frutos, marchitamiento, daños a los tallos y damping-off en estado de plántula. Este patógeno presente en el suelo causa una enfermedad multicíclica que vive en tejidos vivos (biotrófico) y muertos (necrotrofico), causando de este modo un problema persistente especialmente en aquellas regiones donde se cultivan chiles de manera repetitiva (Kim *et al.*, 2008), siendo uno de los principales problemas fitosanitarios de este cultivo en todo el mundo, lo que resulta a menudo en pérdidas totales (Barchenger, Lamour, & Bosland, 2018).

La incidencia y severidad de esta enfermedad se ha incrementado significativamente en las últimas décadas y el uso indiscriminado de productos de

síntesis química para su manejo no constituye una opción sustentable debido a su alto costo de aplicación en campo, daños potenciales al ambiente y al desarrollo de resistencia (Pang *et al.*, 2013; Parra & Ristaino, 2001; Wang *et al.*, 2020), por lo que es necesario el uso de otras alternativas viables a largo plazo. Entre estas, la resistencia genética es una opción sustentable para enfrentar el problema fitosanitario y a la vez reducir el uso de fungicidas y la degradación del ambiente, por lo que es necesaria la identificación de nuevas fuentes de resistencia, sobre todo en los materiales criollos, con el fin de ayudar al desarrollo de nuevos cultivares (Morán-Bañuelos, Aguilar-Rincón, Corona-Torres, & Zavaleta-Mejía, 2010; Retes-Manjarrez *et al.*, 2020).

### **11.1 Fuentes de resistencia**

Desde los años 60 se han reportado algunos materiales resistentes a este patógeno, entre ellos el AC2258, PI201232 y PI201234 (*C. annuum*) originarios de Centro América (Kimble & Grogan, 1960), y el Criollo de Morelos 334 (CM334) (*C. annuum*) de México (Guerrero-Moreno & Laborde, 1980). Entre estas variedades, el CM334 ha sido el más estudiado debido a que es el que tiene el mayor nivel de resistencia (Bonnet *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2014; Quirin *et al.*, 2005). Recientemente, Retes-Manjarrez *et al.* (2020) encontraron seis materiales criollos (cuatro accesiones *C. annuum* de tipo Piquín y Jalapeño y dos de *C. pubescens*) altamente resistentes en poblaciones nativas de 14 estados de México, con niveles similares a CM334. Estas fuentes de resistencia podrían aportar nuevas fuentes de variación con posibilidad de utilizarse para el desarrollo de nuevos cultivares paralelamente con mejores rendimientos y calidad de frutos.

### **11.2 Mecanismos de resistencia**

La expresión de la resistencia a *P. capsici* en chiles se ve influenciada por muchos factores ambientales como el cultivar y la edad, dosis del inóculo, temperatura, humedad del suelo, cepa del patógeno, método de inoculación y la patogenicidad del aislado. Debido a estos factores, *P. capsici* es un patógeno complicado de

controlar, y el desarrollo de cultivares mediante métodos convencionales no ha sido exitoso (Kim *et al.*, 2008).

Diversos estudios han reportado las bases genéticas de la resistencia a *P. capsici* en chiles. Estudios previos sobre la resistencia de CM334 sugirieron varios modelos, como la participación un gen dominante (Walker & Bosland, 1999), dos genes recesivos situados en cromosomas distintos (Guerrero-Moreno & Laborde, 1980), dos dominantes (Reifschneider, Boiteux, Vecchia, Poulos, & Kuroda, 1992), y hasta tres genes dominantes de CM334 (Ortega, Español, & Zueco, 1991). Después se concluyó que la herencia poligénica junto con mecanismos aditivos o epistáticos controlan este fenómeno (Bartual, Carbonell, Marsal, Tello, & Campos, 1991; Lefebvre & Palloix, 1996).

Los estudios explicativos sobre la acción particular de los genes de resistencia iniciaron con los experimentos de Egea, Pérez, & Candela (1996), quienes detectaron la presencia de capsidiol (un tipo de fitoalexina derivada de la ruta de los terpenoides) en cultivares susceptibles y resistentes, indicando que el grado de resistencia se debe principalmente a la capacidad de movilización de este metabolito hacia las zonas necróticas causadas por el patógeno. Más tarde, Silvar, Merino, & Díaz (2008) demostraron que existe un incremento en los niveles de expresión de los genes *CaBPR1* (una clase de proteínas relacionadas con la patogénesis), *CaBGLU* (una forma básica de  $\beta$ -1,3-glucanasa, enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos), *CaPO1* (una peroxidasa) y *CaSC1* (sesquiterpeno ciclasa, enzima participante en la biosíntesis de capsidiol), correlacionados con la capacidad de respuesta ante la invasión. Otros genes detectados incluyen *CaChi2* (con actividad quitinasa), *CaPR-4*, *CaPR-10* (Sang, Kim, & Kim, 2010), *PAL* (fenilalanina amonio liasa) (Zhang *et al.*, 2013) y *CaRGA2* (Zhang *et al.*, 2013).

En un estudio transcriptómico, Wang *et al.* (2015) analizaron la expresión diferencial del genotipo resistente PI201234 bajo el ataque de *P. capsici*, con lo que observaron un total de 1220 genes, de los cuales 480 aumentaron sus niveles de expresión y 740 disminuyeron, con 211 posibles candidatos involucrados en las respuestas de

defensa. El análisis posterior de 12 de estos genes confirmó que siete se encuentran involucrados en la modificación de la pared celular, biosíntesis de fitoalexinas, desarrollo de síntomas, y mecanismos de señalización de fitohormonas.

### 11.3 Alternativas biotecnológicas

Los recursos moleculares para el estudio de *P. capsici* han ido en aumento, lo que ha logrado que hoy en día se disponga de dos genomas de referencia (Lamour *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2021). Del mismo modo, la disponibilidad de los distintos genomas y transcriptomas de Chile que se tienen provee de herramientas para el análisis de genes y grupos de genes que se han reportado con funciones durante la invasión del patógeno a través de las distintas herramientas biotecnológicas. Por ejemplo, una alternativa viable es el análisis, identificación y caracterización de las proteínas relacionadas con la patogénesis en plantas (PRP).

Las PRP son un grupo de moléculas diversas que son inducidas por fitopatógenos y otras moléculas señalizadoras relacionadas con los sistemas de defensa. Son componentes claves del sistema inmune innato de los vegetales, especialmente de la resistencia sistémica adquirida, y se utilizan ampliamente como marcadores moleculares de los mecanismos de señalización durante los procesos de defensa (Ali *et al.*, 2018). Las PRP se agrupan de acuerdo con su función, tales como las  $\beta$ -1,3-glucanasas, peroxidasas, defensinas, tioninas y quitinasas.

Las quitinasas son proteínas que degradan la quitina, el segundo polisacárido más abundante del planeta después de la celulosa, el cual forma parte de la pared celular en la mayoría de los hongos. Estas proteínas son de suma importancia puesto que pueden mejorar la resistencia contra factores bióticos y abióticos. En Chile se han detectado al menos 16 genes de este tipo, y todos tienden a aumentar sus niveles de expresión ante el ataque de *P. capsici* (Ali *et al.*, 2018). De este grupo, uno de los miembros más activos es *CaChilV1*, puesto que se ha observado que su silenciamiento provoca un incremento en la susceptibilidad de las plantas al ataque de *P. capsici* debido a cambios en la expresión de genes relacionados con la

defensa (Ali *et al.*, 2019), mientras que la sobreexpresión de *CaChiVI2* en *Arabidopsis* genera mayor resistencia a estrés biótico (ataque de *P. capsici*) y abiótico (temperatura y sequía) mediante la reducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la modulación de la expresión de genes relacionados con la defensa (Ali *et al.*, 2020), por lo que su uso en chiles mediante la ingeniería genética bajo un enfoque cisgénico podría ayudar a la generación de cultivares con un rango de resistencia a diversos tipos de factores adversos y de este modo reducir el uso de fungicidas con el fin de obtener una producción de alimentos inocua y libre de sustancias dañinas tanto para el ambiente como para la salud humana.

## **12. FITOQUÍMICA**

El género *Capsicum*, al ser ampliamente diverso, su composición química también presenta una gran variabilidad. Sus principales aplicaciones son en la industria alimentaria y farmacológica, ya que sus frutos presentan una composición química rica en capsaicinoides, carotenoides, flavonoides y compuestos volátiles a los que se les atribuye la habilidad de dar sabor a las comidas, producir aromas y actuar como antioxidantes (Antonio, Wiedemann, & Veiga Junior, 2018).

### **12.1 Capsaicinoides**

Los capsaicinoides son las moléculas responsables de la sensación pungente que ocurre cuando los mamíferos muerden un fruto de *Capsicum* (Aza-González, Núñez-Palenius, & Ochoa-Alejo, 2011; Lu, Ho, & Huang, 2017). En total se han reportado más de 20 de estos compuestos y la capsaicina es el principal componente activo, seguido de la dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y la homocapsaicina, principalmente (Luo, Peng, & Li, 2011). Solo los chiles sintetizan capsaicinoides en la naturaleza y se ha especulado que tienen una función protectora contra patógenos (Aza-González *et al.*, 2011).

**Cuadro 1.** Estructura química de los principales capsaicinoides presentes en frutos de Chile.

Fuente: Lu *et al.* (2017).

Nombre	Abreviatura	Fórmula molecular	Estructura química
Capsaicina	C	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	
Dihidrocapsaicina	DHC	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	
Nordihidrocapsaicina	n-DHC	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	
Homodihidrocapsaicina	h-DHC	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>3</sub>	
Homocapsaicina	h-C	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	

## 12.2 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de alrededor de 750 compuestos de 40 carbonos que se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas y son conocidos por sus propiedades cromogénicas, que atribuyen colores naranja, amarillo y rojo. Estos pigmentos pueden ser sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, y en algunos no fotosintéticos, en donde cumplen papeles muy importantes durante la fotosíntesis, actuando como fotoprotectores y estabilizando radicales libres (Antonio *et al.*, 2018; Maoka, 2020).

Los chiles se consideran como verduras ricas en carotenoides (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2020). La variedad de colores se debe en parte a la presencia de carotenoides, principalmente oxigenados, cuyo perfil puede cambiar en función del estado de madurez, de la especie y del cultivar (Antonio *et al.*, 2018). Al principio, los frutos son de color verde, los cuales se encuentran constituidos principalmente

de cloroplastos que contienen aproximadamente un 68% de clorofilas, mientras que los carotenoides representan un 32%, el nivel más bajo. En esta etapa, se pueden encontrar carotenoides como luteína, violaxantina, neoxantina y  $\beta$ -caroteno (Hassan, Yusof, Yahaya, Rozali, & Othman, 2019). Conforme el fruto se madura, comienza la síntesis de carotenoides en los cromoplastos a partir de los ya existentes en los cloroplastos, así como también ocurre síntesis *de novo*. Mediante el proceso de maduración, los cloroplastos se convierten en cromoplastos, los cuales contienen una mezcla de carotenoides que contribuyen colectivamente con el color, que puede ir desde verde hacia café, después amarillo, naranja rojo o rojo oscuro al final de la maduración, dependiendo del cultivar (Hassan *et al.*, 2019).

### **12.3 Flavonoides**

Los flavonoides, una clase de polifenoles (metabolitos secundarios), se encuentran presentes ampliamente en las plantas, y se les han atribuido varios efectos bioactivos incluyendo propiedades antivirales, antiinflamatorias, cardioprotectivas, antidiabéticas, anticancerígenas, antienvjecimiento, entre otras. Su estructura básica consiste de tres anillos de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> con diferentes patrones de sustitución (Wang, Li, & Bi, 2018).

En chiles, se acumulan principalmente en el epicarpio, en sus formas conjugadas de tipo O-glicósidos y derivados C-glicósidos. La quercetina y la luteolina son los principales flavonoides presentes en chiles, en donde representan aproximadamente el 41% de todo el contenido total de flavonoides (Antonio *et al.*, 2018).

### **12.4 Compuestos volátiles**

La fracción volátil en los frutos de chile es la responsable de su aroma, así como también de sus compuestos bioactivos. Se ha reportado que es diversa, con más de 200 sustancias descritas, incluyendo compuestos clasificados como terpenos, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, lactonas y compuestos fenólicos (Antonio *et al.*, 2018).

Entre estas sustancias identificadas en la fracción volátil se encuentra tiol metano, dimetilsulfuro, dimetilamina, acetaldehído, propanal, acetona, 2-nonanona, hexano, ácido acético, 1-pentanol, limoneno, pentadecano, metil salicilato, entre otros (Antonio *et al.*, 2018).

### **13. EDICIÓN GENÉTICA**

Los avances en las tecnologías de edición genética han revolucionado los campos de la genómica funcional y el fitomejoramiento (Arora & Narula, 2017). La recién desarrollada técnica de edición genética llamada repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas9) ha contribuido significativamente en el avance para el mejoramiento de cultivos debido a su simplicidad y a su alta eficiencia en comparación con otras técnicas como las ZFNs y las TALENS (Karkute, Singh, Gupta, Singh, & Singh, 2017). El desarrollo de cultivos genéticamente editados similares a aquellos obtenidos mediante el fitomejoramiento convencional utilizando esta técnica la convierte en una herramienta muy prometedora y versátil para proveer de una agricultura sostenible con el fin de una mejor alimentación hacia una humanidad creciente en un escenario de cambio climático (Khatodia, Bhatotia, Passricha, Khurana, & Tuteja, 2016).

#### **13.1 Edición genética mediante CRISPR/Cas9**

Debido al reciente desarrollo de esta tecnología y su adaptación al fitomejoramiento, los estudios que se han hecho en chiles son limitados. Borovsky *et al.* (2019) utilizaron esta estrategia para estudiar la función de los genes *CcLOL1*, *CaGLK2* y *CcAPRR2*, los cuales influyen el color de los chiles inmaduros y el desarrollo de los cloroplastos en *C. chinense*. Kim, Choi, & Won (2020) usaron protoplastos derivados de callos *in vitro* y plantas en invernadero de *C. annuum* cv. CM334 y Dempsey para generar una delección en el gen *CaMLO2*, el cual se sabe que confiere susceptibilidad a enfermedades fúngicas, por lo que los mutantes adquieren resistencia ante un amplio espectro de estos patógenos, especialmente

mildiú, con lo cual se pueden obtener cultivares libres de genes de otras especies de organismos con características agronómicas mejoradas.

#### **14. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

El establecimiento de un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* abre las puertas a una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas, y a pesar de los problemas que los chiles presentan en este aspecto (naturaleza recalcitrante, arrosamiento de brotes adventicios y genotipo-dependencia), ha sido posible adaptar metodologías de acuerdo con la naturaleza de la investigación. Una de estas aplicaciones es la propagación masiva de materiales élite, que con un procedimiento minucioso asegura la fidelidad genética del cultivar. De manera similar, también es posible utilizar esta estrategia para la obtención de plantas libres de patógenos, asegurando de este modo la calidad fitosanitaria en los campos de cultivo. Asimismo, el uso de la transformación genética de plantas hace uso implícito de un sistema de regeneración *in vitro*, por lo que también se han adaptado procedimientos para distintos casos en particular. Con respecto al aprovechamiento de variantes somaclonales y la producción de dobles haploides, este campo se ha visto poco estudiado en chiles, por lo que existen ventanas de conocimiento abiertas.

Por otra parte, el análisis de la diversidad genética entre colectas de Chile permite tener un panorama amplio de los recursos genéticos existentes, dando así mayor importancia a su preservación, puesto que son fuente de genes con potencial incorporación a genotipos mejorados para la obtención de resistencia a diversos factores de estrés. No obstante, a pesar de la suma importancia que tiene este cultivo a nivel nacional, no se han realizado suficientes estudios con el fin de coleccionar y caracterizar las especies y variedades criollas que se tienen, por lo que es imperativo, sobre todo en un panorama global de cambio climático y perturbación

del ambiente donde naturalmente se distribuyen, así de este modo asegurar la seguridad alimentaria de las generaciones futuras.

A pesar del desarrollo reciente del sistema de edición genética CRISPR/Cas9, las aplicaciones potenciales en el mejoramiento de chiles no se han visto esperar, y ya existen avances al respecto, por lo que a corto y mediano plazo el uso de esta estrategia se podría popularizar como uno de los métodos para la obtención de nuevos cultivares con características sobresalientes, como la resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a estrés biótico y abiótico, y alto contenido nutricional. Todos estos avances recientes no serían posibles sin el uso de la bioinformática, herramienta crucial para la detección a gran escala de genes, transcriptomas, metabolomas, etc.

Se han realizado avances significativos en pro del mejoramiento genético de los chiles con el uso de las herramientas biotecnológicas que se encuentran disponibles actualmente, sin embargo, todavía queda un largo camino por recorrer. La inmersión y el establecimiento de estas distintas técnicas biotecnológicas y la perfección de los procedimientos actuales tendrá un enorme valor como herramienta para el mejoramiento genético de *Capsicum* con el fin de obtener materiales élite con características agronómicas sobresalientes como mayores rendimientos, tolerancia o resistencia a estrés biótico y abiótico, mayor contenido nutrimental, y eficientes con respecto al uso de los recursos ambientales disponibles (agua, radiación solar, nutrimentos edáficos, etc.).

## 15. BIBLIOGRAFÍA

- Aboshama, H. (2011). Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(6), 755–762.
- Aguirre-Hernández, E., & Muñoz-Ocotero, V. (2015). El chile como alimento. *Ciencia*, 66(3), 16–23.
- Aguirre-Mancilla, C. L., Iturraga de la Fuente, G., Ramírez-Pimentel, J. G., Covarrubias-Prieto, J., Chablé-Moreno, F., & Raya-Pérez, J. C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México*, 5(1), 19–27.
- Ahn, Y. K., Manivannan, A., Karna, S., Jun, T. H., Yang, E. Y., Choi, S., ... Lee, E. S. (2018). Whole Genome Resequencing of *Capsicum baccatum* and *Capsicum annuum* to Discover Single Nucleotide Polymorphism Related to Powdery Mildew Resistance. *Scientific Reports*, 8(1), 5188. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23279-5>
- Al-Ajeel, S. A., Al-Hattab, Z. N., & El-Kaaby, E. A. (2016). Comparison on morphological and physiological traits of chilli pepper *Capsicum annuum* L. plants grown from seeds and somaclons from salt stress medium. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, 4(Jan/Feb), 105–108.
- Alemu, A. S., Mullualem, A. D., & Adugna, G. S. (2017). Genetic diversity study of Ethiopian hot pepper cultivars (*Capsicum* spp.) using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) marker. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 5(2), 27–37. <https://doi.org/10.22058/JPMB.2019.91684.1169>
- Ali, M., Gai, W.-X., Khattak, A. M., Khan, A., Haq, S. U., Ma, X., ... Gong, Z.-H. (2019). Knockdown of the chitin-binding protein family gene CaChiV1 increased sensitivity to *Phytophthora capsici* and drought stress in pepper plants. *Molecular Genetics and Genomics* 2019 294:5, 294(5), 1311–1326. <https://doi.org/10.1007/S00438-019-01583-7>
- Ali, M., Luo, D.-X., Khan, A., Haq, S. U., Gai, W.-X., Zhang, H.-X., ... Gong, Z.-H. (2018). Classification and Genome-Wide Analysis of Chitin-Binding Proteins Gene Family in Pepper (*Capsicum annuum* L.) and Transcriptional Regulation to *Phytophthora capsici*, Abiotic Stresses and Hormonal Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2216, 19(8), 2216. <https://doi.org/10.3390/IJMS19082216>
- Ali, M., Muhammad, I., ul Haq, S., Alam, M., Khattak, A. M., Akhtar, K., ... Gong, Z.-H. (2020). The CaChiV12 Gene of *Capsicum annuum* L. Confers Resistance Against Heat Stress and Infection of *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 219. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00219>
- Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., ... Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for

- engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213, 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.008>
- Antonio, A. S., Wiedemann, L. S. M., & Veiga Junior, V. F. (2018). The genus: *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC Advances*, 8(45), 25767–25784. <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>
- Anu, A., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2004). Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), 261–267. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009246.24216.ea>
- Arce-Rodríguez, M. L., Martínez, O., & Ochoa-Alejo, N. (2021). Genome-Wide Identification and Analysis of the MYB Transcription Factor Gene Family in Chili Pepper (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 2229, 22(5), 2229. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052229>
- Arora, L., & Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1932. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>
- Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011, May 14). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports*, Vol. 30, pp. 695–706. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>
- Baba, V. Y., Rocha, K. R., Gomes, G. P., de Fátima Ruas, C., Ruas, P. M., Rodrigues, R., & Gonçalves, L. S. A. (2016). Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(8), 1371–1381. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0325-4>
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147–173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Baral, J., & Bosland, P. W. (2002). Genetic diversity of a *Capsicum* germplasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(3), 318–324. <https://doi.org/10.21273/jashs.127.3.318>
- Barboza, G. E., Carrizo-García, C., Leiva-González, S., Scaldaferrro, M., & Reyes, X. (2019). Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PLOS ONE*, 14(1), e0209792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792>
- Barchenger, D. W., Lamour, K. H., & Bosland, P. W. (2018, May 15). Challenges and strategies for breeding resistance in *Capsicum annuum* to the multifarious pathogen, *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 9, p. 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00628>
- Barrales-López, A., Robledo-Paz, A., Trejo, C., Espitia-Rangel, E., & Rodríguez-De

- La O, J. L. (2015). Improved in vitro rooting and acclimatization of *Capsicum chinense* Jacq. plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 51(3), 274–283. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9671-3>
- Bartual, R., Carbonell, E. A., Marsal, J. I., Tello, J. C., & Campos, T. (1991). Gene action in the resistance of peppers (*Capsicum annuum*) to Phytophthora stem blight (*Phytophthora capsici* L.). *Euphytica* 1991 54:2, 54(2), 195–200. <https://doi.org/10.1007/BF00039608>
- Bello-Bello, J. J., Iglesias-Andreu, L. G., Avilés-Viñas, S. A., 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. <https://doi.org/10.21273/hortsci.49.4.481>
- Beltrán-Burboa, J. N., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., & Cruz-Huerta, N. (2020). Germinación in vitro de chile chiltepín (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) y regeneración por organogénesis. *Agrociencia*, 54(2), 195–208.
- Benson, E. E. (2000). In vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(3), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z>
- Bhadragoudar, M. R., & Patil, C. G. (2011). Assessment of genetic diversity among *Capsicum annuum* L. genotypes using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(76), 17477–17483. <https://doi.org/10.5897/AJB11.497>
- Bhandari, H. R., Nishant Bhanu, A., Srivastava, K., Singh, M. N., Shreya, & Hemantaranjan, A. (2017). Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants - An Overview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7(3). <https://doi.org/10.15406/apar.2017.07.00255>
- Bhargava, Y. R., & Umalkar, G. V. (1989). Productive mutations induced in *Capsicum annuum* by physical and chemical mutagens. *Acta Horticulturae*, 253, 233–238. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1989.253.25>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: An introductory text*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., & Sankhla, D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15(7), 536–540. <https://doi.org/10.1007/BF00232989>
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A.-M., Caromel, B., ... Lefebvre, V. (2007). Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 2007 115:2, 115(2), 253–264. <https://doi.org/10.1007/S00122-007-0561-X>
- Borovsky, Y., Monsonego, N., Mohan, V., Shabtai, S., Kamara, I., Faigenboim, A., ... Paran, I. (2019). The zinc-finger transcription factor CcLOL1 controls

- chloroplast development and immature pepper fruit color in *Capsicum chinense* and its function is conserved in tomato. *Plant Journal*, *99*, 41–55. <https://doi.org/10.1111/tbj.14305>
- Bosland, P. W., & Votava, E. J. (2012). *Peppers: Vegetable and spice Capsicums* (2nd ed.). CABI.
- Brilhante, B. D. G., Santos, T. de O., Santos, P. H. A. D., Kamphorst, S. H., Neto, J. D. S., Rangel, L. H., ... Moulin, M. M. (2021). Phenotypic and Molecular Characterization of Brazilian *Capsicum* Germplasm. *Agronomy*, *11*(5), 854. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050854>
- Bulle, M., Yarra, R., & Abbagani, S. (2016). Enhanced salinity stress tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plants overexpressing the wheat antiporter (TaNHX2) gene. *Molecular Breeding*, *36*(4), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0451-5>
- Buyukalaca, S., Comlekcioglu, N., Abak, K., Ekbic, E., & Kilic, N. (2004). Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (*Capsicum annuum* L.) haploid embryos via anther culture. *European Journal of Horticultural Science*, *69*(5), 206–209.
- Buyukalaca, Saadet, & Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *46*(3), 227–235. <https://doi.org/10.1007/BF02307099>
- Carrizo-García, C., Barfuss, M. H. J., Sehr, E. M., Barboza, G. E., Samuel, R., Moscone, E. A., & Ehrendorfer, F. (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany*, *118*(1), 35–51. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw079>
- Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L. B., Ragassi, C. F., Ribeiro, C. S. C., Reifschneider, F. J. B., Buso, G. S. C., & Faleiro, F. G. (2017). Genetic variability of a Brazilian *Capsicum frutescens* germplasm collection using morphological characteristics and SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, *16*(3), 16039689. <https://doi.org/10.4238/gmr16039689>
- Chadipiralla, K., Gayathri, P., Rajani, V., & Reddy, P. V. B. (2020). Plant Tissue Culture and Crop Improvement. In *Sustainable Agriculture in the Era of Climate Change* (pp. 391–412). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45669-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45669-6_18)
- Chaudhary, J., Deshmukh, R., & Sonah, H. (2019). Mutagenesis Approaches and Their Role in Crop Improvement. *Plants*, *8*(11), 467. <https://doi.org/10.3390/plants8110467>
- Chee, M. J. Y., Lycett, G. W., Khoo, T. J., & Chin, C. F. (2017). Bioengineering of the Plant Culture of *Capsicum frutescens* with Vanillin Synthase Gene for the Production of Vanillin. *Molecular Biotechnology*, *59*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9986-2>
- Chhapekar, S. S., Jaiswal, V., Ahmad, I., Gaur, R., & Ramchiary, N. (2018). Progress

- and prospects in Capsicum breeding for biotic and abiotic stresses. In S. Vats (Ed.), *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 279–322). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-9029-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9029-5_11)
- Christopher, T., & Rajam, M. V. (1994). In vitro clonal propagation of Capsicum spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/BF00034439>
- Dagla, H. R. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 17(8), 759–767. <https://doi.org/10.1007/s12045-012-0086-8>
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005, March 1). Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, Vol. 23, pp. 131–171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>
- Davies, F. T., Geneve, R. L., Wilson, S. B., Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (2018). *Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practices* (9th ed.). Pearson.
- Debbarama, C., Khanna, V. K., Tyagi, W., Rai, M., & Meetei, N. T. (2013). Wide Hybridization and Embryo-Rescue for Crop Improvement in Capsicum. *Agrotechnology*, S11, 003. <https://doi.org/10.4172/2168-9881.s11-003>
- Díaz, I., Moreno, R., & Power, J. B. (1988). Plant regeneration from protoplasts of Capsicum annuum. *Plant Cell Reports*, 7(3), 210–212. <https://doi.org/10.1007/BF00269326>
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., & Huerta, A. (1997). Androgenesis in Capsicum annuum L. - Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(4), 468–475. <https://doi.org/10.21273/jashs.122.4.468>
- Dumas de Vaulx, R., Chambonnet, D., & Pochard, E. (1981). In vitro culture of pepper (Capsicum annuum L.) anthers: High rate plant production from different genotypes by +35°C treatment. *Agronomie*, 1, 859–864.
- Ebida, A. I. A., & Hu, C. yeh. (1993). In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (Capsicum annuum L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, 13(2), 107–110. <https://doi.org/10.1007/BF00235301>
- Egea, C., Pérez, M. D. G., & Candela, M. E. (1996). Capsidiol accumulation in Capsicum annuum stems during the hypersensitive reaction to Phytophthora capsici. *Journal of Plant Physiology*, 149(6), 762–764. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80104-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80104-0)
- Ercan, N., Sensoy, F. A., & Sirri Sensoy, A. (2006). Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (Capsicum annuum L.). *Scientia Horticulturae*, 110(1), 16–20.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.06.007>

- FAO. (2013). Biotecnología. Retrieved from El papel de la FAO en la biotecnología website: <http://www.fao.org/biotechnology/es/>
- FAOSTAT. (2021). Datos sobre Alimentación y Agricultura. Retrieved May 11, 2021, from División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura website: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Fischer, R., & Emans, N. (2000). Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, 9, 279–299. <https://doi.org/10.1023/A:1008975123362>
- Gammoudi, N., Pedro, T. S., Ferchichi, A., & Gisbert, C. (2018). Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(2), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9838-1>
- Gebhardt, C. (2016). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, 129, 2281–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>
- George, L., & Narayanaswamy, S. (1973). Haploid Capsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78(4), 467–470. <https://doi.org/10.1007/BF01275781>
- Germanà, M. A. (2011, November 12). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 104, pp. 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Gogoi, S., Acharjee, S., & Devi, J. (2014). In vitro plantlet regeneration of Capsicum chinense Jacq. cv. “Bhut jalakia”: Hottest chili of northeastern India. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9569-x>
- Golegaonkar, P. G., & Kantharajah, A. S. (2006). High-frequency adventitious shoot bud induction and shoot elongation of chile pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42(4), 341–344. <https://doi.org/10.1079/IVP2006785>
- Góngora-Castillo, E., Fajardo-Jaime, R., Fernández-Cortes, A., Jofre-Garfias, A. E., Lozoya-Gloria, E., Martínez, O., ... Rivera-Bustamante, R. (2012). The capsicum transcriptome DB: a “hot” tool for genomic research. *Bioinformatics*, 8(1), 47. <https://doi.org/10.6026/97320630008043>
- Grosser, J. W., Calovi, M., & Louzada, E. S. (2010). Protoplast Fusion Technology-Somatic Hybridization and Cybridization. In *Plant Cell Culture* (pp. 175–198). <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch10>
- Guerrero-Moreno, A., & Laborde, J. A. (1980). Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. *Synopses of the IVth Eucarpia Meeting on Capsicum Wageningen (Netherlands)*, 52–56.

- Gunay, A. L., & Rao, P. S. (1978). In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (capsicum). *Plant Science Letters*, 11(3–4), 365–372. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(78\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(78)90024-X)
- Guzmán, F. A., Ayala, H., Azurdia, C., Duque, M. C., & De Vicente, M. C. (2005). AFLP assessment of genetic diversity of Capsicum genetic resources in Guatemala: Home gardens as an option for conservation. *Crop Science*, 45(1), 363–370. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0363>
- Haque, S. M., & Ghosh, B. (2018). An improved micropropagation protocol for the recalcitrant plant Capsicum—a study with ten cultivars of Capsicum spp. (C. annum, C. chinense, and C. frutescens) collected from diverse geographical regions of India and Mexico. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(1), 91–99. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1345331>
- Harini, I., & Lakshmi Sita, G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (Capsicum annum L.). *Plant Science*, 89(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90176-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90176-Z)
- Hassan, N. M., Yusof, N. A., Yahaya, A. F., Rozali, N. N. M., & Othman, R. (2019, October 1). Carotenoids of capsicum fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants*, Vol. 8, p. 469. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- Hossain, M. A., Konisho, K., Minami, M., & Nemoto, K. (2003). Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (Capsicum annum L.). *Euphytica*, 130, 233–239. <https://doi.org/10.1023/A:1022856725794>
- Hossain, M., Minami, M., & Nemoto, K. (2003). Immature Embryo Culture and Interspecific Hybridization between Capsicum annum L. and C.frutescens L. via Embryo Rescue. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 47(1), 9–16. <https://doi.org/10.11248/jsta1957.47.9>
- Ibarra-Torres, P., Valadez-Moctezuma, E., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Campos, J., & Jaramillo-Flores, M. E. (2015). Inter- and intraspecific differentiation of Capsicum annum and Capsicum pubescens using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 181, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.054>
- Ibiza, V. P., Blanca, J., Cañizares, J., & Nuez, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated Capsicum species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(6), 1077–1088. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9744-z>
- Irikova, T., Grozeva, S., & Rodeva, V. (2011, September 4). Anther culture in pepper (Capsicum annum L.) in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 33, pp. 1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0736-6>
- Jae, B. Y., Dong, C. Y., Jae, W. Do, & Hyo, G. P. (2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between Capsicum

- annuum and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Science*, 56, 31–38. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.56.31>
- Jain, S. M. (2010). Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(SUPPL.2), 88–106.
- Jeong-Yon, J., Eun-Young, C., Dongsu, C., & Kwang-Woong, L. (1996). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryo Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biology*, 39(2), 127–135.
- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2–3), 91–110. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>
- Joshi, M. N., & Khalatkar, A. S. (1981). Experimental mutagenesis in *Capsicum annuum*: I. Effect of different doses of gamma radiations on capsule and seed production. *Acta Horticulturae*, 111, 55–62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1981.111.6>
- Kaparakis, G., & Alderson, P. G. (2008). Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)? *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(2), 110–114. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9037-0>
- Karkute, S. G., Singh, A. K., Gupta, O. P., Singh, P. M., & Singh, B. (2017). CRISPR/Cas9 Mediated Genome Engineering for Improvement of Horticultural Crops. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1635. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01635>
- Katiyar, R. B. (1978). Radiocytogenetical studies on *Capsicum*. I. Meiotic anomalies. *CYTOLOGIA*, 43(2), 415–421. <https://doi.org/10.1508/cytologia.43.415>
- Keleş, D., Pinar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., & Büyükalaca, S. (2015). Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671–1676. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.11.1671>
- Khan, H., Siddique, I., & Anis, M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*, 50(4), 789–792. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0133-y>
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P., & Tuteja, N. (2016, April 19). The CRISPR/Cas genome-editing tool: Application in improvement of crops. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 7, p. 506. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00506>
- Khoury, C. K., Carver, D., Barchenger, D. W., Barboza, G. E., van Zonneveld, M., Jarret, R., ... Greene, S. L. (2020). Modelled distributions and conservation status of the wild relatives of chile peppers (*Capsicum* L.). *Diversity and Distributions*, 26(2), 209–225. <https://doi.org/10.1111/ddi.13008>
- Kim, H.-J., Nahm, S.-H., Lee, H.-R., Yoon, G.-B., Kim, K.-T., Kang, B.-C., ... Kim,

- B.-D. (2008). BAC-derived markers converted from RFLP linked to *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *118*(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/S00122-008-0873-5>
- Kim, H., Choi, J., & Won, K. H. (2020). A stable DNA-free screening system for CRISPR/RNPs-mediated gene editing in hot and sweet cultivars of *Capsicum annuum*. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02665-0>
- Kim, H., & Lim, J. (2019). Leaf-induced callus formation in two cultivars: hot pepper ‘CM334’ and bell pepper ‘Dempsey.’ *Plant Signaling and Behavior*, *14*(7), 1604016. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604016>
- Kim, M., Jang, I. C., Kim, J. A., Park, E. J., Yoon, M., & Lee, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, *27*(3), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0442-4>
- Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., ... Choi, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, *46*(3), 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>
- Kimble, K. A., & Grogan, R. G. (1960). Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. *Plant Disease Reports*, *44*, 872–873.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., & Lymperopoulos, C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *67*(1), 55–62. <https://doi.org/10.1023/A:1011610413177>
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., Shortsianitis, E., & Peppes, D. (2000). Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): Effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*, *85*(1–2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00135-1)
- Kintzios, S. E., Hiureas, G., Shortsianitis, E., Sereti, E., Blouhos, P., Manos, C., ... Holevas, C. D. (1998). The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. *Acta Horticulturae*, *461*, 427–432. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.49>
- Koleva-Gudeva, L. R., Spasenoski, M., & Trajkova, F. (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, *111*(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.013>
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers -

- A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.08.005>
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Kristiansen, K., & Andersen, S. B. (1993). Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67(1–2), 105–109. <https://doi.org/10.1007/BF00022732>
- Kue-Jae, L., & Wang, L. (2003). Isolation and culture of protoplasts from leaf tissue of *Capsicum annuum* var. *accumnatum* Fingerh and *C. frutescens* L. [Syn. *C. minimum* Roxb.] (Bird chilli). *Proceedings of the Plant Resources Society of Korea Conference*, 50–58. The Plant Resources Society of Korea.
- Kumar, R. V., Sharma, V. K., Chattopadhyay, B., & Chakraborty, S. (2012). An improved plant regeneration and *Agrobacterium* - mediated transformation of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(4), 357–364. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0132-8>
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., ... Kingsmore, S. F. (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1350–1360. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0028-R>
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., ... Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97(3), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9527-9>
- Lee, J., Nam, J.-Y., Jang, H., Kim, N., Kim, Y.-M., Kang, W.-H., & Yeom, S.-I. (2020). Comprehensive transcriptome resource for response to phytohormone-induced signaling in *Capsicum annuum* L. *BMC Research Notes* 2020 13:1, 13(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05281-1>
- Lefebvre, V., & Palloix, A. (1996). Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper — *Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and Applied Genetics* 1996 93:4, 93(4), 503–511. <https://doi.org/10.1007/BF00417941>
- Lefebvre, Véronique, Palloix, A., & Rives, M. (1993). Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 71(3), 189–199.

<https://doi.org/10.1007/BF00040408>

- 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0581-1>
- Liu, W., Parrott, 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 Reports*, 9(7), 360–364. <https://doi.org/10.1007/BF00232399>
- López-Espinosa, S. T., Latournerie-Moreno, L., Castañón-Nájera, G., Ruiz-Sánchez, E., Gómez-Leyva, J. F., Andueza-Noh, R. H., & Mijangos-Cortés, J. O. (2018). Diversidad genética de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) mediante ISSR. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(3), 227–236.
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Montalvo-Peniche, M. D. C., Barahona-Pérez, F., ... Iglesias-Andreu, L. (2006). Direct somatic embryogenesis: A highly efficient protocol for in vitro regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645–1650. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.7.1645>
- Lu, M., Ho, C. T., & Huang, Q. (2017, January 1). Extraction, bioavailability, and bioefficacy of capsaicinoids. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 25, pp. 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.023>
- Luitel, B. P., & Kang, W. H. (2013). In vitro androgenic response of minipaprika (*Capsicum annuum* L.) genotypes in different culture media. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 54(2), 162–171. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0110-2>
- Luo, X. J., Peng, J., & Li, Y. J. (2011, January 10). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 650, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.074>
- Mahto, B. K., Sharma, P., Rajam, M. V., Reddy, P. M., & Dhar-Ray, S. (2018). An efficient method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 23(3), 573–581. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0389-1>
- Maligeppagol, M., Manjula, R., Navale, P. M., Babu, K. P., Kumbar, B. M., & Laxman, R. H. (2016). Genetic transformation of chilli (*Capsicum annuum* L.) with Dreb1A transcription factor known to impart drought tolerance. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(1), 17–24.
- Manoharan, M., Vidya, C. S. S., & Sita, G. L. (1998). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala). *Plant Science*, 131(1), 77–83. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00231-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00231-8)
- Manzur, J. P., Calvache-Asensio, M. de las N., & Rodríguez-Burruezo, A. (2014). Growth regulators and darkness increase efficiency in in vitro culture of

- immature embryos from peppers. *Scientia Agricola*, 71(6), 488–493. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0230>
- Manzur, J. P., Fita, A., Prohens, J., & Rodríguez-Burruezo, A. (2015). Successful Wide Hybridization and Introgression Breeding in a Diverse Set of Common Peppers (*Capsicum annuum*) Using Different Cultivated Ají (*C. baccatum*) Accessions as Donor Parents. *PLOS ONE*, 10(12), e0144142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144142>
- Manzur, J. P., Penella, C., & Rodríguez-Burruezo, A. (2013). Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, 161, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.036>
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Mo, H., Kim, S., Wai, K. P. P., Siddique, M. I., Yoo, H., & Kim, B.-S. (2014). New sources of resistance to *Phytophthora capsici* in *Capsicum* spp. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 2014 55:1, 55(1), 50–55. <https://doi.org/10.1007/S13580-014-0016-7>
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2011). Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analyses of Plant Functions. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2017–2038. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCR153>
- Monteiro do Rego, M., Ramalho do Rego, E., & Barroso, P. A. (2016). Tissue culture of *Capsicum* spp. In E. Ramalho do Rego, M. Monteiro do Rego, & F. L. Finger (Eds.), *Production and Breeding of Chilli Peppers (Capsicum spp.)* (pp. 97–127). [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8\\_6](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8_6)
- Morán-Bañuelos, S. H., Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., & Zavaleta-Mejía, E. (2010). Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(Especial 4), 21–26. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802010000500006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000500006)
- Munyon, I. P., Hubstenberger, J. F., & Phillips, G. C. (1989). Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 25(3), 293–296. <https://doi.org/10.1007/BF02628469>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., & Olszewska, D. (2015). Genetic analysis of anther culture-derived diploids of *Capsicum* spp. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(6), 747–752. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11668741>
- Nowaczyk, P., & Kisiała, A. (2006). Effect of selected factors on the effectiveness of

- Capsicum annuum L. anther culture. *Journal of Applied Genetics*, 47(2), 113–117. <https://doi.org/10.1007/BF03194609>
- Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis in Capsicum spp. In V. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 233–240). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_14)
- Ochoa-Alejo, N., & Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, 42(1–2), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90144-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90144-4)
- Ochoa-Alejo, Neftali, & Ramirez-Malagon, R. (2001). In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Vol. 37, pp. 701–729. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0121-z>
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., ... Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>
- Olszewska, D., Kisiala, A., Niklas-Nowak, A., & Nowaczyk, P. (2014). Study of in vitro anther culture in selected genotypes of genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 118–124. <https://doi.org/10.3906/biy-1307-50>
- Ortega, J. L., Rajapakse, W., Bagga, S., Apodaca, K., Lucero, Y., & Sengupta-Gopalan, C. (2018). An intragenic approach to confer glyphosate resistance in chile (*Capsicum annuum*) by introducing an in vitro mutagenized chile EPSPS gene encoding for a glyphosate resistant EPSPS protein. *PLOS ONE*, 13(4), e0194666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194666>
- Ortega, R. G., Español, C. P., & Zueco, J. C. (1991). Genetics of Resistance to *Phytophthora capsici* in the Pepper Line ‘SCM-334.’ *Plant Breeding*, 107(1), 50–55. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0523.1991.TB00527.X>
- Pang, Z., Shao, J., Chen, L., Lu, X., Hu, J., Qin, Z., & Liu, X. (2013). Resistance to the Novel Fungicide Pyrimorph in *Phytophthora capsici*: Risk Assessment and Detection of Point Mutations in Cesa3 That Confer Resistance. *PLOS ONE*, 8(2), e56513. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0056513>
- Paran, I., Aftergoot, E., & Shifriss, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 99(3), 167–173. <https://doi.org/10.1023/A:1018301215945>
- Paran, I., Borovsky, Y., Nahon, S., & Cohen, O. (2007). The use of induced mutations to study shoot architecture in *Capsicum*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55(2), 125–131. <https://doi.org/10.1560/IJPS.55.2.125>
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013). Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis

- and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112(3), 353–360. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0242-6>
- Parra, G., & Ristaino, J. B. (2001). Resistance to Mefenoxam and Metalaxyl Among Field Isolates of *Phytophthora capsici* Causing *Phytophthora* Blight of Bell Pepper. *Plant Disease*, 85(10), 1069–1075. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1069>
- Parry, M. A. J., Madgwick, P. J., Bayon, C., Tearall, K., Hernandez-Lopez, A., Baudo, M., ... Phillips, A. L. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2817–2825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp189>
- Pérez-Castañeda, L., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., & Mayek-Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 117–128. <https://doi.org/10.19136/era.a2n4.721>
- Pérez-Grajales, M., & Castro-Brindis, R. (2008). *El chile manzano*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Prakash, A. H., Sankara Rao, K., & Kumar, M. U. (1997). Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *Journal of Biosciences*, 22(3), 339–344. <https://doi.org/10.1007/BF02703236>
- Prieto, E. H., Jordan, Z. M., Cordeiro, M. C. R., & Durzan, D. J. (2005). *Biología Vegetal*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, Chile.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., ... Zhang, Z. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400975111>
- Qin, X., & Rotino, G. L. (1995). ANTHOR CULTURE OF SEVERAL SWEET AND HOT PEPPER GENOTYPES. *Acta Horticulturae*, (402), 313–316. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.402.51>
- Quirin, E. A., Ogundiwin, E. A., Prince, J. P., Mazourek, M., Briggs, M. O., Chlanda, T. S., ... Jahn, M. M. (2005). Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto.5.2 , a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 2005 110:4, 110(4), 605–612. <https://doi.org/10.1007/S00122-004-1874-7>
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006, September 17). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 86, pp. 285–301. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>

- Rabelo da Costa, F., Santana Pereira, T. N., Pierre Vitória, A., Pereira de Campos, K., Rodrigues, R., Henriques da Silva, D., & Gonzaga Pereira, M. (2006). Genetic diversity among Capsicum accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6(1), 18–23. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v06n01a03>
- Rao, N. B., & Lakshmi, N. (1980). Gamma ray induced meiotic abnormalities in Capsicum annum L. *Caryologia*, 33(4), 509–518. <https://doi.org/10.1080/00087114.1980.10796866>
- Reifschneider, F. J. B., Boiteux, L. S., Vecchia, P. T. Della, Poulos, J. M., & Kuroda, N. (1992). Inheritance of adult-plant resistance to Phytophthora capsici in pepper. *Euphytica* 1992 62:1, 62(1), 45–49. <https://doi.org/10.1007/BF00036086>
- Retes-Manjarrez, J. E., Rubio-Aragón, W. A., Márques-Zequera, I., Cruz-Lachica, I., García-Estrada, R. S., & Sy, O. (2020). Novel Sources of Resistance to Phytophthora capsici on Pepper (Capsicum sp.) Landraces from Mexico. *The Plant Pathology Journal*, 36(6), 600–607. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2020.0131>
- Rhee, S. Y., Dickerson, J., & Xu, D. (2006). Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 335–360. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.56.032604.144103>
- Rodriguez, J. M., Berke, T., Engle, L., & Nienhuis, J. (1999). Variation among and within Capsicum species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1–2), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s001220051219>
- Roskov, Y., Ower, G., Orrell, T., Nicolson, D., Bailly, N., Kirk, P. M., ... Penev, L. (2020). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist. Retrieved from [www.catalogueoflife.org](http://www.catalogueoflife.org)
- Ruiz-Bello, R., Nava-Tablada, M. E., Landeros-Sánchez, C., & Díaz-Padilla, G. (2016). Potencial productivo y limitantes para el cultivo de chile habanero (Capsicum chinense Jacq) en el estado de Veracruz, México. *Revista Internacional de Desarrollo Regional Sustentable*, 1(January), 1–12. Retrieved from [http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez\\_Borja\\_M\\_DC\\_Fitosanidad\\_2010.pdf?sequence=1](http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1)
- Sahijram, L., & Rao, B. M. (2015). Hybrid embryo rescue in crop improvement. In *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology: Vol. II* (pp. 363–384). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_18)
- Sang, M. K., Kim, J.-G., & Kim, K. D. (2010). Biocontrol Activity and Induction of Systemic Resistance in Pepper by Compost Water Extracts Against Phytophthora capsici. *Phytopatology*, 100(8), 774–783. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-8-0774>

- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Barahona-Pérez, F., Montalvo-Peniche, M. D. C., Zapata-Castillo, P. Y., Solís-Ruiz, A., ... Miranda-Ham, M. D. L. (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40(6), 1829–1831. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.6.1829>
- Saxena, P. K., Gill, R., Rashid, A., & Maheshwari, S. C. (1981). Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering in vitro. *Protoplasma*, 108(3–4), 357–360. <https://doi.org/10.1007/BF02224429>
- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., & González-García, B. (2011, May 30). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, Vol. 30, pp. 765–778. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0984-8>
- Sharma, A., Kumar, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2008). Induction of in vitro flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue2-fulltext-8>
- Sharmin, A., Hoque, M. E., Haque, M. M., & Khatun, F. (2018). Molecular diversity analysis of some chilli (*Capsicum* spp.) genotypes using SSR markers. *American Journal of Plant Sciences*, 9(3), 368–379. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.93029>
- Shen, X., Gmitter, F. G., & Grosser, J. W. (2011). Immature embryo rescue and culture. In T. Thorpe & E. Yeung (Eds.), *Plant embryo culture: Methods and protocols* (Vol. 710, pp. 75–92). [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_7)
- Shi, J., Ye, W., Ma, D., Yin, J., Zhang, Z., Wang, Y., & Qiao, Y. (2021). Improved whole genome sequence of *Phytophthora capsici* generated by long-read sequencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-20-0356-a>
- Shivakumara, T. N., Sreevathsa, R., Dash, P. K., Sheshshayee, M. S., Papolu, P. K., Rao, U., ... UdayaKumar, M. (2017). Overexpression of Pea DNA Helicase 45 (PDH45) imparts tolerance to multiple abiotic stresses in chili (*Capsicum annuum* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02589-0>
- Silvar, C., Merino, F., & Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1120–1124. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2007.11.008>
- Solís-Ramos, L. Y., Nahuath-Dzib, S., Andrade-Torres, A., Barredo-Pool, F., González-Estrada, T., & de la Serna, E. C. (2010). Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biología*, 65(3), 504–511. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0049-z>

- Sri Devi, A., & Mullainathan, L. (2011). Physical and chemical mutagenesis for improvement of Chilli (*Capsicum annuum* L.). *World Applied Sciences Journal*, 15(1), 108–113.
- Sripichitt, P., Nawata, E., & Shigenaga, S. (1987). In vitro shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). *Japanese Journal of Breeding*, 37(2), 133–142. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.37.133>
- Srivastava, A., & Mangal, M. (2019). Capsicum Breeding: History and Development. In N. Ramchiary & C. Kole (Eds.), *The Capsicum Genome. Compendium of Plant Genomes* (pp. 25–55). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6_3)
- Stewart, C. N. (2016). *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications* (2nd ed.). Wiley.
- Sun, Y. L., Choi, I. L., Lee, Y. B., Choi, K. Y., Hong, S. K., & Kang, H. M. (2014). Molecular diversity and phylogentic analysis of *Capsicum annuum* varieties using the nrDNA ITS region. *Scientia Horticulturae*, 165, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.009>
- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. B. M. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 25(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0028-y>
- Tang, B., Xie, L., Yi, T., Lv, J., Yang, H., Cheng, X., ... Zou, X. (2019). Genome-Wide Identification and Characterization of the Mitochondrial Transcription Termination Factors (mTERFs) in *Capsicum annuum* L. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 269*, 21(1), 269. <https://doi.org/10.3390/IJMS21010269>
- Thuy, V. T. B., Ky, H., Ba, T. T., Hien, N. L., & Yeap, S. K. (2016). Assessment of genetic diversity of chili rootstock using ISSR marker. *Can Tho University Journal of Science*, 03, 7–13. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2016.017>
- Toquica, S. P., Rodríguez, F., Martínez, E., Duque, M. C., & Tohme, J. (2003). Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon Department in Colombia, characterization by AFLPs of *Capsicum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(6), 639–647. <https://doi.org/10.1023/A:1024429320771>
- Torres, K. C. (1989). Stages of Micropropagation. In K. C. Torres (Ed.), *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops* (pp. 52–65). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9756-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9756-8_3)
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2011). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press.
- Tripodi, P., & Kumar, S. (2019). The Capsicum Crop: An Introduction. In N. Ramchiary & C. Kole (Eds.), *The Capsicum genome. Compendium of plant*

- genomes* (pp. 1–8). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6_1)
- Tsaballa, A., Ganopoulos, I., Timplalexi, A., Alik, X., Bosmali, I., Irini, N. O., ... Madesis, P. (2015). Molecular characterization of Greek pepper (*Capsicum annuum* L) landraces with neutral (ISSR) and gene-based (SCoT and EST-SSR) molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, *59*, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.02.005>
- Twaij, B. M., Jazar, Z. H., & Hasan, M. N. (2020). Trends in the use of tissue culture, applications and future aspects. *International Journal of Plant Biology*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.4081/pb.2020.8385>
- Ulukan, H. (2009). The evolution of cultivated plant species: Classical plant breeding versus genetic engineering. *Plant Systematics and Evolution*, *280*(3–4), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0118-8>
- Vassilev, D., Leunissen, J., Atanassov, A., Nenov, A., & Dimov, G. (2005). Application of Bioinformatics in Plant Breeding. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *19*, 139–152. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817293>
- Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Suman Kalyan, S., & Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *14*(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.02.001>
- Villa-Rivera, M. G., & Ochoa-Alejo, N. (2020). Chili Pepper Carotenoids: Nutraceutical Properties and Mechanisms of Action. *Molecules* *2020*, Vol. 25, Page 5573, *25*(23), 5573. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25235573>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 69, pp. 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Walker, S. J., & Bosland, P. W. (1999). Inheritance of Phytophthora Root Rot and Foliar Blight Resistance in Pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *124*(1), 14–18. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.1.14>
- Walsh, B. M., & Hoot, S. B. (2001). Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: The chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear *waxy* introns. *International Journal of Plant Sciences*, *162*(6), 1409–1418. <https://doi.org/10.1086/323273>
- Wang, P., Liu, X., Guo, J., Liu, C., Fu, N., & Shen, H. (2015). Identification and Expression Analysis of Candidate Genes Associated with Defense Responses to *Phytophthora capsici* in Pepper Line “PI 201234.” *International Journal of Molecular Sciences* *2015*, Vol. 16, Pages 11417–11438, *16*(5), 11417–11438. <https://doi.org/10.3390/IJMS160511417>
- Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018, January 1). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical*

- Sciences*, Vol. 13, pp. 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wang, W., Liu, X., Han, T., Li, K., Qu, Y., & Gao, Z. (2020). Differential Potential of *Phytophthora capsici* Resistance Mechanisms to the Fungicide Metalaxyl in Peppers. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 278, 8(2), 278. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020278>
- Wang, Y.-Y., Sun, C.-S., Wang, C.-C., & Chien, N.-F. (1973). Citation. *Scientia Sinica*, 16(1), 147–151. <https://doi.org/10.1360/ya1973-16-1-147>
- Wang, Y. J., Li, C. L., & Jiang, Z. G. (1981). New development in anther culture of *Capsicum annuum* and *C. annuum* var. *Grossum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 8(2), 41–46. Retrieved from <https://worldveg.tind.io/record/4929>
- WFO. (2021). *Capsicum* L. Retrieved May 15, 2021, from A Project of the World Flora Online Consortium website: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-4000006624>
- Xiao-Zhen, G., Ya-Cong, C., Zheng-Hai, Z., Bao-Xi, Z., Hong, Z., Xiao-Min, Z., ... Li-Hao, W. (2019). Genetic diversity and population structure analysis of *Capsicum* germplasm accessions. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(6), 1312–1320. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62132-X](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62132-X)
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012, May 28). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 13, pp. 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
- Zapata-Castillo, P. Y., Flick, A. C., López-Puc, G., Solís-Ruiz, A., Barahona-Pérez, F., Santana-Buzzy, N., & Iglesias-Andreu, L. (2007). Somatic embryogenesis in Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions. *HortScience*, 42(2), 329–333. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.2.329>
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B. H. (2017, January 1). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, Vol. 10, pp. 5–24. <https://doi.org/10.1111/eva.12434>
- Zhang, Y.-L., Jia, Q.-L., Li, D.-W., Wang, J.-E., Yin, Y.-X., & Gong, Z.-H. (2013). Characteristic of the Pepper CaRGA2 Gene in Defense Responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 8985-9004, 14(5), 8985–9004. <https://doi.org/10.3390/IJMS14058985>
- Zhang, Y. L., Li, D. W., Gong, Z. H., Wang, J. E., Yin, Y. X., & Ji, J. J. (2013). Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 3605–3621. <https://doi.org/10.4238/2013.September.13.5>

# AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN Capsicum L.

*Por* FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA

---

CANTIDAD DE PALABRAS 25775

HORA DE ENTREGA

15-JUL-2021 09:07P. M.

NÚMERO DE  
IDENTIFICACIÓN DEL  
TRABAJO

74525814

# AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN Capsicum L.

INFORME DE ORIGINALIDAD

# 13%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://www.ethno2.ethno-botanik.org">www.ethno2.ethno-botanik.org</a> Internet	461 palabras — 2%
2	<a href="http://link.springer.com">link.springer.com</a> Internet	183 palabras — 1%
3	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Internet	150 palabras — 1%
4	<a href="http://www.scielo.org.mx">www.scielo.org.mx</a> Internet	131 palabras — 1%
5	<a href="http://eprints.ugd.edu.mk">eprints.ugd.edu.mk</a> Internet	83 palabras — < 1%
6	<a href="http://ria.inta.gob.ar">ria.inta.gob.ar</a> Internet	73 palabras — < 1%
7	<a href="http://www.ishs.org">www.ishs.org</a> Internet	70 palabras — < 1%
8	<a href="http://apsjournals.apsnet.org">apsjournals.apsnet.org</a> Internet	69 palabras — < 1%
9	<a href="http://www.chilepepperinstitute.org">www.chilepepperinstitute.org</a> Internet	67 palabras — < 1%
10	<a href="http://www.agri.ankara.edu.tr">www.agri.ankara.edu.tr</a> Internet	

59 palabras — < 1%

11 [issuu.com](http://issuu.com)  
Internet

54 palabras — < 1%

12 [agradecimientos.net](http://agradecimientos.net)  
Internet

52 palabras — < 1%

13 [www.scriptieprijis.be](http://www.scriptieprijis.be)  
Internet

51 palabras — < 1%

14 [krshikosh.egranth.ac.in](http://krshikosh.egranth.ac.in)  
Internet

50 palabras — < 1%

15 [repositorio.uaaan.mx:8080](http://repositorio.uaaan.mx:8080)  
Internet

50 palabras — < 1%

16 [ojs.uma.ac.id](http://ojs.uma.ac.id)  
Internet

47 palabras — < 1%

17 [journal.pan.olsztyn.pl](http://journal.pan.olsztyn.pl)  
Internet

45 palabras — < 1%

18 [frasesparacumpleanos.com](http://frasesparacumpleanos.com)  
Internet

44 palabras — < 1%

19 [www.coursehero.com](http://www.coursehero.com)  
Internet

43 palabras — < 1%

20 "Accelerated Plant Breeding, Volume 2",  
Springer Science and Business Media LLC,  
2020  
Crossref

41 palabras — < 1%

21 [app.trdizin.gov.tr](http://app.trdizin.gov.tr)  
Internet

40 palabras — < 1%

22	<a href="https://ojs.ucp.edu.pe">ojs.ucp.edu.pe</a> Internet	40 palabras — < 1%
23	<a href="https://repositorio.lamolina.edu.pe">repositorio.lamolina.edu.pe</a> Internet	40 palabras — < 1%
24	<a href="https://ci.lib.ncsu.edu">ci.lib.ncsu.edu</a> Internet	39 palabras — < 1%
25	<a href="http://www.zemdirbyste-agriculture.lt">www.zemdirbyste-agriculture.lt</a> Internet	38 palabras — < 1%
26	<a href="https://m.scirp.org">m.scirp.org</a> Internet	37 palabras — < 1%
27	<a href="http://www.roosevelt.edu.ec">www.roosevelt.edu.ec</a> Internet	37 palabras — < 1%
28	<a href="https://aijbnet.com">aijbnet.com</a> Internet	36 palabras — < 1%
29	<a href="https://discovery.dundee.ac.uk">discovery.dundee.ac.uk</a> Internet	36 palabras — < 1%
30	"The Capsicum Genome", Springer Science and Business Media LLC, 2019 Crossref	34 palabras — < 1%
31	Binod K. Mahto, Poonam Sharma, M. V. Rajam, Pallavolu M. Reddy, Swatimita Dhar-Ray. "An efficient method for Agrobacterium-mediated genetic transformation of chilli pepper (Capsicum annum L.)", Indian Journal of Plant Physiology, 2018 Crossref	34 palabras — < 1%
32	<a href="https://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	34 palabras — < 1%

33	<a href="http://hrcak.srce.hr">hrcak.srce.hr</a> Internet	34 palabras — < 1%
34	<a href="http://repositorio.ual.es">repositorio.ual.es</a> Internet	34 palabras — < 1%
35	<a href="http://rmiq.org">rmiq.org</a> Internet	34 palabras — < 1%
36	<a href="http://www.repositorio.unadmexico.mx:8080">www.repositorio.unadmexico.mx:8080</a> Internet	34 palabras — < 1%
37	<a href="http://innspub.net">innspub.net</a> Internet	33 palabras — < 1%
38	Ana María Ribes Moya. "Selección y mejora de ecotipos de pimiento ( <i>Capsicum</i> sp.) para agricultura sostenible y calidad nutricional y organoléptica.", Universitat Politecnica de Valencia, 2020 Crossref Posted Content	32 palabras — < 1%
39	<a href="http://sj.ctu.edu.vn">sj.ctu.edu.vn</a> Internet	32 palabras — < 1%
40	<a href="http://rehip.unr.edu.ar">rehip.unr.edu.ar</a> Internet	31 palabras — < 1%
41	<a href="http://revistas.unal.edu.co">revistas.unal.edu.co</a> Internet	31 palabras — < 1%
42	<a href="http://ikee.lib.auth.gr">ikee.lib.auth.gr</a> Internet	30 palabras — < 1%
43	<a href="http://tesis.ipn.mx">tesis.ipn.mx</a> Internet	30 palabras — < 1%
44	<a href="http://jme.bioscientifica.com">jme.bioscientifica.com</a>	

	Internet	29 palabras — < 1%
45	<a href="http://journal.unnes.ac.id">journal.unnes.ac.id</a> Internet	29 palabras — < 1%
46	Ma. Ángeles Valencia de Ita, Jiménez Huerta Fátima, Conrado Parraguirre Lezama, Alfredo Báez Simón et al. "Bio-controller Effect of Four Native Strains of Trichoderma spp., on Phytophthora capsici in Manzano Chili (Capsicum pubescens) in Puebla-Mexico", Journal of Pure and Applied Microbiology, 2021 Crossref	28 palabras — < 1%
47	<a href="http://cgspace.cgiar.org">cgspace.cgiar.org</a> Internet	28 palabras — < 1%
48	<a href="http://doaj.org">doaj.org</a> Internet	28 palabras — < 1%
49	<a href="http://journal.ipb.ac.id">journal.ipb.ac.id</a> Internet	28 palabras — < 1%
50	<a href="http://jssm.umt.edu.my">jssm.umt.edu.my</a> Internet	28 palabras — < 1%
51	<a href="http://journals.ashs.org">journals.ashs.org</a> Internet	27 palabras — < 1%
52	<a href="http://repositorio.chapingo.edu.mx:8080">repositorio.chapingo.edu.mx:8080</a> Internet	27 palabras — < 1%
53	<a href="http://jurnal.uns.ac.id">jurnal.uns.ac.id</a> Internet	26 palabras — < 1%
54	<a href="http://www.utp.edu.pl">www.utp.edu.pl</a> Internet	26 palabras — < 1%

55	<a href="http://edepot.wur.nl">edepot.wur.nl</a> Internet	25 palabras — < 1%
56	<a href="http://monografias.umcc.cu">monografias.umcc.cu</a> Internet	25 palabras — < 1%
57	<a href="http://repositorio.ufpel.edu.br:8080">repositorio.ufpel.edu.br:8080</a> Internet	25 palabras — < 1%
58	<a href="http://updatepublishing.com">updatepublishing.com</a> Internet	25 palabras — < 1%
59	<a href="http://www.koreascience.or.kr">www.koreascience.or.kr</a> Internet	25 palabras — < 1%
60	<a href="http://magistraonline.ufrb.edu.br">magistraonline.ufrb.edu.br</a> Internet	24 palabras — < 1%
61	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> Internet	24 palabras — < 1%
62	<a href="http://eprints.lancs.ac.uk">eprints.lancs.ac.uk</a> Internet	23 palabras — < 1%
63	<a href="http://portal.amelica.org">portal.amelica.org</a> Internet	23 palabras — < 1%
64	<a href="http://www.mdpi.com">www.mdpi.com</a> Internet	23 palabras — < 1%
65	<a href="http://dokumen.pub">dokumen.pub</a> Internet	22 palabras — < 1%
66	<a href="http://manualzz.com">manualzz.com</a> Internet	22 palabras — < 1%

- 67 Internet 22 palabras — < 1%
- 
- 68 [agrosalmir.blogspot.com](http://agrosalmir.blogspot.com) Internet 21 palabras — < 1%
- 
- 69 [eprints.uanl.mx](http://eprints.uanl.mx) Internet 21 palabras — < 1%
- 
- 70 [old.oalib.com](http://old.oalib.com) Internet 21 palabras — < 1%
- 
- 71 Heshan Du, Jingjing Yang, Bin Chen, Xiaofen Zhang, Jian Zhang, Kun Yang, Sansheng Geng, Changlong Wen. "Target sequencing reveals genetic diversity, population structure, core-SNP markers, and fruit shape-associated loci in pepper varieties", BMC Plant Biology, 2019  
Crossref 20 palabras — < 1%
- 
- 72 Jacobo Pérez-Pastrana, Pilar S. Testillano, Ivett Barany, Adriana Canto-Flick et al. "Endogenous auxin accumulation/localization during zygotic and somatic embryogenesis of Capsicum chinense Jacq", Journal of Plant Physiology, 2021  
Crossref 20 palabras — < 1%
- 
- 73 Salesh Kumar Jindal, Major Singh Dhaliwal, Om Prakash Meena. "Molecular advancements in male sterility systems of : A review ", Plant Breeding, 2019  
Crossref 20 palabras — < 1%
- 
- 74 [vdocuments.site](http://vdocuments.site) Internet 20 palabras — < 1%
- 
- 75 [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org) Internet 20 palabras — < 1%

---

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA**  
**COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**REGISTRO DEL COMITÉ ASESOR DE GRADO**  
**FORMA RE-CAG**

Mediante este formato se registra el Comité Asesor de un estudiante de Posgrado en la Oficina de Registros Escolares. El estudiante y los profesores aceptan conocer y satisfacer los requisitos y obligaciones para los integrantes de un Comité Asesor, lo que implica también, aceptar su integración en el Jurado del examen de grado correspondiente cuando el caso se presente.

Primera instalación del Comité Asesor   X  

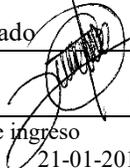
Modificación del Comité Asesor \*                   

(1) Estudiante de:

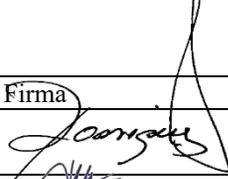
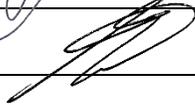
Maestría en Ciencias

Doctorado en Ciencias

Doctorado

Nombre Franco Armando Guerrero Valencia	Firma 
Programa Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola	Fecha de ingreso 21-01-2019

(2) Comité Asesor, aceptando su inclusión

	Nombre	No. Cédula Prof.	Firma	Programa
Director	<b>Dr. José Luis Rodríguez de la O</b>	<b>3308079</b>		<b>Biotecnología Agrícola</b>
Asesor	<b>Dr. José Óscar Mascorro Gallardo</b>	<b>3242946</b>		<b>Biotecnología Agrícola</b>
Asesor	<b>Dr. Mario Pérez Grajales</b>	<b>5146971</b>		<b>Horticultura</b>

En caso de que el Presidente no pertenezca al mismo Programa que el estudiante, o de que algún miembro (hasta dos) no sean profesores del posgrado de la Universidad, se debe contar con un acuerdo avalatorio del Comité del Programa correspondiente. Si este es el caso, Número de oficio y fecha de ese acuerdo: \_\_\_\_\_.

\*El Coordinador Departamental anexará la justificación del cambio de algún miembro del Comité.

Sanción favorable del Comité Asesor por el Coordinador del Programa:

(3) Coordinador

Nombre Dr. José Óscar Mascorro Gallardo	Firma 
--	--

Chapingo, Méx. a   13   de   julio   de   2021  .

**INSTRUCCIONES:**

- A. Los números en paréntesis señalan la secuencia de requisitación.
- B. Respecto a un Comité Asesor, el estudiante es responsable de identificar al profesor que fungirá como Presidente, y en acuerdo con él de identificar también a los Asesores.
- C. Esta forma, en sus seis tantos, debe ser entregada a la Oficina de Registros Escolares, donde se retendrá el original y se sellarán los tantos restantes que el estudiante debe entregar a: 1) Coordinación del Programa, 2) Coordinación General de Estudios de Posgrado, 3) Integrantes del Comité Asesor, 4) al propio estudiante, en cuyo tanto podrá recabar firmas de recibido.
- D. En caso de modificar la integración del Comité Asesor, debe usarse otro ejemplar de esta misma forma y requisitarse de igual manera, indicando que es una modificación de la integración del Comité Asesor.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA**  
**COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**REGISTRO DE APROBACIÓN DE TESIS DE GRADO**  
**FORMA RE-ATG**

Mediante este formato se registra la aprobación de tesis de grado, por los integrantes del Comité Asesor y se solicita la autorización del examen correspondiente.

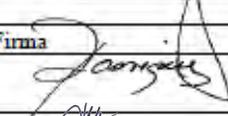
El estudiante y los miembros del Comité Asesor aceptan conocer los requisitos para la aprobación de la tesis (contenido y forma) y que el documento satisface tales requisitos.

Los integrantes del Comité Asesor aceptan también estar dispuestos a participar en el examen de grado teniendo como antecedente su inclusión en el Comité Asesor.

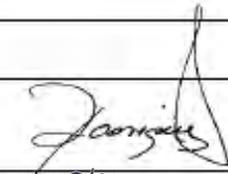
(1) Estudiante, solicitando examen de:

<input checked="" type="checkbox"/> Maestría en Ciencias	<input type="checkbox"/> Doctorado en Ciencias	<input type="checkbox"/> Doctorado
Nombre Franco Armando Guerrero Valencia	Firma 	
Programa Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola	Fecha de ingreso 21-01-2019	
Título de la Tesis Avances biotecnológicos en <i>Capsicum</i> L.		

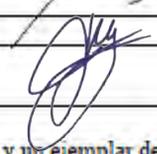
(2) Comité Asesor, aprobando la Tesis de Grado

	Nombre	Firma	Programa
Presidente	Dr. José Luis Rodríguez de la O		Biotecnología Agrícola
Asesor	Dr. José Óscar Mascorro Gallardo		Biotecnología Agrícola
Asesor	Dr. Mario Pérez Grajales		Horticultura
Lector Externo			

(3) Presidente del Comité Asesor, aceptando el artículo científico derivado de la tesis

Nombre		Firma 
Calificación de investigación 95	No. de créditos 10	

(4) Sanción favorable de la revisión de la tesis y del artículo, por el Coordinador del Programa

Nombre del Coordinador: Dr. José Óscar Mascorro Gallardo	Fecha: 13-07-2021	Firma 
---	----------------------	---

(5) Una vez cubiertos los requisitos anteriores, el estudiante debe entregar esta forma con siete copias y un ejemplar de la tesis a la Coordinación General de Estudios de Posgrado (CGEP), la que se sellará de recibido, retendrá el último tanto y en un término de quince días hábiles emitirá su sanción.

(6) Aprobación de la fecha de Examen de Grado por parte del Coordinador General de Estudios de Posgrado.

Fecha: 21 de julio 2021	Lugar: Zoom id: 818 3202 7374	Hora: 12:00 HS	Sanción del CGEP y fecha 21 de julio de 2021	
----------------------------	----------------------------------	-------------------	---	---

Chapingo, Méx. a 13 de julio de 2021

**INSTRUCCIONES:**

- A. Los números en paréntesis señalan la secuencia de requisitación.
- B. Esta forma totalmente requisitada deberá ser entregada a la Oficina de Registros Escolares, la que retendrá el original y sellará de recibido los tantos restantes, que el estudiante debe entregar a: 1) Coordinación del Programa, 2) Coordinación General de Estudios de Posgrado, 3) Integrantes del Comité Asesor, 4) al propio estudiante, en cuyo tanto podrá recabar firmas de recibido.
- C. La Oficina de Registros Escolares, si es procedente, emitirá en un plazo no mayor de tres días hábiles la correspondiente autorización del examen de grado (forma RE-EG).



"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

**UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO**  
**INSTITUTO DE HORTICULTURA**  
**Departamento de Fitotecnia**



Chapingo, Edo. de México a 14 de julio de 2021

**NUMERO DE OFICIO:** HORT2021/112

**ASUNTO:** MPP22. Solicitud de prórroga para examen de grado

**DR. MAXIMINO HUERTA BRAVO**  
**COORDINADOR GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**P R E S E N T E.**

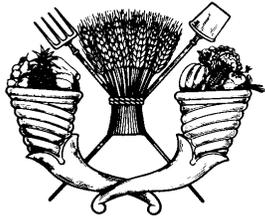
Considerando que no se cumplió con el Artículo 53 del Reglamento General de Estudios de Posgrado, por este medio solicito a usted de la manera más atenta considerar una prórroga para la presentación del examen de grado antes del día 30 de julio del año en curso, del **C. FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA**, con no. de matrícula **1813001-3**, del Programa de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola.  
Agradeciendo de antemano sus atenciones, se despide de usted.

ATENTAMENTE

**DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO**  
**COORDINADOR DE LOS PROGRAMAS DE ESTUDIO**  
**DE POSGRADO DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA**  
**Y DEL INSTITUTO DE HORTICULTURA**



C.c.p. Dr. José Oscar Mascorro Gallardo.  
C. Franco A. Guerrero Valencia  
Coordinación de Estudios de Posgrado de Fitotecnia.- presente



"Enseñar la Explotación de la  
Tierra. No la del Hombre"

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**Departamento de Fitotecnia**  
**Academia de Fruticultura**

**A S U N T O: Dictamen de resumen**

Chapingo, México, 15 de julio 2021

**DR. JOSÉ OSCAR MARCORRO GALLARDO**  
COORDINADOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO  
P R E S E N T E

Por este medio le hago saber que el resumen en inglés con título "**AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum L.***", de la estudiante de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola C. **Franco Armando Guerrero Valencia** de matrícula 1813001-3, se aprueba con cambios que se anexan en el archivo Word, así como observaciones a las palabras clave.

Sin más por el momento me despido de usted con un cordial saludo y quedo a su orden para cualquier aclaración.

Atentamente

*"Enseñar la Explotación de la Tierra, No la del Hombre"*

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Alejandro F. Barrientos-Priego**  
**Profesor-Investigador**  
**Departamento de Fitotecnia**  
**Universidad Autónoma Chapingo**  
**Correo-e: [abarrien@correo.chapingo.mx](mailto:abarrien@correo.chapingo.mx)**

ccp. Expediente FRU  
ccp. Dr. José Luis Rodríguez de la O. Director de tesis. Presente



"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

**UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO**  
**INSTITUTO DE HORTICULTURA**  
**Departamento de Fitotecnia**



Chapingo, Edo. de México a 14 de julio 2021

**NUMERO DE OFICIO:** HOR2021/113

**ASUNTO:** Autorización de examen de grado

**DR. MAXIMINO HUERTA BRAVO**  
**COORDINADOR GENERAL**  
**DE POSGRADO**  
**P R E S E N T E:**

Con base en el Artículo 54 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la Universidad Autónoma Chapingo, por este conducto me permito solicitar de la manera más atenta su autorización para que el **C. FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA** con matrícula **1813001-3**, estudiante de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola generación 2019-2020, y una vez cumplidos los requisitos necesarios, se le autorice para llevar a cabo el examen de grado.

Sin otro particular a tratar por el momento, se despide de usted.

Atentamente



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo  
Coordinador de Estudios de Posgrado del  
Departamento de Fitotecnia  
y del Instituto de Horticultura

c.c.p.- Coordinación del Posgrado de Fitotecnia.- presente



"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

# UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

## DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA



Chapingo, Edo. de México a 12 julio 2021

Número de oficio: s/n

Asunto: Autorización de Tesis

### A QUIEN CORRESPONDA PRESENTE

Por este medio hago de su conocimiento que el comité asesor y un servidor hemos revisado el documento de tesis titulado:

### **AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum L.***

de el **C. Franco Armando Guerrero Valencia** con matrícula **1813001-3**, estudiante de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, generación 2019-2020 y después de realizar las correcciones pertinentes, **APRUEBO** dicho documento de tesis.

Sin otro particular a tratar por el momento, me despido de usted.

**ATENTAMENTE**

*"Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre"*

**DR. JOSÉ LUIS RODRIGUEZ DE LA O**  
Director de Tesis  
Profesor Investigador del Depto. de Fitotecnia

c.c-p. Franco Armando Guerrero Valencia.- Alumno



"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

**UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO**  
**INSTITUTO DE HORTICULTURA**  
**Departamento de Fitotecnia**



Chapingo, Edo. de México a 14 de julio 2021

**NUMERO DE OFICIO:** HOR2021/115

**ASUNTO:** Verificación de tesis

**DR. MAXIMINO HUERTA BRAVO**  
**COORDINADOR GENERAL**  
**DE POSGRADO**  
**P R E S E N T E:**

Por medio del presente, hago de su conocimiento que hemos revisado los registros del SIP de el estudiante **FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA** de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola con matrícula **1813001-3**, y corroboramos que el título de la tesis entregada es el mismo que aparece en el registro con el título:

**AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum L.***

de la Línea de Ingeniería Genética de Plantas. De igual manera, el Comité Asesor es el mismo que se registró y el que aprobó la tesis del estudiante mediante firmas:

Director: Dr. José Luis Rodríguez de la O  
Asesor: Dr. José Oscar Mascorro Gallardo  
Asesor: Dr. Mario Pérez Grajales

Sin otro particular a tratar por el momento, se despide de usted.

Atentamente

Dr. José Oscar Mascorro Gallardo  
Coordinador de Estudios de Posgrado  
del Departamento de Fitotecnia  
y del Instituto de Horticultura



c.c.p.- Archivo de la CPDF.- presente

## AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum* L. BIOTECHNOLOGICAL ADVANCES IN *Capsicum* L.

Franco Armando Guerrero-Valencia\*; José Luis Rodríguez-de la O; José Óscar Mascorro-Gallardo; Mario Pérez-Grajales

Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco, Km 38.5, Chapingo, Estado de México, C. P. 56230. Correo-e: guerrerofranco066@gmail.com (\*Autor responsable).

### Resumen

El chile es un cultivo muy importante a nivel mundial. Perteneció al género *Capsicum*, el cual forma parte de la familia Solanaceae e incluye diferentes variantes de chiles que se reconocen fácilmente por su tamaño, forma, color y grado de pungencia. A pesar de su importancia, la producción de chiles frecuentemente se ve afectada por factores bióticos (causado por animales, plantas, hongos, bacterias, virus, etc.) y abióticos, como sequía, calor, heladas y salinidad, lo cual influye en su desarrollo, rendimiento y productividad. Existen ciertas limitaciones en el uso de las técnicas clásicas del mejoramiento genético vegetal, por ejemplo, se requiere de muchos años de trabajo para obtener plantas con caracteres deseados, no es posible controlar los genes de interés que se transfieren de los progenitores a la descendencia, y en muchos casos los resultados son inciertos. Por consiguiente, el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y la transformación genética, entre otras, proveen de alternativas viables en los programas de mejoramiento para conseguir mejores cultivares de chile. Esta revisión aborda los avances biotecnológicos que se han logrado hasta la fecha con respecto al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, transformación genética, mutagénesis, análisis de la diversidad genética, bioinformática, fitoquímica y edición genética que se han realizado en el género *Capsicum*, recalcando la importancia y aplicaciones prácticas de estos estudios en el mejoramiento genético vegetal.

**Palabras clave:** Chiles, Biotecnología, Genotecnia, Estrés, Producción, *Agrobacterium*.

### Abstract

Chili is an important crop worldwide. It belongs to the genus *Capsicum*, which is part of the Solanaceae family and includes different varieties of chili peppers that are recognized by their size, shape, color, and level of pungency. Despite its importance, the production of chili peppers is often affected by biotic factors (caused by animals, plants, fungi, bacteria, viruses, etc.) and abiotic factors, such as drought, heat, frost, and salinity, which influences their development, performance, and yield. There are certain limitations in the use of the classic techniques of plant breeding, for example, it requires many years of work to get plants with desired characters, it is not possible to control the genes of interest that are transferred from the parents to the offspring, and in many cases the results are uncertain. Therefore, the use of biotechnological tools such as plant tissue culture and genetic transformation, among others, provide viable alternatives in breeding programs to obtain better chili cultivars. This review addresses the biotechnological advances that have been achieved to date concerning the plant tissue culture, genetic transformation, mutagenesis, genetic diversity analysis, bioinformatics, phytochemistry, and gene editing that have been performed in the genus *Capsicum*, emphasizing the importance and practical applications in plant breeding.

**Keywords:** Chili peppers, Biotechnology, Plant breeding, Stress, Production, *Agrobacterium*.



## INTRODUCCIÓN

El chile es un cultivo muy importante a nivel mundial. Pertenece al género *Capsicum*, el cual forma parte de la familia Solanaceae e incluye diferentes variantes de chiles que se reconocen fácilmente por su tamaño, forma, color y grado de pungencia (Pérez-Castañeda, Castañón-Nájera, Ramírez-Meraz, & Mayek-Pérez, 2015). Este género es originario de las regiones tropicales de América, donde se distribuye desde México hasta Brasil, Paraguay y Argentina (Carrizo-García *et al.*, 2016). Consta de 35 especies, cinco de las cuales se cultivan como hortalizas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum baccatum* L. y *Capsicum pubescens* Ruiz & Pavón (Barboza, Carrizo-García, Leiva-González, Scaldaferrro, & Reyes, 2019; Ibiza, Blanca, Cañizares, & Nuez, 2012).

Además de ser un alimento nutritivo, también es fuente de colorantes naturales y compuestos secundarios, todos ellos utilizados en la elaboración de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos (Aguirre-Hernández & Muñoz-Ocoero, 2015). Es un cultivo importante, desde los puntos de vista cultural, agronómico, nutricional y económico (Aguirre-Mancilla *et al.*, 2017). En el año 2018 se sembraron alrededor de 3.7 millones de hectáreas destinadas a la producción de esta hortaliza a lo largo de todo el mundo (FAOSTAT, 2021).

A pesar de su importancia, la producción de chiles frecuentemente se ve afectada por factores bióticos (causado por animales, plantas, hongos, bacterias, virus, etc.) y abióticos, como sequía, calor, heladas y salinidad (Chhapekar, Jaiswal, Ahmad, Gaur, & Ramchiary, 2018), lo cual influye en su desarrollo, rendimiento y productividad.

El mejoramiento genético convencional en combinación con el uso de buenas prácticas agrícolas ha contribuido con avances sustanciales en el cultivo de chiles, ya que de este modo se han obtenido variedades con mejores características (Kothari, Joshi, Kachhwaha, & Ochoa-Alejo, 2010). Sin embargo, existen ciertas limitaciones en el uso de estas técnicas, por ejemplo, se requiere de muchos años de trabajo para obtener plantas con caracteres deseados, no es posible controlar los genes de interés que se transfieren de los progenitores a la descendencia, y en muchos casos los resultados son inciertos (Ulukan, 2009). Por consiguiente, el uso de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales y la transformación genética, entre otras, proveen de alternativas viables en los programas de mejoramiento para conseguir mejores cultivares de chile (Kothari *et al.*, 2010). Con esta tecnología es posible crear y preservar variabilidad genética, seleccionar y clonar de genotipos superiores, eliminar bacterias y virus

fitopatógenos, rescatar embriones como resultado de cruza intra e interespecíficas, preseleccionar materiales tolerantes a estrés (biótico y abiótico), y acelerar los programas de mejoramiento genético para *Capsicum* (Monteiro do Rego, Ramalho do Rego, & Barroso, 2016).

Hoy en día se dispone de la secuencia completa del genoma del chile criollo de Morelos (*C. annuum* cv. CM334) (Kim *et al.*, 2014), del cultivar Zunla-1 (*C. annuum* L.) y su progenitor silvestre, el chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*) (Qin *et al.*, 2014). Esta información representa grandes avances con respecto al conocimiento del chile, lo cual permitirá a mediano plazo entender los mecanismos moleculares que modulan la forma y tamaño del fruto, la arquitectura de la planta, el contenido de capsaicina, así como también los factores que intervienen durante el ataque de plagas y enfermedades, con lo que será posible desarrollar mejores variedades en un menor tiempo utilizando las nuevas herramientas (Ahn *et al.*, 2018).

Esta revisión aborda los avances biotecnológicos que se han logrado hasta la fecha con respecto al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, transformación genética, mutagénesis, análisis de la diversidad genética, bioinformática, fitoquímica y edición genética que se han realizado en el género *Capsicum*, recalcando la importancia y aplicaciones prácticas de estos estudios en el mejoramiento genético vegetal.

## BIOTECNOLOGÍA DE LOS CHILES

Después del redescubrimiento y confirmación del trabajo pionero de Gregorio Mendel a inicios del siglo XX, varias plantas de la familia de las solanáceas se convirtieron en objeto de investigación genética como plantas modelo, además de su importancia agrícola. Estas plantas, que primero funcionaron como modelo en investigación básica y posteriormente en genética celular y molecular, fueron los tomates, la papa, berenjena (*Solanum*), las petunias (*Petunia*) y el tabaco (*Nicotiana*) (Gebhardt, 2016). Sin embargo, los chiles no han figurado como plantas modelo, y los trabajos realizados son escasos. Particularmente en cultivo *in vitro* e ingeniería genética la información es limitada, al respecto, Kothari *et al.* (2010) mencionan que la tasa de progreso en investigación biotecnológica en el género *Capsicum* es relativamente baja con respecto a otras solanáceas debido a la alta genotipo-dependencia y a su naturaleza recalcitrante.

Estudios preliminares indican que las plantas del género *Capsicum* son recalcitrantes con respecto al cultivo *in vitro* de células y tejidos, por lo que la manipulación bajo estas condiciones es más complicada que otras solanáceas

(Kothari *et al.*, 2010; Seguí-Simarro, Corral-Martínez, Parra-Vega, & González-García, 2011). También está documentado que durante la multiplicación *in vitro*, los brotes no se definen bien y tienden a agruparse en forma de rosetas, y las respuestas son genotipo-dependientes, por lo que la transformación genética se ve afectada.

### **Naturaleza recalcitrante**

Se dice que una especie es recalcitrante cuando sus células, tejidos u órganos son incapaces de responder a las manipulaciones que se les realiza durante el cultivo de tejidos (Benson, 2000). Con respecto a la regeneración *in vitro*, este fenómeno puede ser uno de los mayores obstáculos para la explotación mediante el uso de la biotecnología de plantas en especies de suma importancia económica (Benson, 2000). Sin embargo, seleccionando el explante adecuado y modificando los diferentes componentes del medio de cultivo puede ayudar a superar este problema (Kothari *et al.*, 2010).

### **Arrosetamiento de brotes adventicios**

El arrosetamiento de los brotes también es un problema muy frecuente durante el cultivo *in vitro* de chiles. Esto limita la posibilidad de multiplicar el material durante cultivo y subsiguientes debido a que no están diferenciados totalmente y es difícil separarlos. Se sabe que el etileno, el cual se puede llegar a liberar dentro de los vasos de cultivo, juega un papel muy importante durante la regeneración de nuevos brotes adventicios, provocando que estos no se desarrollen adecuadamente, por lo que el uso de nitrato de plata ha producido resultados prometedores para sobrellevar este inconveniente (Gammoudi, Pedro, Ferchichi, & Gisbert, 2018).

### **Genotipo-dependencia**

En plantas de Chile, la genotipo-dependencia durante el cultivo *in vitro* es otra de las limitantes, y la mayoría de los estudios han sido para cultivares muy específicos, razón por la cual no se pueden usar protocolos generalizados para cualquier especie o grupo de plantas. La respuesta morfológica está determinada por la especie o variedad y las condiciones del medio de cultivo (Beltrán-Burboa, López-Peralta, Hernández-Meneses, & Cruz-Huerta, 2020), por lo que es necesario desarrollar metodologías para cada genotipo en particular (Haque & Ghosh, 2018).

## **SISTEMAS DE REGENERACIÓN *in vitro***

A pesar de las limitaciones antes mencionadas con respecto a la biotecnología de los chiles, algunas estrategias han hecho posible la regeneración de plantas a partir de células, tejidos y órganos cultivados *in vitro* mediante organogénesis

o embriogénesis (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001). Por ejemplo, el cultivo de anteras ha sido utilizado para regenerar plantas haploides y dobles haploides. Los sistemas organogénicos se han utilizado para micropropagar *in vitro*, así como también para transformación genética. La aplicación del cultivo de tejidos vegetales y la ingeniería genética en Chile ha permitido el desarrollo de cultivares resistentes a virus y estrés biótico y abiótico (Ochoa-Alejo & Ramirez-Malagon, 2001).

### **Organogénesis**

La organogénesis comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o de callos. Este proceso depende del balance de auxinas y citocininas y de la habilidad de los tejidos para responder a los reguladores de crecimiento vegetal durante el cultivo. La organogénesis sucede en tres fases, en la primera las células se vuelven competentes, en la segunda se desdiferencian y en la tercera ocurre propiamente la morfogénesis independientemente de las hormonas exógenas y puede ser de forma directa o indirecta (Stewart, 2016).

### **Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática se define como un proceso en el cual una estructura bipolar, semejante a un embrión cigótico, se desarrolla a partir de una célula no cigótica sin una conexión vascular con el tejido original (Von Arnold, Sabala, Bozhkov, Dyachok, & Filonova, 2002). Se diferencia de la embriogénesis cigótica en que es observable, las condiciones del cultivo se pueden controlar y la escasez de material no es un factor limitante para llevar a cabo la experimentación (Quiroz-Figueroa, Rojas-Herrera, Galaz-Avalos, & Loyola-Vargas, 2006). Los embriones somáticos se utilizan como modelos para estudios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares sobre la regulación del desarrollo embrionario, así como para realizar propagación vegetativa a gran escala, por lo que ofrece grandes aplicaciones biotecnológicas (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Este proceso sucede en varias etapas e inicia con la formación de masas pro-embriogénicas, seguido por la formación de los embriones somáticos, maduración y regeneración de plantas completas (Von Arnold *et al.*, 2002). A pesar de la importancia que tiene la embriogénesis somática y de la gran cantidad de estudios que se han realizado en diversas especies, aún hay muchos aspectos que no están del todo comprendidos (Jiménez, 2005).

La embriogénesis somática en *Capsicum* se ha reportado solamente para *C. annum*, *C. chinense* y *C. baccatum*, y únicamente para un número limitado de genotipos, cultivares o variedades con eficiencias de regeneración relativamente

bajas debido a la naturaleza recalcitrante del género. Es imperativo llevar a cabo más esfuerzos para solventar los problemas asociados a esto mediante la investigación sobre la capacidad embriogénica de más especies de chiles así como de los factores que podrían influenciar las respuestas (Ochoa-Alejo, 2016).

### **Tipos de explantes**

Como fuente de explantes para la inducción de embriones somáticos en chiles, se han utilizado principalmente embriones cigóticos maduros (Saadet Buyukalaca & Mavituna, 1996; López-Puc *et al.*, 2006) e inmaduros (Binzel, Sankhla, Joshi, & Sankhla, 1996; Harini & Lakshmi Sita, 1993; Jeong-Yon, Eun-Young, Dongsu, & Kwang-Woong, 1996), cotiledones (Kintzios *et al.*, 1998), segmentos de embriones cigóticos (Solís-Ramos *et al.*, 2010), primordios foliares (Kintzios *et al.*, 1998), hojas jóvenes (Kintzios, Drossopoulos, & Lympelopoulos, 2001; S. Kintzios, Drossopoulos, Shortsianitis, & Peppes, 2000), segmentos de tallo (Khan, Siddique, & Anis, 2006), ápices (Khan *et al.*, 2006) e hipocótilos (López-Puc *et al.*, 2006).

Los embriones cigóticos inmaduros que se han utilizado como fuente de explantes han sido recolectados a partir de frutos verdes de 2 a 4 semanas después de la antesis con una longitud de 1 a 7 mm para *C. annuum* cv. Nokkwang (Jeong-Yon *et al.*, 1996), y de 4 a 10 mm en *C. annuum* cv. Nuevo México-6 y Rajur Hirapur (Binzel *et al.*, 1996). Por otra parte, el uso de estructuras vegetativas derivadas de plántulas jóvenes ha implicado la germinación *in vitro* de semillas, por lo que estas se han cultivado en el medio MS (Khan *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007) así como de plantas desarrolladas en invernadero (S. Kintzios *et al.*, 2001, 2000; S. E. Kintzios *et al.*, 1998). Las respuestas de los explantes no se pueden generalizar para todas las especies y cultivares de chiles, ya que estas dependen principalmente del genotipo, los componentes del medio de cultivo y las condiciones de incubación.

### **Componentes del medio de cultivo**

La embriogénesis somática se ha dividido tradicionalmente en dos etapas principales: inducción y expresión. En la primera, las células somáticas adquieren características embriogénicas mediante un estado celular de completa reorganización, esto a nivel fisiológico, metabólico y de expresión génica (Jiménez, 2005). Es común que después de un cambio de condiciones (por ejemplo, medio de cultivo, composición de los reguladores de crecimiento vegetal, fuente de carbohidratos, potencial osmótico, etc.) se induzca a las células o tejidos a alcanzar el estado de expresión, en el

cual las células exhiben su capacidad embriogénica y se diferencian en embriones somáticos (Jiménez, 2005).

La mayoría de estudios sobre el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal durante la embriogénesis somática se han realizado con los grupos “clásicos” (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno) mientras que otras sustancias que tienen efectos similares a estas apenas comienzan a estudiarse (ácido jasmónico, ácido salicílico, brasinoesteroides y poliaminas) (Jiménez, 2005).

### **Inducción de callos embriogénicos**

Para la inducción de callos embriogénicos en chiles, se han utilizado principalmente auxinas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol 3-acético (AIA), el ácido 1-naftalenacético (ANA), y citocininas como la 6-bencilaminopurina (BAP).

Buyukalaca & Mavituna (1996) cultivaron embriones cigóticos de *C. annuum* cv. Ace en un medio MS sólido suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa. Los callos embriogénicos generados fueron transferidos a un medio MS líquido con 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa para incrementar la masa. De manera general observaron que el AIA estimuló la formación de callo no embriogénico, el ANA en baja frecuencia mientras que el 2,4-D fue el que mejores resultados presentó.

Kintzios *et al.* (1998) utilizaron cotiledones y primordios foliares de *C. annuum* cv. Colombo para inducir la formación de callos y embriones somáticos en un medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 3.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y 100 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa.

Kintzios, Drossopoulos, Shortsianitis, & Peppes (2000) partieron del uso de hojas jóvenes completamente expandidas de plántulas de *C. annuum* cv. Colombo y las cultivaron en un medio MS suplementado con 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 3.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP y 80 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y observaron que la formación de callos embriogénicos ocurrió dos semanas después de la siembra y fue mayor en las primeras hojas desde la base hasta el ápice cuando los explantes estuvieron en oscuridad durante tres semanas.

Kintzios, Drossopoulos, & Lympelopoulos (2001) estudiaron el efecto de diferentes vitaminas y micronutrientes inorgánicos sobre la proliferación de callo embriogénico a partir de hojas jóvenes de *C. annuum* cv. Colombo. Utilizaron un medio de cultivo MS con 3.0 mg·L<sup>-1</sup> de BAP, 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 80 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de tiamina-HCL en combinación con diferentes vitaminas. Los resultados indicaron que la embriogénesis

somática se ve favorecida con la adición de ácido nicotínico ( $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el incremento de la concentración de cobre.

Zapata-Castillo *et al.* (2007) usaron hipocótilos de chile habanero (*C. chinense*) y los cultivaron durante 30 días en un medio MS suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa para la inducción de callos embriogénicos. Una vez que los callos se formaron fueron transferidos a un medio líquido con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D para obtener células en suspensión e inducir la formación de embriones somáticos.

Solís-Ramos *et al.* (2010) utilizaron segmentos de embriones cigóticos para inducir callos embriogénicos en un medio MS semisólido suplementado con  $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. A los 60 días después de la siembra observaron estructuras proembriogénicas que se comenzaron a formar en los callos.

### **Embriogénesis somática directa**

El primer trabajo realizado en Chile sobre embriogénesis somática fue el de Harini & Lakshmi Sita (1993), quienes utilizando embriones cigóticos inmaduros de *C. annuum* cultivados en el medio de cultivo de Murashige & Skoog (1962) (MS) suplementado con 2,4-D ( $1-5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), agua de coco ( $100 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y altas concentraciones de sacarosa ( $80-100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) consiguieron regenerar directamente embriones somáticos a los 15 días después de la siembra sin la formación de callos como proceso intermedio. Los nuevos embriones se comenzaron a formar directamente del eje embrionario de los explantes y de los bordes de los cotiledones.

Binzel, Sankhla, Joshi, & Sankhla (1996) usaron embriones inmaduros de dos cultivares de *C. annuum*, Nuevo México-6 y Rajur Hirapur, los cultivaron en un medio de cultivo MS suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $2.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ, agua de coco ( $100 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y sacarosa en altas concentraciones ( $60-100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los embriones somáticos se formaron directamente a partir de los ápices, ejes y cotiledones de los explantes. Las examinaciones histológicas mostraron que también ocurrió embriogénesis secundaria desde los embriones primarios.

Del mismo modo, Jeong-Yon, Eun-Young, Dongsu, & Kwang-Woong (1996) partieron del uso de embriones inmaduros de *C. annuum* cv. Nokkwang como fuente de explantes. La generación directa de embriones somáticos (88.9%) ocurrió cuando los explantes se cultivaron en un medio MS modificado (la concentración de Fe-EDTA se redujo a la mitad) con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D después de 3 semanas de incubación en oscuridad. Los embriones se generaron desde el ápice y los cotiledones de los explantes.

Khan, Siddique, & Anis (2006) usaron segmentos de tallo y ápices de Chile "Pusa Jwala" (*C. annuum*) y los cultivaron en un medio MS con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, con lo que observaron la generación directa de embriones, específicamente en la etapa globular a las dos semanas después de la siembra.

López-Puc *et al.* (2006) usaron diversos explantes de Chile habanero BVII-03 (*C. chinense*) y los cultivaron en un medio MS con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. Se observó la presencia de embriones somáticos en cotiledones, embriones cigóticos e hipocótilos.

Kaparakis & Alderson (2008) cultivaron embriones inmaduros de tres cultivares de *C. annuum* en un medio MS suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $100 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de agua de coco y  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa como medio básico, al cual le añadieron distintas citocininas para evaluar el efecto sobre la capacidad embriogénica. Los embriones somáticos se comenzaron a generar a partir de las dos semanas directamente de los meristemos apicales y los cotiledones de los explantes. No encontraron diferencias significativas con la adición de 2iP, y KIN.

Aboshama (2011) utilizó hipocótilos de dos cultivares de *C. annuum* (California Wonder y Baldy) y encontró que la generación de embriones somáticos se vio favorecida en un medio de cultivo WPM suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D o TDZ. Además, la adición de  $\text{AgNO}_3$  al medio de cultivo mejora sustancialmente las respuestas.

Venkataiah, Bhanuprakash, Suman Kalyan, & Subhash (2016) desarrollaron una metodología para la generación directa de embriones somáticos de *C. baccatum* cv. PI 260434 utilizando cotiledones y hojas de plántulas germinadas *in vitro*. Para esto, utilizaron el medio MS suplementado con  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN y  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa. Los embriones somáticos se comenzaron a formar entre 15 y 20 días después de la siembra.

### **Maduración de embriones**

Un paso crítico durante la embriogénesis somática es el proceso de maduración. La maduración de los embriones somáticos en algunos casos se ha llevado a cabo en el mismo medio de inducción de embriogénesis somática (Binzel *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2006). En otros, se ha realizado con el uso de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ácido absísico (López-Puc *et al.*, 2006) y  $3.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$  (Jeong-Yon *et al.*, 1996) y con la mitad de la concentración de las sales inorgánicas del medio de cultivo MS (Saadet Buyukalaca & Mavituna, 1996). Aboshama (2011) utilizó  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ABA,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de L-glutamina y  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de caseína hidrolizada para

madurar embriones somáticos de dos cultivares de *C. annuum* (California Wonder y Baldy). Venkataiah *et al.* (2016) usaron  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP para madurar embriones cigóticos de *C. baccatum* en etapa de torpedo.

### Germinación de embriones

En *C. annuum* cv. California Wonder, Harini & Lakshmi Sita (1993) lograron germinar embriones somáticos exitosamente con el uso de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y  $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de sacarosa, los cuales desarrollaron raíces y brotes a los 15 días y generaron plantas completamente normales una vez que se aclimatizaron. Binzel *et al.* (1996) usaron  $1.7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AgNO}_3$ ,  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  o  $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TDZ para germinar embriones de dos cultivares de *C. annuum* (Nuevo México-6 y Rajur Hirapur) y se desarrollaron plantas normales una vez que se transfirieron a macetas. López-Puc *et al.* (2006) lograron germinar embriones de chile habanero (*C. chinense*) con  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$ .

### Cultivo de anteras para la generación de haploides

Una planta haploide es aquella que tiene un número cromosómico gametofítico y un doble haploide es un haploide que ha sufrido una duplicación de sus cromosomas (Germanà, 2011). La producción de haploides y dobles haploides mediante embriogénesis gamética permite el desarrollo de líneas completamente homocigóticas a partir de material heterocigótico en un tiempo relativamente corto en comparación con los métodos convencionales los cuales emplean varias generaciones de autofecundación (Germanà, 2011). La producción de haploides provee de una herramienta biotecnológica muy atractiva, y el desarrollo de técnicas y protocolos ha tenido un impacto significativo en los sistemas agrícolas. Actualmente, esta estrategia representa una parte integral de los programas de fitomejoramiento de muchas especies de importancia agronómica (Germanà, 2011).

Los programas tradicionales de mejoramiento genético de chiles son procesos a largo plazo y muy demandante de labores debido al control que se debe tener en la polinización y a la necesidad de aislamiento para prevenir la degeneración del material seleccionado (Irikova, Grozeva, & Rodeva, 2011). Esto se podría sobrellevar mediante los métodos de cultivo *in vitro* para la generación de plantas haploides. En chiles, la generación de haploides incluye la inducción y regeneración de embriogénesis gamética a partir del cultivo de anteras o microesporas. No obstante, todavía no se tiene un protocolo eficiente para todas las especies dentro de este género y existe variabilidad en los resultados obtenidos (Irikova *et al.*, 2011), por lo que es necesario ajustar los

factores que intervienen en este proceso para cada material en particular.

El cultivo *in vitro* de anteras para la regeneración de plantas haploides de chile inicia en la década de los 70 con los trabajos pioneros de Wang, Sun, Wang, & Chien (1973) con *C. annuum* cv. Yeo Hsien Small Red Pepper, y George & Narayanaswamy (1973) con *C. annuum* var. *grossum*. Desde entonces, existen diversos reportes donde se han estudiado los distintos factores con el fin de mejorar la eficiencia de los protocolos.

### Condiciones de crecimiento y edad de la planta

Las anteras para la generación de haploides mediante el cultivo *in vitro* de microesporas se pueden obtener de plantas crecidas en campo o bajo condiciones controladas (Irikova *et al.*, 2011). Ercan, Sensoy, & Sirri Sensoy (2006) mencionan que la edad de la planta, el genotipo y la temporada de recolección de las anteras afecta el desarrollo *in vitro*.

### Estado de desarrollo de la microespora

El estado de desarrollo de los granos de polen es un factor complejo que influye fuertemente sobre el éxito del cultivo de anteras. La capacidad embriogénica difiere según la especie, pero de manera general, el periodo de sensibilidad para inducir esto se encuentra entre la primera mitosis y la etapa bicelular media (Germanà, 2011).

Wang, Li, & Jiang (1981) estudiaron el efecto del estado del desarrollo de los granos de polen de *C. annuum* y *C. annuum* var. *grossum* y encontraron que durante la etapa uninucleada se presentan las mejores respuestas embriogénicas. Supena, Suharsono, Jacobsen, & Custers (2006) obtuvieron las mejores respuestas cuando los botones florales tenían más del 50% de los granos de polen en etapa unicelular tardía, mientras que Lantos *et al.* (2009) cuando el 80% se encontraba en etapa uninucleada y el 20% en binucleada. Por consiguiente, la mayoría de estudios que se han realizado, han utilizado los granos de polen cuando se encuentran en estas etapas (Kim *et al.*, 2008).

### Medio de cultivo

Existen varios medios de cultivo que se han utilizado para la inducción de embriogénesis gamética en chile, aunque ha predominado el uso del medio MS y el de Dumas de Vault, Chambonnet, & Pochard (1981). La composición final del medio de cultivo se modifica principalmente cambiando la concentración y combinación de reguladores de crecimiento y otros suplementos, como sacarosa, aminoácidos y algunas vitaminas.

## Reguladores de crecimiento vegetal

Se ha reportado el uso de ANA ( $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), KIN ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y BAP ( $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Wang *et al.*, 1981), así como bajas concentraciones de 2,4-D, picloram o AIA ( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en combinación con KIN o BAP ( $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (Munyon, Hubstenberger, & Phillips, 1989). Qin & Rotino (1995) probaron anteras de 17 cultivares de *C. annuum* (picantes y no picantes) y las cultivaron en un medio MS suplementado con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN y en  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP. (Supena *et al.*, 2006) usaron  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de zeatina en combinación con  $0.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA durante el cultivo de anteras de varios materiales de *C. annuum* de Indonesia. Olszewska, Kisiala, Niklas-Nowak, & Nowaczyk (2014) trabajaron con 17 genotipos de chiles (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* var. *pendulum*; *C. frutescens* x *C. chinense*, y *C. frutescens* x *C. baccatum*) y observaron las mejores respuestas con el uso de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN y a los 14 días después incrementarse a  $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## Suplementos del medio de cultivo

El uso de sacarosa como fuente de carbono en concentraciones de 30 a 60 ha producido buenos resultados, además de  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de caseína hidrolizada (Wang *et al.*, 1981). La adición de 10 a  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de maltosa, y el enriquecimiento del aire con  $900 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  generó buenas respuestas en pimiento morrón (*C. annuum*) (Dolcet-Sanjuan, Claveria, & Huerta, 1997). Otro compuesto que mejora sustancialmente las respuestas durante el cultivo de anteras es el  $\text{AgNO}_3$ , y se ha usado en dosis de  $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Buyukalaca, Comlekcioglu, Abak, Ekbiç, & Kilic, 2004). También se ha reportado el uso de carbón activado en dosis de  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Supena *et al.*, 2006).

## Tratamiento de estrés por temperatura

Kristiansen & Andersen (1993) mencionan que un tratamiento de  $26.4^\circ\text{C}$  a las plantas donadoras de anteras promueve una mayor formación de embriones gaméticos durante el cultivo *in vitro*. La incubación durante una semana a  $9^\circ\text{C}$  ayuda a generar un mayor porcentaje de callos embriogénicos (Supena *et al.*, 2006). Koleva-Gudeva, Spasenoski, & Trajkova (2007) evaluaron distintas condiciones de temperatura y luz en *C. annuum* y encontraron que mediante la incubación de las anteras a  $35^\circ\text{C}$  en oscuridad durante ocho días, seguido de cuatro días en luz (12 horas a  $25^\circ\text{C}$  se generaron embriones).

## Determinación del nivel de ploidía

Para evaluar el origen y nivel de ploidía de las plantas de chile regeneradas mediante cultivo *in vitro* de anteras se han utilizado diversas herramientas, como citometría de flujo (Keleş *et al.*, 2015; Nowaczyk, Nowaczyk, & Olszewska, 2015; Nowaczyk & Kisiala, 2006), caracterización con isoenzimas (Munyon *et al.*, 1989) y marcadores moleculares de tipo SSR (Keleş *et al.*, 2015; Parra-Vega, Renau-Morata, Sifres, & Seguí-Simarro, 2013).

## Duplicación del genoma haploide

En algunos casos, las plántulas derivadas del cultivo *in vitro* de anteras presentan un genoma diploide homogéneo, lo cual sugiere una duplicación espontánea del material genético (Luitel & Kang, 2013). En otros casos, esto se induce mediante el uso de colchicina, como lo reportan Wang *et al.* (1981), quienes usaron un tratamiento de  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 24 horas, mencionando que las plantas regeneradas fueron totalmente fértiles.

## Rescate de embriones

El cultivo de embriones ha tenido muchas aplicaciones significativas en el fitomejoramiento, así como también en estudios básicos de fisiología y bioquímica vegetal. El rescate y cultivo de embriones inmaduros es una técnica particularmente atractiva para la recuperación de plantas derivadas de cruces sexuales en donde la mayoría de los embriones cigóticos no pueden sobrevivir *in vivo* o se vuelven latentes por largos periodos de tiempo (Sahijram & Rao, 2015; Shen, Gmitter, & Grosser, 2011). En chiles no se han realizado muchos estudios al respecto, por lo que la información es limitada y los que existen han sido con el objetivo de realizar introgresión génica mediante hibridación entre distintas especies (Manzur, Fita, Prohens, & Rodríguez-Burruezo, 2015), y para acortar los tiempos entre cruces durante el mejoramiento genético.

Hossain, Minami, & Nemoto (2003) usaron un medio MS suplementado con  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de caseína hidrolizada,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de extracto de levaduras,  $150 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de agua de coco,  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  y  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA para recuperar embriones cigóticos de un híbrido entre *C. annuum* y *C. frutescens*, y observaron que el mejor momento para colectar los embriones se encontró entre los 28 y 33 días después de la polinización. Para confirmar el origen interespecífico de las plantas recuperadas usaron marcadores moleculares de tipo RAPD.

Jae, Dong, Jae, & Hyo (2006) usaron el rescate de embriones para realizar introgresión génica desde *C. baccatum* hacia *C. annuum* mediante hibridación, debido a que con los métodos convencionales los embriones son abortados. Los embriones fueron colectados entre 15 y 50 días después de la

polinización y los cultivaron en un medio MS suplementado con 10 mg·L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y 80 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa, mientras que las plántulas regeneradas fueron cultivadas sin reguladores de crecimiento y 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa.

Debbarama, Khanna, Tyagi, Rai, & Meetei (2013) realizaron cruces interespecíficas entre *C. annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, y colectaron los embriones derivados de esto entre 27 y 33 días después de la polinización para cultivarlos en un medio MS suplementado con 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y 0.05 mg·L<sup>-1</sup> de ANA. Para comprobar el origen interespecífico realizaron una caracterización morfológica y molecular con marcadores de tipo RAPD.

Manzur, Penella, & Rodríguez-Burruezo (2013) evaluaron el efecto de los genotipos, el estado de desarrollo de los embriones y la composición del medio de cultivo en 10 materiales de distintas especies de chiles (4 de *C. annuum*, 2 de *C. chinense*, 1 de *C. frutescens*, 2 de *C. baccatum* y 1 de *C. pubescens*). Encontraron que las respuestas dependen altamente del genotipo y que los embriones responden mejor cuando se encuentran más desarrollados, mientras que, con respecto a la composición del medio, una concentración de 40 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y la mitad de las sales MS favorecieron de mejor forma el desarrollo de los embriones *in vitro*.

Manzur, Calvache-Asensio, & Rodríguez-Burruezo (2014) usaron embriones inmaduros de 4 genotipos de *C. annuum* y evaluaron el efecto de la incubación con luz y oscuridad, además de la combinación de diversos reguladores de crecimiento. Observaron que cuanto mayor sea el estado de desarrollo del embrión, mayores las respuestas, pero en etapa globular (la más temprana) se puede mejorar si se combina con el uso de bajas concentraciones de AIA y ZEA (0.01 mg·L<sup>-1</sup> de cada una) y un periodo de incubación inicial de cinco días en oscuridad.

### **Cultivo de protoplastos**

Un protoplasto es una célula vegetal aislada en la cual la pared celular ha sido removida mediante métodos mecánicos o enzimáticos. Los protoplastos son un buen modelo para el estudio de diversos aspectos de la biotecnología moderna. Gracias a esto se han realizado estudios en genómica, proteómica y metabolómica. Actualmente existen procedimientos para la obtención y cultivo de protoplastos de varias especies (Davey, Anthony, Power, & Lowe, 2005).

#### **Aislamiento**

El aislamiento de protoplastos comúnmente se ha realizado mediante el uso de enzimas que digieren la pared celular de los vegetales. Saxena, Gill, Rashid, & Maheshwari (1981) aislaron protoplastos de *C. annuum* cv. Yolo Wonder a partir

de células del mesófilo derivadas de plántulas de 15 días de edad, las cuales fueron colocadas en una solución del 2% de celulasa (Onozuka R10), 0.4% de Macerozima (R10) y 0.5 M de manitol durante 8 a 10 horas. Díaz, Moreno, & Power (1988) usaron brotes (de 3.5 a 4.0 cm de longitud) de plántulas germinadas *in vitro* de 4 genotipos de *C. annuum* (Americano, Dulce Italiano, Florida y Nigrum) y uno de *C. chinense*, los colocaron durante una hora en un medio CPW13M para plasmolizarlos y enseguida los incubaron en una solución enzimática conformada por 1% de celulasa Onozuka R10 y 0.25% de Macerozima durante 14 horas en oscuridad a 25 °C. Prakash, Sankara Rao, & Kumar (1997) usaron hojas jóvenes de tres semanas de edad para aislar protoplastos de *C. annuum* cv. California Wonder, las cuales fueron cortadas en piezas de 2 a 3 mm de longitud e incubadas durante la noche en una solución conformada por las sales CPW (Power & Chapman, 1985), manitol (9%), 0.2 mg·L<sup>-1</sup> de KIN, 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 2% de celulasa R10 y 0.5 % de Macerozima R10. Kue-Jae & Wang (2003) probaron distintos tiempos de incubación y proporciones de enzimas digestivas (celulasa y Macerozima) para aislar protoplastos de hojas de *C. annuum* var. *accumnatum* y *C. frutescens* cv. Bird chilli y encontraron que una mezcla de 2% de celulasa, 0.4% de Macerozima y 13% de manitol durante tres horas de incubación genera el mayor rendimiento de protoplastos aislados.

#### **Cultivo**

Saxena *et al.* (1981) usaron el medio NT o DPD con 1.0 mg·L<sup>-1</sup> de 2,4-D, ANA y BAP para cultivar protoplastos de *C. annuum* cv. Yolo Wonder, los cuales se comenzaron a dividir mitóticamente y formar callosa a partir del cuarto día después de la incubación. Prakash *et al.* (1997) utilizaron 2.0 mg·L<sup>-1</sup> de ANA y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de BAP para generar callos a partir de protoplastos de *C. annuum* cv. California Wonder, los cuales se comenzaron a formar a partir de los 45 días después de la siembra.

#### **Hibridación somática**

La hibridación somática en plantas mediante la fusión de protoplastos se ha convertido en una herramienta importante para el fitomejoramiento, permitiendo a los investigadores la combinación de células somáticas (total o parcial) de diferentes cultivares, especies o incluso géneros dando como resultado nuevas combinaciones genéticas (Grosser, Calovi, & Louzada, 2010). Con respecto a chiles, esta estrategia podría ayudar de manera sustancial a generar nuevos materiales aprovechando la diversidad genética que existe en los sitios de distribución natural del género *Capsicum*, pero actualmente no existen reportes de esta temática.

## Regeneración de plantas

Saxena, Gill, Rashid, & Maheshwari (1981) aislaron protoplastos de *C. annuum* cv. Yolo Wonder a partir de células del mesófilo. Los protoplastos se comenzaron a dividir mitóticamente y formar callos en un medio NT o DPD con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,4-D, ANA y BAP. A partir de los callos se regeneraron plantas completas sin complicaciones. Prakash *et al.* (1997) usaron  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA,  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AG3, y  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP para inducir la formación de nuevos brotes a partir de callos derivados del cultivo de protoplastos y los enraizaron con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP.

## ETAPAS DEL CULTIVO *in vitro* DE CHILES

El éxito del cultivo *in vitro* se debe ampliamente a que este proceso se separa en etapas de acuerdo con los diferentes estados de desarrollo, y en cada una de estas se manipula la composición del medio de cultivo y el control del ambiente (Davies, Geneve, Wilson, Hartmann, & Kester, 2018). Se reconocen cuatro etapas para la mayoría de las plantas: Establecimiento, se colocan los explantes en un medio de cultivo aséptico; Multiplicación, se induce la formación de brotes múltiples; Enraizamiento, se induce la formación de raíces en los brotes obtenidos durante la multiplicación; Aclimatización, las plántulas enraizadas se cambian a un ambiente heterotrófico (Davies *et al.*, 2018).

### Etapa I (establecimiento)

El primer paso en cualquier programa exitoso de cultivo *in vitro* es la selección de una fuente de explantes adecuada. Casi cualquier tejido u órgano vegetal se puede usar como explante, pero el grado de éxito obtenido depende del sistema de cultivo usado, el genotipo, y la remoción de contaminantes del explante (Torres, 1989). El objetivo principal del establecimiento es la obtención de un gran porcentaje de explantes libres de patógenos mediante la desinfestación del material vegetal (Davies *et al.*, 2018; Torres, 1989).

### Fuente de material vegetal

El primer trabajo relacionado con el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales con plantas de Chile fue realizado por Gunay & Rao (1978), quienes utilizaron semillas de dos variedades de pimiento (*Capsicum annuum*) y un híbrido de *Capsicum frutescens* durante el establecimiento, las cuales fueron puestas a germinar en el medio de cultivo MS. De igual modo, diversos autores (Beltrán-Burboa *et al.*, 2020; Christopher & Rajam, 1994; Ebida & Hu, 1993; Gogoi, Acharjee, & Devi, 2014; Golegaonkar & Kantharajah, 2006; Haque & Ghosh, 2018; N. Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno,

1990; Sripichitt, Nawata, & Shigenaga, 1987) reportan la germinación *in vitro* de semillas como etapa inicial del proceso para la obtención de distintos tipos de explantes.

## Desinfestación del material vegetal

Partiendo del uso de semillas como fuente de material vegetal, estas se han desinfestado mediante el uso de etanol (70%), cloro comercial (20-30%), cloruro de mercurio (0.1%), Tween 20<sup>®</sup> (0.5%) y algunos fungicidas como Benlate<sup>®</sup> ( $4.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Captán<sup>®</sup> ( $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y Bavistin<sup>®</sup> (2.5%) (Beltrán-Burboa *et al.*, 2020; Haque & Ghosh, 2018; Santana-Buzzy *et al.*, 2005; Sharma, Kumar, Giridhar, & Ravishankar, 2008). Todas las soluciones se preparan con agua destilada estéril y entre cada cambio de agente desinfectante se realizan de tres a cinco enjuagues con agua destilada estéril.

## Obtención de explantes

De las plántulas derivadas de semillas germinadas *in vitro* se han utilizado como explantes a los cotiledones, hipocótilos, yemas apicales, hojas jóvenes y segmentos nodales (Beltrán-Burboa *et al.*, 2020; Christopher & Rajam, 1994; Golegaonkar & Kantharajah, 2006; Gunay & Rao, 1978; Haque & Ghosh, 2018; Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno, 1990; Sripichitt *et al.*, 1987). También se han utilizado segmentos de hoja de plántulas en condiciones de invernadero, lo cual posee la ventaja de que se obtiene mayor cantidad de explantes sin la necesidad de utilizar grandes cantidades de semilla (Kim & Lim, 2019).

### Etapa II (multiplicación)

Gunay & Rao (1978) utilizaron cotiledones e hipocótilos de plántulas germinadas *in vitro* de tres variedades de Chile y encontraron una fuerte interacción entre BAP y AIA durante la inducción de brotes. Sripichitt *et al.* (1987) observaron más apropiados a los explantes de cotiledones de 12 días de edad en pimiento (*Capsicum annuum*) cultivados en un medio MS suplementado con  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP (11.9 brotes por explante). Ochoa-Alejo & Ireta-Moreno (1990) reportan el uso de hipocótilos como fuente de explantes en 16 variedades de Chile (*Capsicum annuum*), y mencionan que la capacidad de regeneración de nuevos brotes adventicios se encuentra fuertemente influenciada por el genotipo. Ebida & Hu (1993) evaluaron la capacidad morfogénica de cotiledones, yemas apicales, hipocótilos y raíces de plántulas de pimiento (*Capsicum annuum*) y encontraron que los cotiledones generan mayor número de brotes con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, las yemas apicales con  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y los hipocótilos con  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA y  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, mientras que las raíces no demostraron poseer capacidad de regeneración de nuevos brotes.

Utilizando yemas apicales, Christopher & Rajam (1994) obtuvieron hasta 11 brotes axilares en *Capsicum praetermissum* con el uso de  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TIBA, mientras que en *Capsicum annuum* las mejores respuestas se obtuvieron con  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de TIBA con una media de 8 brotes, lo que también indica que las respuestas se encuentran fuertemente influenciadas por el genotipo. Por su parte, Golegaonkar & Kantharajah (2006) evaluaron cinco cultivares de *Capsicum annuum* y observaron que los explantes de hojas jóvenes poseen mayor capacidad de formación de nuevos brotes adventicios. Gogoi *et al.* (2014) trabajaron con el cultivar Bhut Jalakia (*Capsicum chinense*) y lograron obtener 4.0 brotes utilizando cotiledones como explantes, con  $7.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $3.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN, mientras que con yemas apicales obtuvieron 5.0 brotes con  $3.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP y  $13.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN. Haque & Ghosh (2018) elaboraron un protocolo para la multiplicación *in vitro* de 10 materiales de chiles (*Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens*) provenientes de la India y México, encontrando que la formación de brotes múltiples depende en gran medida del genotipo. Beltrán-Burboa *et al.* (2020) cultivaron segmentos nodales de chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP en combinación con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA, en donde tuvieron las mejores respuestas con una media de 6.6 brotes.

### Etapa III (enraizamiento)

Sripichitt *et al.* (1987) lograron enraizar brotes de pimiento (*Capsicum annuum*) con la adición de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA o ANA, indicando que es posible regenerar plántulas completas después de 7 semanas de cultivo *in vitro*. Ebida & Hu (1993) lograron enraizar un 70% de brotes adventicios de pimiento (*Capsicum annuum*) con la adición de  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA o  $0.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA después de un mes de cultivo. Christopher & Rajam (1994) utilizaron  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIA y observaron que la capacidad de enraizamiento de *Capsicum praetermissum* y *Capsicum annuum* se ve fuertemente afectada por la presencia de citocininas utilizadas durante la multiplicación, ya solo entre el 40 y 50% de los brotes obtenidos durante la multiplicación con BAP o KIN lograron enraizar, mientras que los tratados con TIBA enraizaron hasta un 100%. Con el cultivar Bhut Jalakia (*Capsicum chinense*), Gogoi *et al.* (2014) lograron enraizar brotes derivados de cotiledones con  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA obteniendo hasta 8.67 raíces por explante, mientras que en aquellos derivados de yemas apicales fue de 16.67 con  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB. Barrales-López, Robledo-Paz, Trejo, Espitia-Rangel, & Rodríguez-De La O (2015) estudiaron diversas variables durante el enraizamiento de chile habanero (*Capsicum chinense*) y encontraron que las plántulas se desarrollaron

mejor bajo una intensidad luminosa de  $28 \mu\text{M}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Haque & Ghosh (2018) observaron que el uso de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  AIB y  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ANA provocó un efecto estimulante durante el enraizamiento de 10 materiales de chiles (*Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens*), además, la adición de  $0.21 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de espermidina al medio de cultivo mejoró sustancialmente la capacidad de formación de nuevas raíces, obteniendo así mejores resultados. Beltrán-Burboa *et al.* (2020) obtuvieron 80% de enraizamiento y un promedio de 4.82 raíces en brotes de chile (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) con el uso de  $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB.

### Etapa IV (aclimatización)

Ebida & Hu (1993) aclimatizaron exitosamente plántulas de pimiento (*Capsicum annuum*) en invernadero utilizando contenedores plásticos con sustrato comercial para vegetales. Christopher & Rajam (1994) utilizaron como sustrato una mezcla de suelo y vermiculita (3:1) durante la aclimatización de *Capsicum praetermissum* y *Capsicum annuum*, y cuatro semanas después, las transfirieron directamente al suelo, y obtuvieron una sobrevivencia del 86% en donde todas las plantas fueron completamente normales. Gogoi *et al.* (2014) consiguieron un 40% de sobrevivencia al aclimatizar plántulas del cultivar Bhut Jalakia (*Capsicum chinense*) en contenedores plásticos con un sustrato conformado por arena, suelo y estiércol de ganado bovino (1:1:1). Haque & Ghosh (2018) aclimatizaron 10 cultivares de chiles (*Capsicum annuum*, *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens*) en macetas con una mezcla comercial de sustrato hortícola y observaron que la capacidad de sobrevivencia de las plántulas se encuentra influenciada por el genotipo, en donde varió desde 40.0 hasta 86.7%.

## VARIACIÓN SOMACLONAL

Los avances realizados con las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales han hecho posible la regeneración de varias especies vegetales mediante métodos de micropropagación y actualmente existen varios protocolos para cultivos de importancia económica (Krishna *et al.*, 2016). La propagación y preservación de clones de genotipos élite, seleccionados por sus características sobresalientes, requieren de un alto grado de uniformidad genética (Krishna *et al.*, 2016). Sin embargo, esto puede generar variabilidad genética, es decir, variación somaclonal como resultado de mutaciones o cambios epigenéticos, aunque, por el contrario, es una fuente de nuevas variantes con características agronómicas deseables (Bairu, Aremu, & van Staden, 2011).

### Identificación de variantes somaclonales

Hossain, Konisho, Minami, & Nemoto (2003) realizaron una caracterización morfológica y molecular (RAPD) para observar la presencia de variantes de plantas de *C. annuum* cv. Takanotsume y Shishitou derivadas del cultivo *in vitro*, y encontraron cambios en el habido de crecimiento, color de los tallos, hojas y frutos, así como también en los patrones de pigmentación por antocianinas en los frutos inmaduros. También se ha observado que la variación somaclonal es muy dependiente del genotipo (Anu, Babu, & Peter, 2004) y ocurre con mayor frecuencia en callos embriogénicos (debido al uso de 2,4-D) y menor en sistemas de regeneración por organogénesis directa (Bello-Bello *et al.*, 2014).

### **Aprovechamiento de las variantes**

Se ha reportado la aparición de características agronómicas superiores como floración precoz en incremento en los rendimientos de *C. annuum* cv. Takanotsume y Shishitou por efecto del cultivo de tejidos vegetales (Hossain *et al.*, 2003), lo cual puede aprovecharse eficientemente en programas de mejoramiento genético. De manera similar, Al-Ajeel, Al-Hattab, & El-Kaaby (2016) detectaron variantes de *C. annuum* con mejores características agronómicas, y mayor contenido de vitamina C.

### **MUTAGÉNESIS**

El primer paso durante el fitomejoramiento es la identificación de genotipos adecuados que contengan genes de interés entre los materiales existentes. En la naturaleza, las variaciones ocurren principalmente por producto de mutaciones, y, sin este fenómeno, la creación de nuevos materiales sería imposible (Oladosu *et al.*, 2016). A pesar de que las mutaciones ocurren espontáneamente, la frecuencia con que esto sucede es muy baja como para ser aprovechada en programas de mejoramiento genético. No obstante, también es posible inducir estos cambios en el ADN mediante métodos físicos y químicos (Parry *et al.*, 2009). El agente mutagénico causa rupturas en el ADN genómico y durante el proceso de reparación, se inducen aleatoriamente nuevas mutaciones, las cuales son heredables. Estos cambios también pueden ocurrir en los genomas de los organelos presentes en el citoplasma (cloroplastos y mitocondrias), lo que da como resultado en variaciones genéticas que se pueden aprovechar en programas de mejoramiento genético mediante la selección de características útiles, por ejemplo, forma y color de las flores, resistencia a plagas y enfermedades, floración precoz, entre otras (Chaudhary, Deshmukh, & Sonah, 2019; Jain, 2010).

#### **Métodos físicos**

En las últimas 8 décadas, los mutágenos físicos, principalmente la radiación ionizante, se han utilizado ampliamente para inducir aberraciones heredables y más del 70% de las variedades mutantes han sido desarrolladas utilizando estos agentes (Oladosu *et al.*, 2016). La radiación se define como una forma de energía que se mueve a través de una distancia en forma de ondas o partículas, y contienen (relativamente) altos niveles de energía (en el espectro electromagnético), capaces de mover electrones de la órbita nuclear de los átomos, convirtiéndolos de este modo en iones. Estos agentes ionizantes del espectro electromagnético incluyen los rayos X, gamma y cósmicos. Los rayos X fueron los primeros en ser utilizados para inducir mutaciones y desde entonces, varias partículas subatómicas (neutrones, protones, partículas alfa y beta) han sido generadas utilizando reactores nucleares (Oladosu *et al.*, 2016).

Uno de los primeros reportes sobre el uso de mutágenos físicos en chiles fue el de Katiyar (1978), quien utilizó rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) para irradiar semillas de *C. annuum* a 5, 10, 15 y 20 kR, con lo que observó anomalías en los cromosomas durante la meiosis, incluyendo aglutinamiento, asociación alterada, rompimiento, segregación desigual y microesporas deformes y sus frecuencias fueron dependientes de la dosis empleada. Rao & Lakshmi (1980) irradiaron con rayos gamma semillas de dos cultivares de *C. annuum* (el CA 960 de color rojo y el CA 1968 de color amarillo) en dosis de 10 a 40 kR y llegaron a conclusiones similares. Joshi & Khalatkar (1981) utilizaron  $^{60}\text{Co}$  como fuente de rayos gamma para tratar semillas de *C. annuum* en dosis de 2 a 20 kR, en donde observaron que a dosis bajas incrementaron el tamaño y número de semillas por fruto, mientras que con las dosis más altas estas variables se redujeron. Bhargava & Umalkar (1989) irradiaron semillas de *C. annuum* "Ankur-1" con rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ , 5-20 kR) y observaron que, a mayor dosis de radiación, menor es el tamaño de frutos, el número de ramas y la altura de las plantas. Sri Devi & Mullainathan (2011) indujeron mutaciones en *C. annuum* "K1" con el uso de rayos gamma ( $^{60}\text{Co}$ , 10-50 kR), con lo que obtuvieron distintos mutantes en cuanto a hábitos de crecimiento, deficiencias en la síntesis de clorofila en las hojas y androesterilidad.

#### **Métodos químicos**

Se considera generalmente que los mutágenos químicos provocan un efecto más suave en las plantas. Una ventaja de estos es que se pueden utilizar sin equipos o instalaciones complejas. El procedimiento comúnmente consiste en sumergir el material vegetal en una solución con el

ingrediente activo. No obstante, los mutágenos químicos normalmente son cancerígenos, por consiguiente, es necesario tomar precauciones y utilizar equipo de protección adecuado para evitar daños en la salud. A pesar de que existen muchos compuestos químicos que inducen mutaciones, solo un pequeño número de estos se han probado en plantas, entre los que figuran los agentes alquilantes como etil metano sulfonato (EMS), 1-metil-1-nitrosourea y 1-etil-1-nitrosourea (Oladosu *et al.*, 2016).

Bhargava & Umalkar (1989) utilizaron EMS (0.05-0.15%) y azida de sodio (AS) (0.005-0.015%) para tratar semillas de *C. annuum* “Ankur-1” y observaron que, a mayor dosis de los agentes químicos, menor es el tamaño de frutos, el número de ramas y la altura de las plantas. Paran, Borovsky, Nahon, & Cohen (2007) trataron semillas de *C. annuum* “Maor” con EMS (0.2%), con lo que consiguieron distintos mutantes en cuanto al tipo de ramificación y arquitectura de la planta. Sri Devi & Mullainathan (2011) indujeron mutaciones en *C. annuum* “K1” con el uso de EMS (10-50 mM), con lo que obtuvieron distintos mutantes en cuanto a hábitos de crecimientos, deficiencias en la síntesis de clorofila en las hojas y androesterilidad.

## ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Las plantas cultivadas evolucionan en forma natural y a través de la intervención humana, y se basa principalmente en la existencia de diversidad genética en las poblaciones (Bhandari *et al.*, 2017; H. Zhang, Mittal, Leamy, Barazani, & Song, 2017). La diversidad genética se puede definir como el grado de diferenciación dentro o entre especies. La existencia de diferencias intra e interespecíficas es la base de todos los programas de mejoramiento genético. En este contexto, el conocimiento sobre los aspectos de la diversidad genética, como aquellos factores que la afectan, los diferentes métodos para su análisis y medición, así como también los programas informáticos utilizados para estos fines se vuelven imperativos en orden de utilizarlos prudentemente (Bhandari *et al.*, 2017).

### Métodos de análisis de la diversidad genética

Un análisis de diversidad genética se puede realizar mediante caracterización morfológica, citológica, bioquímica y molecular. Los marcadores morfológicos fueron los primeros en utilizarse, y hoy en día siguen vigentes. Después se utilizaron las diferencias citológicas y bioquímicas para evaluar estas diferencias entre genotipos. Con el surgimiento de las herramientas genómicas, los marcadores moleculares se convirtieron en el método preferido para estos fines (Bhandari *et al.*, 2017).

### Marcadores moleculares

Esto involucra el estudio de la variación entre distintos genotipos a nivel de ADN y ARN. Existe distintos tipos de marcadores moleculares, los cuales tienen distintas características, lo que los hace adecuados para diferentes propósitos (Bhandari *et al.*, 2017).

### RAPD

Paran, Aftergoot, & Shifriss (1998) estudiaron las relaciones genéticas en 34 cultivares de diferentes tipos de chiles (*C. annuum*) con el uso de 21 iniciadores RAPD, con lo que separaron distintos grupos de acuerdo con el tamaño de los frutos y su nivel de pungencia, y encontraron un polimorfismo de 22% (1.6 productos polimórficos por iniciador). Rodríguez, Berke, Engle, & Nienhuis (1999) evaluaron 134 accesiones de seis especies de chiles (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. chacoense* y *C. pubescens*) con 25 iniciadores RAPD, con lo que detectaron 124 bandas polimórficas y lograron separar las accesiones de acuerdo con su especie. Baral & Bosland (2002) estudiaron 111 accesiones de chiles (*C. annuum* var. *annuum*) provenientes de Nepal y 28 de México y Estados Unidos de América con el uso de 18 iniciadores RAPD, con lo que obtuvieron 146 bandas polimórficas entre todas las accesiones, agrupando a las accesiones según su origen geográfico. Rabelo da Costa *et al.* (2006) cuantificaron la diversidad genética entre 70 materiales de *Capsicum* originarios de Brasil con 8 iniciadores RAPD, distinguiendo mediante esta técnica identificar a 53 individuos (16 de *C. annuum*, 7 de *C. frutescens*, 14 de *C. baccatum* y 5 de *C. chinense*). Bhadrageoudar & Patil (2011) caracterizaron 45 accesiones de *C. annuum* del estado de Karnataka, India, con el uso de 25 iniciadores RAPD, con lo que consiguieron un promedio de 3.9 bandas polimórficas y 2.25 monomórficas, concluyendo que existe un nivel alto de diversidad genética entre los materiales estudiados.

### SSR

Ibarra-Torres, Valadez-Moctezuma, Pérez-Grajales, Rodríguez-Campos, & Jaramillo-Flores (2015) utilizaron 24 marcadores SSR para diferenciar entre genotipos de *C. annuum* y *C. pubescens*, así como también entre variedades de tipo jalapeño y serrano de *C. annuum*, con lo que lograron diferenciar adecuadamente entre especies, no obstante, entre variedades de *C. annuum* esto no fue posible. Con el uso de 24 pares de iniciadores SSR, Carvalho *et al.* (2017) evaluaron la diversidad genética entre 103 accesiones de *C. frutescens* originarias de Brasil, y otras 20 de distintas especies de *Capsicum* como referencia, encontrando un polimorfismo desde 0.36 hasta 0.75, con un promedio de 0.57. Sharmin, Hoque, Haque, & Khatun (2018) caracterizaron 20 genotipos locales de chiles (*Capsicum*

spp.) de Bangladesh con 11 iniciadores SSR, encontrando un total de 10 alelos para cinco loci polimórficos y la diversidad genética varió desde 0.333 hasta 1.000 con un promedio de 0.567.

### ISSR

Ibarra-Torres *et al.* (2015) utilizaron ocho iniciadores ISSR para analizar genotipos de *C. annuum* y *C. pubescens*, así como también entre variedades de tipo jalapeño y serrano de *C. annuum*, con lo que lograron determinar diferencias moleculares entre las dos especies y las dos variedades de *C. annuum*. Alemu, Mullualem, & Adugna (2017) evaluaron la diversidad genética de 73 accesiones de chiles (*Capsicum* spp.) utilizando cinco iniciadores ISSR, con lo que obtuvieron 37 bandas en total, de las cuales 35 fueron polimórficas (94.6%). Tsaballa *et al.* (2015) trabajaron con 30 accesiones criollas de *C. annuum* originarias de Grecia y evaluaron su diversidad genética utilizando 6 iniciadores ISSR, con lo que lograron separar los materiales en 8 grupos utilizando 53 bandas detectadas, con un porcentaje de polimorfismo del 83.6%. Thuy, Ky, Ba, Hien, & Yeap (2016) utilizaron 15 iniciadores ISSR para estudiar la diversidad genética de 16 variedades de chiles utilizadas como portainjertos (*Capsicum* spp.) originarias de Vietnam, con lo que obtuvieron un total de 136 bandas, 102 de las cuales fueron polimórficas, diferenciando claramente a los materiales entre especies y variedades. Por su parte, López-Espinosa *et al.* (2018) estudiaron la diversidad genética de 60 accesiones criollas de Chile habanero (*C. chinense*) de la península de Yucatán y Tabasco mediante el uso de 3 iniciadores ISSR, detectando un total de 32 bandas, de las cuales el 98% fueron polimórficas, concluyendo que la diversidad genética de las poblaciones es alta, en donde el 95.5% de la variación observada se encontró dentro de estas y solo el 4.5% entre ellas. Brillhante *et al.* (2021) utilizaron 69 accesiones de cuatro especies de chiles (*C. chinense*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* y *C. annuum*) colectadas en Brasil para evaluar su diversidad mediante el uso de 17 iniciadores ISSR, con lo que obtuvieron un total de 150 fragmentos amplificados, de los cuales 134 fueron polimórficos (90%), siendo *C. chinense* y *C. baccatum* las especies con mayor polimorfismo (88.8%), seguido de *C. frutescens* (56.6%) y *C. annuum* (26.9%).

### AFLP

Paran *et al.* (1998) estudiaron las relaciones genéticas en 34 cultivares de chiles (*C. annuum*) con 10 combinaciones de iniciadores AFLP, con lo que observaron un porcentaje de polimorfismo del 13% y un promedio de 6.5 marcadores polimórficos. Toquica, Rodríguez, Martínez, Duque, & Tohme (2003) evaluaron 71 accesiones de 4 especies de

chiles (*C. chinense*, *C. baccatum*, *C. annuum* y *C. frutescens*) procedentes de la región amazónica de Colombia con el uso de 4 combinaciones de marcadores AFLP, con lo que consiguieron separar las accesiones en 4 grupos, observando que la variación genética total fue relativamente baja, con un índice de diversidad de 0.331. Guzmán, Ayala, Azurdía, Duque, & De Vicente (2005) trabajaron con 74 accesiones de chiles pertenecientes a 4 especies (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*) (34 accesiones de traspatio y 40 del banco de germoplasma de la Universidad de San Carlos de Guatemala) con el uso de tres combinaciones de iniciadores AFLP, y observaron un total de 68 bandas polimórficas, concluyendo que los huertos de traspatio son una alternativa viable de conservación de recursos fitogenéticos. Baba *et al.* (2016) estudiaron la diversidad genética entre 71 accesiones de *C. chinense* originarias de Brasil con el uso de tres combinaciones de marcadores AFLP, encontrando un total de 302 bandas polimórficas.

### RFLP

Lefebvre, Palloix, & Rives (1993) evaluaron la diversidad genética entre 13 accesiones de *C. annuum* (incluyendo materiales criollos de *C. annuum* var. *annuum* y cultivares de pimiento) y una de *C. baccatum* var. *pendulum* (control) con el uso de marcadores RFLP (ADN genómico digerido con 10 enzimas de restricción), con lo que observaron mayor grado de diferenciación entre *C. annuum* var. *annuum* y *C. baccatum* var. *pendulum* (diferenciación interespecífica).

### Métodos filogenéticos

Antes del advenimiento de las tecnologías de secuenciación de ADN, los árboles filogenéticos se usaban casi exclusivamente para describir las relaciones entre especies en sistemática y taxonomía. Hoy en día, las filogenias se utilizan en casi todas las ramas de la biología (Yang & Rannala, 2012). Más recientemente, la filogenética molecular se ha convertido en una herramienta indispensable para las comparaciones de genomas. En este contexto, se utiliza para clasificar secuencias metagenómicas, identificar genes, elementos reguladores y ARN no codificantes en genomas recién secuenciados, interpretar genomas individuales modernos y antiguos, y reconstruir genomas ancestrales (Yang & Rannala, 2012).

En el género *Capsicum*, este enfoque se ha utilizado para estudiar su monofilia, delimitar especies dentro del género y para el establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies (Walsh & Hoot, 2001). Por ejemplo, Sun *et al.* (2014) evaluaron la diversidad genética entre 26 variedades de *C. annuum* y cuatro de *C. eximium* mediante el uso de la

región *ITS1-5.8S-ITS2*, con lo que observaron que cada especie formó un grupo independiente por sí misma. Por otra parte, Carrizo-García *et al.* (2016) realizaron un estudio más profundo sobre la filogenia de este género, utilizando un total de 34 especies (de alrededor de 37) utilizando dos marcadores del genoma cloroplástico (*matK* y *psb-trnH*) y uno nuclear (*waxy*), corroborando el origen monofilético, y la separación en 11 clados bien definidos.

## TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

La transformación genética ha proporcionado un enfoque alternativo para los programas de fitomejoramiento de los chiles. La principal ventaja de la utilización de la transformación genética es que ofrece de una alternativa para superar las barreras genéticas intra o interespecíficas y permite la incorporación de genes útiles o nuevas características en el genoma de los chiles (Srivastava & Mangal, 2019). La naturaleza recalcitrante del género *Capsicum* también afecta a los sistemas de transformación genética, por lo que la aplicación de las tecnologías del ADN recombinante se torna más difícil en estas especies (Kothari *et al.*, 2010). En el caso de los chiles, la transformación genética mediada por *Agrobacterium* es ciertamente una herramienta importante que facilita el mejoramiento genético con el fin de obtener variedades resistentes contra diversos factores que limitan la producción. No obstante, los avances en esta área se han visto limitados debido a la baja eficiencia de regeneración *in vitro* (Kothari *et al.*, 2010).

### Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

El primer estudio realizado sobre modificación genética de chile utilizando *Agrobacterium* fue realizado por Liu, Parrott, Hildebrand, Collins, & Williams (1990), quienes transformaron cotiledones e hipocótilos de pimiento (*Capsicum annuum*) y observaron actividad del gen reportero *GUS*, sin embargo, no lograron regenerar plantas completas. Manoharan, Vidya, & Sita (1998) utilizaron cotiledones durante la transformación genética de chile Pusa Jwala (*Capsicum annuum*) y la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pBI121, el cual porta dentro del T-DNA los genes *GUS* y *NPTII*, obteniendo varias líneas transgénicas independientes que fueron aclimatizadas en invernadero. Li, Zhao, Xie, Zhang, & Luo (2003) utilizaron la cepa LBA4404 con el plásmido pBI121 y transformaron cotiledones de *Capsicum annuum*, en donde obtuvieron una eficiencia de transformación del 40.8%. Kumar, Sharma, Chattopadhyay, & Chakraborty (2012) introdujeron el gen  $\beta$ C1 del virus del enrollamiento de la hoja del chile en el genoma del pimiento rojo (*Capsicum annuum*) con el uso de la cepa EHA 105 de *Agrobacterium* y el plásmido pBinAR $\beta$ C1, indicando que todas las plantas

transgénicas que regeneraron fueron fenotípicamente igual a las no transgénicas cuando se cultivaron en suelo. Maligeppagol *et al.* (2016) trabajaron con el factor de transcripción *Dreb1A* de *Arabidopsis thaliana*, le insertaron el promotor *rd29A* que es inducible por sequía, y lo fusionaron al plásmido pCAMBIA 2301 para transformar dos cultivares de chile (*Capsicum annuum*) con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, en donde obtuvieron líneas transgénicas que mostraron una mayor tolerancia al estrés hídrico. Bulle, Yarra, & Abbagani (2016) transformaron cotiledones de chile "G4" (*Capsicum annuum*) con el gen *TaNHX2* de trigo, el cual insertaron en el plásmido pBin438 y la cepa LBA4404 de *Agrobacterium*, obteniendo plantas tolerantes a estrés salino. Shivakumara *et al.* (2017) utilizaron el gen *PDH45* de chícharo para transformar plántulas de chile (*Capsicum annuum*), el cual fue insertado en el plásmido pBI121 y colocado en la cepa EHA 105 de *Agrobacterium*, con lo que obtuvieron plantas tolerantes a diversos tipos de estrés abiótico, como sequía, salinidad, y estrés oxidativo. Ortega *et al.* (2018) desarrollaron plantas transgénicas de chile (*Capsicum annuum*) resistentes a glifosato bajo un enfoque intergénico, en donde utilizaron el mismo gen (*CaEPSPS*) mutado de la enzima EPSPS de chile utilizando su propio promotor y el 35S del virus del mosaico de la coliflor, con lo que obtuvieron plantas moderadamente resistentes al herbicida. Mahto, Sharma, Rajam, Reddy, & Dhar-Ray (2018) desarrollaron un protocolo para la transformación genética de dos cultivares de chile (*Capsicum annuum*) con el uso de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido pCAMBIA2301, con lo que obtuvieron varias líneas transgénicas independientes y una eficiencia de transformación del 30%.

### Transformación genética por biobalística

Chee, Lycett, Khoo, & Chin (2017) insertaron el gen de vainillina sintasa (*VpVAN*) mediante bombardeo de partículas en hipocótilos de chile "Hot Lava" (*Capsicum frutescens*), y observaron que la expresión heteróloga de este gen en los callos transformados dio como resultado un incremento en los niveles de vainillina y vainillina glucósido de casi 200 veces, con respecto a los tejidos no transformados.

## BIOINFORMÁTICA

Las ciencias ómicas y la bioinformática son herramientas esenciales para el entendimiento de los sistemas moleculares que controlan el funcionamiento de las plantas (Mochida & Shinozaki, 2011; Rhee, Dickerson, & Xu, 2006). Este conocimiento es fundamental para permitir el aprovechamiento de los recursos biológicos mediante el desarrollo de nuevos cultivares con características mejoradas

a bajos costos tanto económicos como ambientales (Vassilev, Leunissen, Atanassov, Nenov, & Dimov, 2005). Hoy en día se dispone de la secuencia completa del genoma del chile criollo de Morelos (*C. annuum* cv. CM334) (Kim *et al.*, 2014), del cultivar Zunla-1 (*C. annuum* L.) y su progenitor silvestre, el chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*) (Qin *et al.*, 2014). Esta información representa grandes avances con respecto al conocimiento del chile, lo cual permitirá a mediano plazo entender los mecanismos moleculares que modulan la forma y tamaño del fruto, la arquitectura de la planta, el contenido de capsaicina, así como también los factores que intervienen durante el ataque de plagas y enfermedades, con lo que será posible desarrollar mejores variedades en un menor tiempo utilizando las nuevas herramientas (Ahn *et al.*, 2018).

### **Análisis de transcriptomas**

Antes de la publicación del primer genoma de chile, Góngora-Castillo *et al.* (2012) publicaron un transcriptoma de dos cultivares de *C. annuum* (Serrano Tampiqueño 74 y Sonora Anaheim), el cual incluye librerías de ADNc derivadas de diferentes órganos (raíces, tallos, hojas, flores y frutos) y distintas condiciones de estrés. Las secuencias ensambladas constan de un total de 32,314 contigs y 59,991 singletons. Esta base integra información comprensiva incluyendo anotaciones funcionales, ontología de genes y procesos metabólicos.

Lee *et al.* (2020) realizaron un estudio del transcriptoma de *C. annuum* cv. Bukang bajo el efecto de cuatro fitohormonas principales (ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y ácido abscísico) mediante secuenciación de ARN de alto rendimiento, con lo que generaron un total de 78 muestras de tres réplicas y seis tiempos, constituyendo un total de 187.8 Gb de datos transcriptómicos. Los datos de este transcriptoma proveen de información valiosa para el entendimiento de las relaciones y redes moleculares que regulan la expresión de genes relacionados con las fitohormonas que se encuentran involucrados en el desarrollo vegetal y la adaptación al estrés ambiental.

### **Identificación de genes**

Tang *et al.* (2019) realizaron una caracterización sobre los genes mitocondriales responsables de la terminación de la transcripción (*mTERFs*) en *C. annuum*, con lo que encontraron 35 genes (*CaMERFs*), divididos en ocho grupos principales. El análisis de los promotores de estos genes reveló la presencia de muchos elementos *cis* relacionados con la regulación de la respiración celular, fotosíntesis, regulación de fitohormonas y respuestas a estrés.

Arce-Rodríguez, Martínez, & Ochoa-Alejo (2021) realizaron una identificación de la familia génica de factores de transcripción *MYB* en *C. annuum*, encontrando un total de 235 proteínas no redundantes. La comparación de secuencias de *CaMYBs* con otras especies reveló que los genes son conservados, así como algunos potencialmente especializados. Los perfiles de expresión en tejidos mostraron que se expresan diferencialmente, sugiriendo que son divergentemente funcionales. Además, existen algunos candidatos que podrían estar participando en la regulación de la biosíntesis de fenilpropanoides, lignina, capsaicinoides, carotenoides y vitamina C, lo que provee de nuevas pistas sobre el rol de los estos factores de transcripción en el metabolismo secundario.

### **CASO DE ESTUDIO: RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* Leonian**

El oomiceto filamentoso *Phytophthora capsici* es un patógeno vegetal altamente dinámico y destructivo, el cual ataca a cucurbitáceas (pepino, melón, calabaza), tomate, berenjena y chiles (Lamour, Stam, Jupe, & Huitema, 2012). En este último los problemas pueden presentarse en todos los estados de desarrollo y tejidos, en donde causa varios síntomas, incluyendo la pudrición de raíces, corona y frutos, marchitamiento, daños a los tallos y damping-off en estado de plántula. Este patógeno presente en el suelo causa una enfermedad multicíclica que vive en tejidos vivos (biotrófico) y muertos (necrotrófico), causando de este modo un problema persistente especialmente en aquellas regiones donde se cultivan chiles de manera repetitiva (Kim *et al.*, 2008), siendo uno de los principales problemas fitosanitarios de este cultivo en todo el mundo, lo que resulta a menudo en pérdidas totales (Barchenger, Lamour, & Bosland, 2018).

La incidencia y severidad de esta enfermedad se ha incrementado significativamente en las últimas décadas y el uso indiscriminado de productos de síntesis química para su manejo no constituye una opción sustentable debido a su alto costo de aplicación en campo, daños potenciales al ambiente y al desarrollo de resistencia (Pang *et al.*, 2013; Parra & Ristaino, 2001; Wang *et al.*, 2020), por lo que es necesario el uso de otras alternativas viables a largo plazo. Entre estas, la resistencia genética es una opción sustentable para enfrentar el problema fitosanitario y a la vez reducir el uso de fungicidas y la degradación del ambiente, por lo que es necesaria la identificación de nuevas fuentes de resistencia, sobre todo en los materiales criollos, con el fin de ayudar al desarrollo de nuevos cultivares (Morán-Bañuelos, Aguilar-Rincón, Corona-Torres, & Zavaleta-Mejía, 2010; Retes-Manjarrez *et al.*, 2020).

### **Fuentes de resistencia**

Desde los años 60 se han reportado algunos materiales resistentes a este patógeno, entre ellos el AC2258, PI201232 y PI201234 (*C. annuum*) originarios de Centro América (Kimble & Grogan, 1960), y el Criollo de Morelos 334 (CM334) (*C. annuum*) de México (Guerrero-Moreno & Laborde, 1980). Entre estas variedades, el CM334 ha sido el más estudiado debido a que es el que tiene el mayor nivel de resistencia (Bonnet *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2014; Quirin *et al.*, 2005). Recientemente, Retes-Manjarrez *et al.* (2020) encontraron seis materiales criollos (cuatro accesiones *C. annuum* de tipo Piquín y Jalapeño y dos de *C. pubescens*) altamente resistentes en poblaciones nativas de 14 estados de México, con niveles similares a CM334. Estas fuentes de resistencia podrían aportar nuevas fuentes de variación con posibilidad de utilizarse para el desarrollo de nuevos cultivares paralelamente con mejores rendimientos y calidad de frutos.

### Mecanismos de resistencia

La expresión de la resistencia a *P. capsici* en chiles se ve influenciada por muchos factores ambientales como el cultivar y la edad, dosis del inóculo, temperatura, humedad del suelo, cepa del patógeno, método de inoculación y la patogenicidad del aislado. Debido a estos factores, *P. capsici* es un patógeno complicado de controlar, y el desarrollo de cultivares mediante métodos convencionales no ha sido exitoso (Kim *et al.*, 2008).

Diversos estudios han reportado las bases genéticas de la resistencia a *P. capsici* en chiles. Estudios previos sobre la resistencia de CM334 sugirieron varios modelos, como la participación un gen dominante (Walker & Bosland, 1999), dos genes recesivos situados en cromosomas distintos (Guerrero-Moreno & Laborde, 1980), dos dominantes (Reifschneider, Boiteux, Vecchia, Poulos, & Kuroda, 1992), y hasta tres genes dominantes de CM334 (Ortega, Español, & Zueco, 1991). Después se concluyó que la herencia poligénica junto con mecanismos aditivos o epistáticos controlan este fenómeno (Bartual, Carbonell, Marsal, Tello, & Campos, 1991; Lefebvre & Palloix, 1996).

Los estudios explicativos sobre la acción particular de los genes de resistencia iniciaron con los experimentos de Egea, Pérez, & Candela (1996), quienes detectaron la presencia de capsidiol (un tipo de fitoalexina derivada de la ruta de los terpenoides) en cultivares susceptibles y resistentes, indicando que el grado de resistencia se debe principalmente a la capacidad de movilización de este metabolito hacia las zonas necróticas causadas por el patógeno. Más tarde, Silvar, Merino, & Díaz (2008) demostraron que existe un incremento en los niveles de expresión de los genes *CaBPR1* (una clase de proteínas relacionadas con la patogénesis),

*CaBGLU* (una forma básica de  $\beta$ -1,3-glucanasa, enzimas degradadoras de la pared celular de los hongos), *CaPOI* (una peroxidasa) y *CaSCI* (sesquiterpeno ciclasa, enzima participante en la biosíntesis de capsidiol), correlacionados con la capacidad de respuesta ante la invasión. Otros genes detectados incluyen *CaChi2* (con actividad quitinasa), *CaPR-4*, *CaPR-10* (Sang, Kim, & Kim, 2010), *PAL* (fenilalanina amonio liasa) (Zhang *et al.*, 2013) y *CaRGA2* (Zhang *et al.*, 2013).

En un estudio transcriptómico, Wang *et al.* (2015) analizaron la expresión diferencial del genotipo resistente PI201234 bajo el ataque de *P. capsici*, con lo que observaron un total de 1220 genes, de los cuales 480 aumentaron sus niveles de expresión y 740 disminuyeron, con 211 posibles candidatos involucrados en las respuestas de defensa. El análisis posterior de 12 de estos genes confirmó que siete se encuentran involucrados en la modificación de la pared celular, biosíntesis de fitoalexinas, desarrollo de síntomas, y mecanismos de señalización de fitohormonas.

### Alternativas biotecnológicas

Los recursos moleculares para el estudio de *P. capsici* han ido en aumento, lo que ha logrado que hoy en día se disponga de dos genomas de referencia (Lamour *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2021). Del mismo modo, la disponibilidad de los distintos genomas y transcriptomas de Chile que se tienen provee de herramientas para el análisis de genes y grupos de genes que se han reportado con funciones durante la invasión del patógeno a través de las distintas herramientas biotecnológicas. Por ejemplo, una alternativa viable es el análisis, identificación y caracterización de las proteínas relacionadas con la patogénesis en plantas (PRP).

Las PRP son un grupo de moléculas diversas que son inducidas por fitopatógenos y otras moléculas señalizadoras relacionadas con los sistemas de defensa. Son componentes claves del sistema inmune innato de los vegetales, especialmente de la resistencia sistémica adquirida, y se utilizan ampliamente como marcadores moleculares de los mecanismos de señalización durante los procesos de defensa (Ali *et al.*, 2018). Las PRP se agrupan de acuerdo con su función, tales como las  $\beta$ -1,3-glucanasas, peroxidasas, defensinas, tioninas y quitinasas.

Las quitinasas son proteínas que degradan la quitina, el segundo polisacárido más abundante del planeta después de la celulosa, el cual forma parte de la pared celular en la mayoría de los hongos. Estas proteínas son de suma importancia puesto que pueden mejorar la resistencia contra factores bióticos y abióticos. En Chile se han detectado al menos 16 genes de este tipo, y todos tienden a aumentar sus

niveles de expresión ante el ataque de *P. capsici* (Ali *et al.*, 2018). De este grupo, uno de los miembros más activos es *CaChiIV1*, puesto que se ha observado que su silenciamiento provoca un incremento en la susceptibilidad de las plantas al ataque de *P. capsici* debido a cambios en la expresión de genes relacionados con la defensa (Ali *et al.*, 2019), mientras que la sobreexpresión de *CaChiVI2* en *Arabidopsis* genera mayor resistencia a estrés biótico (ataque de *P. capsici*) y abiótico (temperatura y sequía) mediante la reducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la modulación de la expresión de genes relacionados con la defensa (Ali *et al.*, 2020), por lo que su uso en chiles mediante la ingeniería genética bajo un enfoque cisgénico podría ayudar a la generación de cultivares con un rango de resistencia a diversos tipos de factores adversos y de este modo reducir el uso de fungicidas con el fin de obtener una producción de alimentos inocua y libre de sustancias dañinas tanto para el ambiente como para la salud humana.

## **FITOQUÍMICA**

El género *Capsicum*, al ser ampliamente diverso, su composición química también presenta una gran variabilidad. Sus principales aplicaciones son en la industria alimentaria y farmacológica, ya que sus frutos presentan una composición química rica en capsaicinoides, carotenoides, flavonoides y compuestos volátiles a los que se les atribuye la habilidad de dar sabor a las comidas, producir aromas y actuar como antioxidantes (Antonio, Wiedemann, & Veiga Junior, 2018).

### **Capsaicinoides**

Los capsaicinoides son las moléculas responsables de la sensación pungente que ocurre cuando los mamíferos muerden un fruto de *Capsicum* (Aza-González, Núñez-Palenius, & Ochoa-Alejo, 2011; Lu, Ho, & Huang, 2017). En total se han reportado más de 20 de estos compuestos y la capsaicina es el principal componente activo, seguido de la dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y la homocapsaicina, principalmente (Luo, Peng, & Li, 2011). Solo los chiles sintetizan capsaicinoides en la naturaleza y se ha especulado que tienen una función protectora contra patógenos (Aza-González *et al.*, 2011).

### **Carotenoides**

Los carotenoides son un grupo de alrededor de 750 compuestos de 40 carbonos que se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas y son conocidos por sus propiedades cromogénicas, que atribuyen colores naranja, amarillo y rojo. Estos pigmentos pueden ser sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, y en algunos no

fotosintéticos, en donde cumplen papeles muy importantes durante la fotosíntesis, actuando como fotoprotectores y estabilizando radicales libres (Antonio *et al.*, 2018; Maoka, 2020).

Los chiles se consideran como verduras ricas en carotenoides (Villa-Rivera & Ochoa-Alejo, 2020). La variedad de colores se debe en parte a la presencia de carotenoides, principalmente oxigenados, cuyo perfil puede cambiar en función del estado de madurez, de la especie y del cultivar (Antonio *et al.*, 2018). Al principio, los frutos son de color verde, los cuales se encuentran constituidos principalmente de cloroplastos que contienen aproximadamente un 68% de clorofilas, mientras que los carotenoides representan un 32%, el nivel más bajo. En esta etapa, se pueden encontrar carotenoides como luteína, violaxantina, neoxantina y  $\beta$ -caroteno (Hassan, Yusof, Yahaya, Rozali, & Othman, 2019). Conforme el fruto se madura, comienza la síntesis de carotenoides en los cromoplastos a partir de los ya existentes en los cloroplastos, así como también ocurre síntesis *de novo*. Mediante el proceso de maduración, los cloroplastos se convierten en cromoplastos, los cuales contienen una mezcla de carotenoides que contribuyen colectivamente con el color, que puede ir desde verde hacia café, después amarillo, naranja rojo o rojo oscuro al final de la maduración, dependiendo del cultivar (Hassan *et al.*, 2019).

### **Flavonoides**

Los flavonoides, una clase de polifenoles (metabolitos secundarios), se encuentran presentes ampliamente en las plantas, y se les han atribuido varios efectos bioactivos incluyendo propiedades antivirales, antiinflamatorias, cardioprotectivas, antidiabéticas, anticancerígenas, antienvjecimiento, entre otras. Su estructura básica consiste de tres anillos de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> con diferentes patrones de sustitución (Wang, Li, & Bi, 2018).

En chiles, se acumulan principalmente en el epicarpio, en sus formas conjugadas de tipo O-glicósidos y derivados C-glicósidos. La quercetina y la luteolina son los principales flavonoides presentes en chiles, en donde representan aproximadamente el 41% de todo el contenido total de flavonoides (Antonio *et al.*, 2018).

### **Compuestos volátiles**

La fracción volátil en los frutos de chile es la responsable de su aroma, así como también de sus compuestos bioactivos. Se ha reportado que es diversa, con más de 200 sustancias descritas, incluyendo compuestos clasificados como terpenos, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas,

ácidos, ésteres, lactonas y compuestos fenólicos (Antonio *et al.*, 2018).

Entre estas sustancias identificadas en la fracción volátil se encuentra tiol metano, dimetilsulfuro, dimetilamina, acetaldehído, propanal, acetona, 2-nonanona, hexano, ácido acético, 1-pentanol, limoneno, pentadecano, metil salicilato, entre otros (Antonio *et al.*, 2018).

## EDICIÓN GENÉTICA

Los avances en las tecnologías de edición genética han revolucionado los campos de la genómica funcional y el fitomejoramiento (Arora & Narula, 2017). La recién desarrollada técnica de edición genética llamada repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR/Cas9) ha contribuido significativamente en el avance para el mejoramiento de cultivos debido a su simplicidad y a su alta eficiencia en comparación con otras técnicas como las ZFNs y las TALENs (Karkute, Singh, Gupta, Singh, & Singh, 2017). El desarrollo de cultivos genéticamente editados similares a aquellos obtenidos mediante el fitomejoramiento convencional utilizando esta técnica la convierte en una herramienta muy prometedora y versátil para proveer de una agricultura sostenible con el fin de una mejor alimentación hacia una humanidad creciente en un escenario de cambio climático (Khatodia, Bhatotia, Passricha, Khurana, & Tuteja, 2016).

### Edición genética mediante CRISPR/Cas9

Debido al reciente desarrollo de esta tecnología y su adaptación al fitomejoramiento, los estudios que se han hecho en chiles son limitados. Borovsky *et al.* (2019) utilizaron esta estrategia para estudiar la función de los genes *CcLOL1*, *CaGLK2* y *CcAPRR2*, los cuales influyen el color de los chiles inmaduros y el desarrollo de los cloroplastos en *C. chinense*. Kim, Choi, & Won (2020) usaron protoplastos derivados de callos *in vitro* y plantas en invernadero de *C. annum* cv. CM334 y Dempsey para generar una delección en el gen *CaMLO2*, el cual se sabe que confiere susceptibilidad a enfermedades fúngicas, por lo que los mutantes adquieren resistencia ante un amplio espectro de estos patógenos, especialmente mildiú, con lo cual se pueden obtener cultivares libres de genes de otras especies de organismos con características agronómicas mejoradas.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El establecimiento de un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* abre las puertas a una gran cantidad de aplicaciones biotecnológicas, y a pesar de los problemas que los chiles presentan en este aspecto (naturaleza recalcitrante,

arrosetamiento de brotes adventicios y genotipo-dependencia), ha sido posible adaptar metodologías de acuerdo con la naturaleza de la investigación. Una de estas aplicaciones es la propagación masiva de materiales élite, que con un procedimiento minucioso asegura la fidelidad genética del cultivar. De manera similar, también es posible utilizar esta estrategia para la obtención de plantas libres de patógenos, asegurando de este modo la calidad fitosanitaria en los campos de cultivo. Asimismo, el uso de la transformación genética de plantas hace uso implícito de un sistema de regeneración *in vitro*, por lo que también se han adaptado procedimientos para distintos casos en particular. Con respecto al aprovechamiento de variantes somaclonales y la producción de dobles haploides, este campo se ha visto poco estudiado en chiles, por lo que existen ventanas de conocimiento abiertas.

Por otra parte, el análisis de la diversidad genética entre colectas de Chile permite tener un panorama amplio de los recursos genéticos existentes, dando así mayor importancia a su preservación, puesto que son fuente de genes con potencial incorporación a genotipos mejorados para la obtención de resistencia a diversos factores de estrés. No obstante, a pesar de la suma importancia que tiene este cultivo a nivel nacional, no se han realizado suficientes estudios con el fin de coleccionar y caracterizar las especies y variedades criollas que se tienen, por lo que es imperativo, sobre todo en un panorama global de cambio climático y perturbación del ambiente donde naturalmente se distribuyen, así de este modo asegurar la seguridad alimentaria de las generaciones futuras.

A pesar del desarrollo reciente del sistema de edición genética CRISPR/Cas9, las aplicaciones potenciales en el mejoramiento de chiles no se han visto esperar, y ya existen avances al respecto, por lo que a corto y mediano plazo el uso de esta estrategia se podría popularizar como uno de los métodos para la obtención de nuevos cultivares con características sobresalientes, como la resistencia a plagas y enfermedades, resistencia a estrés biótico y abiótico, y alto contenido nutricional. Todos estos avances recientes no serían posibles sin el uso de la bioinformática, herramienta crucial para la detección a gran escala de genes, transcriptomas, metabolomas, etc.

Se han realizado avances significativos en pro del mejoramiento genético de los chiles con el uso de las herramientas biotecnológicas que se encuentran disponibles actualmente, sin embargo, todavía queda un largo camino por recorrer. La inmersión y el establecimiento de estas distintas técnicas biotecnológicas y la perfección de los procedimientos actuales tendrá un enorme valor como herramienta para el mejoramiento genético de *Capsicum* con

el fin de obtener materiales élite con características agronómicas sobresalientes como mayores rendimientos, tolerancia o resistencia a estrés biótico y abiótico, mayor contenido nutrimental, y eficientes con respecto al uso de los recursos ambientales disponibles (agua, radiación solar, nutrimentos edáficos, etc.).

## BIBLIOGRAFÍA

Aboshama, H. (2011). Direct somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *World Journal of Agricultural Sciences*, 7(6), 755–762.

Aguirre-Hernández, E., & Muñoz-Ocotero, V. (2015). El chile como alimento. *Ciencia*, 66(3), 16–23.

Aguirre-Mancilla, C. L., Iturraga de la Fuente, G., Ramírez-Pimentel, J. G., Covarrubias-Prieto, J., Chablé-Moreno, F., & Raya-Pérez, J. C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria de México*, 5(1), 19–27.

Ahn, Y. K., Manivannan, A., Karna, S., Jun, T. H., Yang, E. Y., Choi, S., ... Lee, E. S. (2018). Whole Genome Resequencing of *Capsicum baccatum* and *Capsicum annuum* to Discover Single Nucleotide Polymorphism Related to Powdery Mildew Resistance. *Scientific Reports*, 8(1), 5188. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23279-5>

Al-Ajeel, S. A., Al-Hattab, Z. N., & El-Kaaby, E. A. (2016). Comparison on morphological and physiological traits of chilli pepper *Capsicum annuum* L. plants grown from seeds and somaclones from salt stress medium. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, 4(Jan/Feb), 105–108.

Alemu, A. S., Mullualem, A. D., & Adugna, G. S. (2017). Genetic diversity study of Ethiopian hot pepper cultivars (*Capsicum* spp.) using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) marker. *Journal of Plant Molecular Breeding*, 5(2), 27–37. <https://doi.org/10.22058/JPMB.2019.91684.1169>

Ali, M., Gai, W.-X., Khattak, A. M., Khan, A., Haq, S. U., Ma, X., ... Gong, Z.-H. (2019). Knockdown of the chitin-binding protein family gene CaChiIV1 increased sensitivity to *Phytophthora capsici* and drought stress in pepper plants. *Molecular Genetics and Genomics* 2019 294:5, 294(5), 1311–1326. <https://doi.org/10.1007/S00438-019-01583-7>

Ali, M., Luo, D.-X., Khan, A., Haq, S. U., Gai, W.-X., Zhang, H.-X., ... Gong, Z.-H. (2018). Classification and Genome-Wide Analysis of Chitin-Binding Proteins Gene Family in Pepper (*Capsicum annuum* L.) and Transcriptional Regulation to *Phytophthora capsici*, Abiotic Stresses and Hormonal Applications. *International Journal of Molecular*

*Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2216, 19(8), 2216. <https://doi.org/10.3390/IJMS19082216>

Ali, M., Muhammad, I., ul Haq, S., Alam, M., Khattak, A. M., Akhtar, K., ... Gong, Z.-H. (2020). The CaChiVI2 Gene of *Capsicum annuum* L. Confers Resistance Against Heat Stress and Infection of *Phytophthora capsici*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 219. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00219>

Ali, S., Ganai, B. A., Kamili, A. N., Bhat, A. A., Mir, Z. A., Bhat, J. A., ... Grover, A. (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213, 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2018.04.008>

Antonio, A. S., Wiedemann, L. S. M., & Veiga Junior, V. F. (2018). The genus: *Capsicum*: a phytochemical review of bioactive secondary metabolites. *RSC Advances*, 8(45), 25767–25784. <https://doi.org/10.1039/c8ra02067a>

Anu, A., Babu, K. N., & Peter, K. V. (2004). Variations among somaclones and its seedling progeny in *Capsicum annuum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76(3), 261–267. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000009246.24216.ea>

Arce-Rodríguez, M. L., Martínez, O., & Ochoa-Alejo, N. (2021). Genome-Wide Identification and Analysis of the MYB Transcription Factor Gene Family in Chili Pepper (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 2229, 22(5), 2229. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052229>

Arora, L., & Narula, A. (2017). Gene editing and crop improvement using CRISPR-Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1932. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01932>

Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011, May 14). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports*, Vol. 30, pp. 695–706. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>

Baba, V. Y., Rocha, K. R., Gomes, G. P., de Fátima Ruas, C., Ruas, P. M., Rodrigues, R., & Gonçalves, L. S. A. (2016). Genetic diversity of *Capsicum chinense* accessions based on fruit morphological characterization and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(8), 1371–1381. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0325-4>

Bairu, M. W., Aremu, A. O., & van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: Causes and detection

- methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147–173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Baral, J., & Bosland, P. W. (2002). Genetic diversity of a Capsicum germplasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(3), 318–324. <https://doi.org/10.21273/jashs.127.3.318>
- Barboza, G. E., Carrizo-García, C., Leiva-González, S., Scaldaferrro, M., & Reyes, X. (2019). Four new species of Capsicum (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PLOS ONE*, 14(1), e0209792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792>
- Barchenger, D. W., Lamour, K. H., & Bosland, P. W. (2018, May 15). Challenges and strategies for breeding resistance in Capsicum annum to the multifarious pathogen, Phytophthora capsici. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 9, p. 628. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00628>
- Barrales-López, A., Robledo-Paz, A., Trejo, C., Espitia-Rangel, E., & Rodríguez-De La O, J. L. (2015). Improved in vitro rooting and acclimatization of Capsicum chinense Jacq. plantlets. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 51(3), 274–283. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9671-3>
- Bartual, R., Carbonell, E. A., Marsal, J. I., Tello, J. C., & Campos, T. (1991). Gene action in the resistance of peppers (Capsicum annum) to Phytophthora stem blight (Phytophthora capsici L.). *Euphytica* 1991 54:2, 54(2), 195–200. <https://doi.org/10.1007/BF00039608>
- Bello-Bello, J. J., Iglesias-Andreu, L. G., Avilés-Viñas, S. A., 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. <https://doi.org/10.21273/hortsci.49.4.481>
- Beltrán-Burboa, J. N., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., & Cruz-Huerta, N. (2020). Germinación in vitro de chile chiltepín (Capsicum annum L. var. glabriusculum) y regeneración por organogénesis. *Agrociencia*, 54(2), 195–208.
- Benson, E. E. (2000). In vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36(3), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0029-z>
- Bhadragoudar, M. R., & Patil, C. G. (2011). Assessment of genetic diversity among Capsicum annum L. genotypes using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(76), 17477–17483. <https://doi.org/10.5897/AJB11.497>
- Bhandari, H. R., Nishant Bhanu, A., Srivastava, K., Singh, M. N., Shreya, & Hemantaranjan, A. (2017). Assessment of Genetic Diversity in Crop Plants - An Overview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7(3). <https://doi.org/10.15406/apar.2017.07.00255>
- Bhargava, Y. R., & Umalkar, G. V. (1989). Productive mutations induced in Capsicum annum by physical and chemical mutagens. *Acta Horticulturae*, 253, 233–238. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1989.253.25>
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., & Sankhla, D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (Capsicum annum L.). *Plant Cell Reports*, 15(7), 536–540. <https://doi.org/10.1007/BF00232989>
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A.-M., Caromel, B., ... Lefebvre, V. (2007). Are the polygenic architectures of resistance to Phytophthora capsici and P. parasitica independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 2007 115:2, 115(2), 253–264. <https://doi.org/10.1007/S00122-007-0561-X>
- Borovsky, Y., Monsonego, N., Mohan, V., Shabtai, S., Kamara, I., Faigenboim, A., ... Paran, I. (2019). The zinc-finger transcription factor CcLOL1 controls chloroplast development and immature pepper fruit color in Capsicum chinense and its function is conserved in tomato. *Plant Journal*, 99, 41–55. <https://doi.org/10.1111/tj.14305>
- Brilhante, B. D. G., Santos, T. de O., Santos, P. H. A. D., Kamphorst, S. H., Neto, J. D. S., Rangel, L. H., ... Moulin, M. M. (2021). Phenotypic and Molecular Characterization of Brazilian Capsicum Germplasm. *Agronomy*, 11(5), 854. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050854>
- Bulle, M., Yarra, R., & Abbagani, S. (2016). Enhanced salinity stress tolerance in transgenic chilli pepper (Capsicum annum L.) plants overexpressing the wheat antiporter (TaNHX2) gene. *Molecular Breeding*, 36(4), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0451-5>
- Buyukalaca, S., Comlekcioglu, N., Abak, K., Ekbic, E., & Kilic, N. (2004). Effects of silver nitrate and donor plant growing conditions on production of pepper (Capsicum annum L.) haploid embryos via anther culture. *European Journal of Horticultural Science*, 69(5), 206–209.
- Buyukalaca, Saadet, & Mavituna, F. (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid

- media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46(3), 227–235. <https://doi.org/10.1007/BF02307099>
- Carrizo-García, C., Barfuss, M. H. J., Sehr, E. M., Barboza, G. E., Samuel, R., Moscone, E. A., & Ehrendorfer, F. (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany*, 118(1), 35–51. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw079>
- Carvalho, S. I. C., Bianchetti, L. B., Ragassi, C. F., Ribeiro, C. S. C., Reifschneider, F. J. B., Buso, G. S. C., & Faleiro, F. G. (2017). Genetic variability of a Brazilian *Capsicum frutescens* germplasm collection using morphological characteristics and SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 16(3), 16039689. <https://doi.org/10.4238/gmr16039689>
- Chaudhary, J., Deshmukh, R., & Sonah, H. (2019). Mutagenesis Approaches and Their Role in Crop Improvement. *Plants*, 8(11), 467. <https://doi.org/10.3390/plants8110467>
- Chee, M. J. Y., Lycett, G. W., Khoo, T. J., & Chin, C. F. (2017). Bioengineering of the Plant Culture of *Capsicum frutescens* with Vanillin Synthase Gene for the Production of Vanillin. *Molecular Biotechnology*, 59(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12033-016-9986-2>
- Chhapekar, S. S., Jaiswal, V., Ahmad, I., Gaur, R., & Ramchiary, N. (2018). Progress and prospects in *Capsicum* breeding for biotic and abiotic stresses. In S. Vats (Ed.), *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 279–322). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-9029-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-10-9029-5_11)
- Christopher, T., & Rajam, M. V. (1994). In vitro clonal propagation of *Capsicum* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38(1), 25–29. <https://doi.org/10.1007/BF00034439>
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005, March 1). Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, Vol. 23, pp. 131–171. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008>
- Davies, F. T., Geneve, R. L., Wilson, S. B., Hartmann, H. T., & Kester, D. E. (2018). *Hartmann & Kester's plant propagation: principles and practices* (9th ed.). Pearson.
- Debbarama, C., Khanna, V. K., Tyagi, W., Rai, M., & Meetei, N. T. (2013). Wide Hybridization and Embryo-Rescue for Crop Improvement in *Capsicum*. *Agrotechnology*, S11, 003. <https://doi.org/10.4172/2168-9881.s11-003>
- Díaz, I., Moreno, R., & Power, J. B. (1988). Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Reports*, 7(3), 210–212. <https://doi.org/10.1007/BF00269326>
- Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., & Huerta, A. (1997). Androgenesis in *Capsicum annuum* L. - Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(4), 468–475. <https://doi.org/10.21273/jashs.122.4.468>
- Dumas de Vault, R., Chambonnet, D., & Pochard, E. (1981). In vitro culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers: High rate plant production from different genotypes by +35°C treatment. *Agronomie*, 1, 859–864.
- Ebida, A. I. A., & Hu, C. yeh. (1993). In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, 13(2), 107–110. <https://doi.org/10.1007/BF00235301>
- Egea, C., Pérez, M. D. G., & Candela, M. E. (1996). Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 149(6), 762–764. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80104-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80104-0)
- Ercan, N., Sensoy, F. A., & Sirri Sensoy, A. (2006). Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Scientia Horticulturae*, 110(1), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.06.007>
- FAOSTAT. (2021). Datos sobre Alimentación y Agricultura. Retrieved May 11, 2021, from División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura website: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Gammoudi, N., Pedro, T. S., Ferchichi, A., & Gisbert, C. (2018). Improvement of regeneration in pepper: a recalcitrant species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(2), 145–153. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9838-1>
- Gebhardt, C. (2016). The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, 129, 2281–2294. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2804-1>
- George, L., & Narayanaswamy, S. (1973). Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78(4), 467–470. <https://doi.org/10.1007/BF01275781>

- Germanà, M. A. (2011, November 12). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 104, pp. 283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Gogoi, S., Acharjee, S., & Devi, J. (2014). In vitro plantlet regeneration of *Capsicum chinense* Jacq. cv. “Bhut jalakia”: Hottest chili of northeastern India. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9569-x>
- Golegaonkar, P. G., & Kantharajah, A. S. (2006). High-frequency adventitious shoot bud induction and shoot elongation of chile pepper (*Capsicum annuum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 42(4), 341–344. <https://doi.org/10.1079/IVP2006785>
- Góngora-Castillo, E., Fajardo-Jaime, R., Fernández-Cortes, A., Jofre-Garfias, A. E., Lozoya-Gloria, E., Martínez, O., ... Rivera-Bustamante, R. (2012). The capsicum transcriptome DB: a “hot” tool for genomic research. *Bioinformatics*, 8(1), 47. <https://doi.org/10.6026/97320630008043>
- Grosser, J. W., Calovi, M., & Louzada, E. S. (2010). Protoplast Fusion Technology- Somatic Hybridization and Cybridization. In *Plant Cell Culture* (pp. 175–198). <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch10>
- Guerrero-Moreno, A., & Laborde, J. A. (1980). Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. *Synopses of the IVth Eucarpia Meeting on Capsicum Wageningen (Netherlands)*, 52–56.
- Gunay, A. L., & Rao, P. S. (1978). In vitro plant regeneration from hypocotyl and cotyledon explants of red pepper (capsicum). *Plant Science Letters*, 11(3–4), 365–372. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(78\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(78)90024-X)
- Guzmán, F. A., Ayala, H., Azurdia, C., Duque, M. C., & De Vicente, M. C. (2005). AFLP assessment of genetic diversity of *Capsicum* genetic resources in Guatemala: Home gardens as an option for conservation. *Crop Science*, 45(1), 363–370. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0363>
- Haque, S. M., & Ghosh, B. (2018). An improved micropropagation protocol for the recalcitrant plant *Capsicum*—a study with ten cultivars of *Capsicum* spp. (*C. annuum*, *C. chinense*, and *C. frutescens*) collected from diverse geographical regions of India and Mexico. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(1), 91–99. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1345331>
- Harini, I., & Lakshmi Sita, G. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science*, 89(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90176-Z](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90176-Z)
- Hassan, N. M., Yusof, N. A., Yahaya, A. F., Rozali, N. N. M., & Othman, R. (2019, October 1). Carotenoids of capsicum fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants*, Vol. 8, p. 469. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- Hossain, M. A., Konisho, K., Minami, M., & Nemoto, K. (2003). Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 130, 233–239. <https://doi.org/10.1023/A:1022856725794>
- Hossain, M., Minami, M., & Nemoto, K. (2003). Immature Embryo Culture and Interspecific Hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via Embryo Rescue. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 47(1), 9–16. <https://doi.org/10.11248/jsta1957.47.9>
- Ibarra-Torres, P., Valadez-Moctezuma, E., Pérez-Grajales, M., Rodríguez-Campos, J., & Jaramillo-Flores, M. E. (2015). Inter- and intraspecific differentiation of *Capsicum annuum* and *Capsicum pubescens* using ISSR and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 181, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.10.054>
- Ibiza, V. P., Blanca, J., Cañizares, J., & Nuez, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(6), 1077–1088. <https://doi.org/10.1007/s10722-011-9744-z>
- Irikova, T., Grozeva, S., & Rodeva, V. (2011, September 4). Anther culture in pepper (*Capsicum annuum* L.) in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 33, pp. 1559–1570. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0736-6>
- Jae, B. Y., Dong, C. Y., Jae, W. Do, & Hyo, G. P. (2006). Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breeding Science*, 56, 31–38. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.56.31>
- Jain, S. M. (2010). Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(SUPPL.2), 88–106.
- Jeong-Yon, J., Eun-Young, C., Dongsu, C., & Kwang-Woong, L. (1996). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Immature Zygotic Embryo Culture in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Plant Biology*, 39(2), 127–135.

- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2–3), 91–110. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x>
- Joshi, M. N., & Khalatkar, A. S. (1981). Experimental mutagenesis in *Capsicum annuum*: I. Effect of different doses of gamma radiations on capsule and seed production. *Acta Horticulturae*, 111, 55–62. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1981.111.6>
- Kaparakis, G., & Alderson, P. G. (2008). Role for cytokinins in somatic embryogenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.)? *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(2), 110–114. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9037-0>
- Karkute, S. G., Singh, A. K., Gupta, O. P., Singh, P. M., & Singh, B. (2017). CRISPR/Cas9 Mediated Genome Engineering for Improvement of Horticultural Crops. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1635. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01635>
- Katiyar, R. B. (1978). Radiocytogenetical studies on *Capsicum*. I. Meiotic anomalies. *CYTOLOGIA*, 43(2), 415–421. <https://doi.org/10.1508/cytologia.43.415>
- Keleş, D., Pınar, H., Ata, A., Taşkın, H., Yıldız, S., & Büyükalaca, S. (2015). Effect of pepper types on obtaining spontaneous doubled haploid plants via anther culture. *HortScience*, 50(11), 1671–1676. <https://doi.org/10.21273/hortsci.50.11.1671>
- Khan, H., Siddique, I., & Anis, M. (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*, 50(4), 789–792. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0133-y>
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P., & Tuteja, N. (2016, April 19). The CRISPR/Cas genome-editing tool: Application in improvement of crops. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 7, p. 506. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00506>
- Kim, H.-J., Nahm, S.-H., Lee, H.-R., Yoon, G.-B., Kim, K.-T., Kang, B.-C., ... Kim, B.-D. (2008). BAC-derived markers converted from RFLP linked to *Phytophthora capsici* resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/S00122-008-0873-5>
- Kim, H., Choi, J., & Won, K. H. (2020). A stable DNA-free screening system for CRISPR/RNPs-mediated gene editing in hot and sweet cultivars of *Capsicum annuum*. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02665-0>
- Kim, H., & Lim, J. (2019). Leaf-induced callus formation in two cultivars: hot pepper ‘CM334’ and bell pepper ‘Dempsey.’ *Plant Signaling and Behavior*, 14(7), 1604016. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604016>
- Kim, M., Jang, I. C., Kim, J. A., Park, E. J., Yoon, M., & Lee, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27(3), 425–434. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0442-4>
- Kim, S., Park, M., Yeom, S. I., Kim, Y. M., Lee, J. M., Lee, H. A., ... Choi, D. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nature Genetics*, 46(3), 270–278. <https://doi.org/10.1038/ng.2877>
- Kimble, K. A., & Grogan, R. G. (1960). Resistance to *Phytophthora* root rot in pepper. *Plant Disease Reports*, 44, 872–873.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., & Lympelopoulou, C. (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 55–62. <https://doi.org/10.1023/A:1011610413177>
- Kintzios, S., Drossopoulos, J. B., Shortsiianitis, E., & Peppes, D. (2000). Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): Effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturae*, 85(1–2), 137–144. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00135-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00135-1)
- Kintzios, S. E., Hiureas, G., Shortsiianitis, E., Sereti, E., Blouhos, P., Manos, C., ... Holevas, C. D. (1998). The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. *Acta Horticulturae*, 461, 427–432. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.461.49>
- Koleva-Gudeva, L. R., Spasenoski, M., & Trajkova, F. (2007). Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, 111(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.013>
- Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli peppers - A review on tissue culture and transgenesis. *Biotechnology Advances*, 28(1), 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.08.005>
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal

- variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Kristiansen, K., & Andersen, S. B. (1993). Effects of donor plant temperature, photoperiod, and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67(1–2), 105–109. <https://doi.org/10.1007/BF00022732>
- Kue-Jae, L., & Wang, L. (2003). Isolation and culture of protoplasts from leaf tissue of *Capsicum annuum* var. *accumnatum* Fingerh and *C. frutescens* L. [Syn. *C. minimum* Roxb.] (Bird chilli). *Proceedings of the Plant Resources Society of Korea Conference*, 50–58. The Plant Resources Society of Korea.
- Kumar, R. V., Sharma, V. K., Chattopadhyay, B., & Chakraborty, S. (2012). An improved plant regeneration and Agrobacterium - mediated transformation of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(4), 357–364. <https://doi.org/10.1007/s12298-012-0132-8>
- Lamour, K. H., Mudge, J., Gobena, D., Hurtado-Gonzales, O. P., Schmutz, J., Kuo, A., ... Kingsmore, S. F. (2012). Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(10), 1350–1360. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-12-0028-R>
- Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., & Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x>
- Lantos, C., Juhász, A. G., Somogyi, G., Ötvös, K., Vági, P., Mihály, R., ... Pauk, J. (2009). Improvement of isolated microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) via co-culture with ovary tissues of pepper or wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97(3), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9527-9>
- Lee, J., Nam, J.-Y., Jang, H., Kim, N., Kim, Y.-M., Kang, W.-H., & Yeom, S.-I. (2020). Comprehensive transcriptome resource for response to phytohormone-induced signaling in *Capsicum annuum* L. *BMC Research Notes* 2020 13:1, 13(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05281-1>
- Lefebvre, V., & Palloix, A. (1996). Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper — *Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and Applied Genetics* 1996 93:4, 93(4), 503–511. <https://doi.org/10.1007/BF00417941>
- Lefebvre, V., Palloix, A., & Rives, M. (1993). Nuclear RFLP between pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*, 71(3), 189–199. <https://doi.org/10.1007/BF00040408>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0581-1>
- Liu, W., Parrott, 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 Reports*, 9(7), 360–364. <https://doi.org/10.1007/BF00232399>
- López-Espinosa, S. T., Latournerie-Moreno, L., Castañón-Nájera, G., Ruiz-Sánchez, E., Gómez-Leyva, J. F., Andueza-Noh, R. H., & Mijangos-Cortés, J. O. (2018). Diversidad genética de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) mediante ISSR. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(3), 227–236.
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Montalvo-Peniche, M. D. C., Barahona-Pérez, F., ... Iglesias-Andreu, L. (2006). Direct somatic embryogenesis: A highly efficient protocol for in vitro regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, 41(7), 1645–1650. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.7.1645>
- Lu, M., Ho, C. T., & Huang, Q. (2017, January 1). Extraction, bioavailability, and bioefficacy of capsaicinoids. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 25, pp. 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.10.023>
- Luitel, B. P., & Kang, W. H. (2013). In vitro androgenic response of minipaprika (*Capsicum annuum* L.) genotypes in different culture media. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 54(2), 162–171. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0110-2>
- Luo, X. J., Peng, J., & Li, Y. J. (2011, January 10). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 650, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.074>
- Mahto, B. K., Sharma, P., Rajam, M. V., Reddy, P. M., & Dhar-Ray, S. (2018). An efficient method for Agrobacterium-mediated genetic transformation of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 23(3), 573–581. <https://doi.org/10.1007/s40502-018-0389-1>

- Maligeppagol, M., Manjula, R., Navale, P. M., Babu, K. P., Kumbhar, B. M., & Laxman, R. H. (2016). Genetic transformation of chilli (*Capsicum annuum* L.) with Dreb1A transcription factor known to impart drought tolerance. *Indian Journal of Biotechnology*, *15*(1), 17–24.
- Manoharan, M., Vidya, C. S. S., & Sita, G. L. (1998). Agrobacterium-mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var. Pusa jwala). *Plant Science*, *131*(1), 77–83. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00231-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00231-8)
- Manzur, J. P., Calvache-Asensio, M. de las N., & Rodríguez-Burruezo, A. (2014). Growth regulators and darkness increase efficiency in in vitro culture of immature embryos from peppers. *Scientia Agricola*, *71*(6), 488–493. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0230>
- Manzur, J. P., Fita, A., Prohens, J., & Rodríguez-Burruezo, A. (2015). Successful Wide Hybridization and Introgression Breeding in a Diverse Set of Common Peppers (*Capsicum annuum*) Using Different Cultivated Ají (*C. baccatum*) Accessions as Donor Parents. *PLOS ONE*, *10*(12), e0144142. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144142>
- Manzur, J. P., Penella, C., & Rodríguez-Burruezo, A. (2013). Effect of the genotype, developmental stage and medium composition on the in vitro culture efficiency of immature zygotic embryos from genus *Capsicum*. *Scientia Horticulturae*, *161*, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.036>
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, *74*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Mo, H., Kim, S., Wai, K. P. P., Siddique, M. I., Yoo, H., & Kim, B.-S. (2014). New sources of resistance to *Phytophthora capsici* in *Capsicum* spp. *Horticulture, Environment, and Biotechnology 2014 55:1*, *55*(1), 50–55. <https://doi.org/10.1007/S13580-014-0016-7>
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2011). Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analyses of Plant Functions. *Plant and Cell Physiology*, *52*(12), 2017–2038. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCR153>
- Monteiro do Rego, M., Ramalho do Rego, E., & Barroso, P. A. (2016). Tissue culture of *Capsicum* spp. In E. Ramalho do Rego, M. Monteiro do Rego, & F. L. Finger (Eds.), *Production and Breeding of Chilli Peppers (Capsicum spp.)* (pp. 97–127). [https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8\\_6](https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-06532-8_6)
- Morán-Bañuelos, S. H., Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., & Zavaleta-Mejía, E. (2010). Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. de chiles nativos del sur de Puebla, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *33*(Especial 4), 21–26. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802010000500006](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802010000500006)
- Munyon, I. P., Hubstenberger, J. F., & Phillips, G. C. (1989). Origin of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, *25*(3), 293–296. <https://doi.org/10.1007/BF02628469>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nowaczyk, L., Nowaczyk, P., & Olszewska, D. (2015). Genetic analysis of anther culture-derived diploids of *Capsicum* spp. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *90*(6), 747–752. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11668741>
- Nowaczyk, P., & Kisiała, A. (2006). Effect of selected factors on the effectiveness of *Capsicum annuum* L. anther culture. *Journal of Applied Genetics*, *47*(2), 113–117. <https://doi.org/10.1007/BF03194609>
- Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis in *Capsicum* spp. In V. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications* (pp. 233–240). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_14)
- Ochoa-Alejo, N., & Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*, *42*(1–2), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90144-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90144-4)
- Ochoa-Alejo, Neftali, & Ramirez-Malagon, R. (2001). In vitro chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Vol. 37, pp. 701–729. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0121-z>
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., ... Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *30*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>
- Olszewska, D., Kisiała, A., Niklas-Nowak, A., & Nowaczyk, P. (2014). Study of in vitro anther culture in selected

- genotypes of genus *Capsicum*. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 118–124. <https://doi.org/10.3906/biy-1307-50>
- Ortega, J. L., Rajapakse, W., Bagga, S., Apodaca, K., Lucero, Y., & Sengupta-Gopalan, C. (2018). An intragenic approach to confer glyphosate resistance in chile (*Capsicum annuum*) by introducing an in vitro mutagenized chile EPSPS gene encoding for a glyphosate resistant EPSPS protein. *PLOS ONE*, 13(4), e0194666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194666>
- Ortega, R. G., Español, C. P., & Zueco, J. C. (1991). Genetics of Resistance to *Phytophthora capsici* in the Pepper Line ‘SCM-334.’ *Plant Breeding*, 107(1), 50–55. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0523.1991.TB00527.X>
- Pang, Z., Shao, J., Chen, L., Lu, X., Hu, J., Qin, Z., & Liu, X. (2013). Resistance to the Novel Fungicide Pyrimorph in *Phytophthora capsici*: Risk Assessment and Detection of Point Mutations in Cesa3 That Confer Resistance. *PLOS ONE*, 8(2), e56513. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0056513>
- Paran, I., Aftergoot, E., & Shifriss, C. (1998). Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 99(3), 167–173. <https://doi.org/10.1023/A:1018301215945>
- Paran, I., Borovsky, Y., Nahon, S., & Cohen, O. (2007). The use of induced mutations to study shoot architecture in *Capsicum*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 55(2), 125–131. <https://doi.org/10.1560/IJPS.55.2.125>
- Parra-Vega, V., Renau-Morata, B., Sifres, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2013). Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112(3), 353–360. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0242-6>
- Parra, G., & Ristaino, J. B. (2001). Resistance to Mefenoxam and Metalaxyl Among Field Isolates of *Phytophthora capsici* Causing *Phytophthora* Blight of Bell Pepper. *Plant Disease*, 85(10), 1069–1075. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1069>
- Parry, M. A. J., Madgwick, P. J., Bayon, C., Tearall, K., Hernandez-Lopez, A., Baudo, M., ... Phillips, A. L. (2009). Mutation discovery for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, 60(10), 2817–2825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp189>
- Pérez-Castañeda, L., Castañón-Nájera, G., Ramírez-Meraz, M., & Mayek-Pérez, N. (2015). Avances y perspectivas sobre el estudio del origen y la diversidad genética de *Capsicum* spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2(4), 117–128. <https://doi.org/10.19136/era.a2n4.721>
- Prakash, A. H., Sankara Rao, K., & Kumar, M. U. (1997). Plant regeneration from protoplasts of *Capsicum annuum* L. cv. California Wonder. *Journal of Biosciences*, 22(3), 339–344. <https://doi.org/10.1007/BF02703236>
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., ... Zhang, Z. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400975111>
- Qin, X., & Rotino, G. L. (1995). ANTHOR CULTURE OF SEVERAL SWEET AND HOT PEPPER GENOTYPES. *Acta Horticulturae*, (402), 313–316. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1995.402.51>
- Quirin, E. A., Ogundiwin, E. A., Prince, J. P., Mazourek, M., Briggs, M. O., Chlanda, T. S., ... Jahn, M. M. (2005). Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto.5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. *Theoretical and Applied Genetics* 2005 110:4, 110(4), 605–612. <https://doi.org/10.1007/S00122-004-1874-7>
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006, September 17). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. 86, pp. 285–301. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>
- Rabelo da Costa, F., Santana Pereira, T. N., Pierre Vitória, A., Pereira de Campos, K., Rodrigues, R., Henriques da Silva, D., & Gonzaga Pereira, M. (2006). Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 6(1), 18–23. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v06n01a03>
- Rao, N. B., & Lakshmi, N. (1980). Gamma ray induced meiotic abnormalities in *Capsicum annuum* L. *Caryologia*, 33(4), 509–518. <https://doi.org/10.1080/00087114.1980.10796866>
- Reifschneider, F. J. B., Boiteux, L. S., Vecchia, P. T. Della, Poulos, J. M., & Kuroda, N. (1992). Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Euphytica* 1992 62:1, 62(1), 45–49. <https://doi.org/10.1007/BF00036086>

- Retes-Manjarrez, J. E., Rubio-Aragón, W. A., Márques-Zequera, I., Cruz-Lachica, I., García-Estrada, R. S., & Sy, O. (2020). Novel Sources of Resistance to *Phytophthora capsici* on Pepper (*Capsicum* sp.) Landraces from Mexico. *The Plant Pathology Journal*, 36(6), 600–607. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2020.0131>
- Rhee, S. Y., Dickerson, J., & Xu, D. (2006). Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 335–360. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.56.032604.144103>
- Rodriguez, J. M., Berke, T., Engle, L., & Nienhuis, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1–2), 147–156. <https://doi.org/10.1007/s001220051219>
- Sahijram, L., & Rao, B. M. (2015). Hybrid embryo rescue in crop improvement. In *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology: Vol. II* (pp. 363–384). [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_18)
- Sang, M. K., Kim, J.-G., & Kim, K. D. (2010). Biocontrol Activity and Induction of Systemic Resistance in Pepper by Compost Water Extracts Against *Phytophthora capsici*. *Phytopatology*, 100(8), 774–783. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-8-0774>
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Barahona-Pérez, F., Montalvo-Peniche, M. D. C., Zapata-Castillo, P. Y., Solís-Ruiz, A., ... Miranda-Ham, M. D. L. (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. *HortScience*, 40(6), 1829–1831. <https://doi.org/10.21273/hortsci.40.6.1829>
- Saxena, P. K., Gill, R., Rashid, A., & Maheshwari, S. C. (1981). Isolation and culture of protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering in vitro. *Protoplasma*, 108(3–4), 357–360. <https://doi.org/10.1007/BF02224429>
- Seguí-Simarro, J. M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., & González-García, B. (2011, May 30). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, Vol. 30, pp. 765–778. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0984-8>
- Sharma, A., Kumar, V., Giridhar, P., & Ravishankar, G. A. (2008). Induction of in vitro flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue2-fulltext-8>
- Sharmin, A., Hoque, M. E., Haque, M. M., & Khatun, F. (2018). Molecular diversity analysis of some chilli (*Capsicum* spp.) genotypes using SSR markers. *American Journal of Plant Sciences*, 9(3), 368–379. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.93029>
- Shen, X., Gmitter, F. G., & Grosser, J. W. (2011). Immature embryo rescue and culture. In T. Thorpe & E. Yeung (Eds.), *Plant embryo culture: Methods and protocols* (Vol. 710, pp. 75–92). [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-988-8_7)
- Shi, J., Ye, W., Ma, D., Yin, J., Zhang, Z., Wang, Y., & Qiao, Y. (2021). Improved whole genome sequence of *Phytophthora capsici* generated by long-read sequencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-20-0356-a>
- Shivakumara, T. N., Sreevathsa, R., Dash, P. K., Sheshshayee, M. S., Papolu, P. K., Rao, U., ... UdayaKumar, M. (2017). Overexpression of Pea DNA Helicase 45 (PDH45) imparts tolerance to multiple abiotic stresses in chili (*Capsicum annuum* L.). *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02589-0>
- Silvar, C., Merino, F., & Díaz, J. (2008). Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*, 165(10), 1120–1124. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2007.11.008>
- Solís-Ramos, L. Y., Nahuath-Dzib, S., Andrade-Torres, A., Barredo-Pool, F., González-Estrada, T., & de la Serna, E. C. (2010). Indirect somatic embryogenesis and morphohistological analysis in *Capsicum chinense*. *Biologia*, 65(3), 504–511. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0049-z>
- Sri Devi, A., & Mullainathan, L. (2011). Physical and chemical mutagenesis for improvement of Chilli (*Capsicum annuum* L.). *World Applied Sciences Journal*, 15(1), 108–113.
- Sripichitt, P., Nawata, E., & Shigenaga, S. (1987). In vitro shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa). *Japanese Journal of Breeding*, 37(2), 133–142. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.37.133>
- Srivastava, A., & Mangal, M. (2019). *Capsicum* Breeding: History and Development. In N. Ramchiary & C. Kole (Eds.), *The Capsicum Genome. Compendium of Plant Genomes* (pp. 25–55). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-97217-6_3)

- Stewart, C. N. (2016). *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications* (2nd ed.). Wiley.
- Sun, Y. L., Choi, I. L., Lee, Y. B., Choi, K. Y., Hong, S. K., & Kang, H. M. (2014). Molecular diversity and phylogenetic analysis of *Capsicum annuum* varieties using the nrDNA ITS region. *Scientia Horticulturae*, *165*, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.11.009>
- Supena, E. D. J., Suharsono, S., Jacobsen, E., & Custers, J. B. M. (2006). Successful development of a shed-microspore culture protocol for doubled haploid production in Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, *25*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0028-y>
- Tang, B., Xie, L., Yi, T., Lv, J., Yang, H., Cheng, X., ... Zou, X. (2019). Genome-Wide Identification and Characterization of the Mitochondrial Transcription Termination Factors (mTERFs) in *Capsicum annuum* L. *International Journal of Molecular Sciences* *2020*, Vol. *21*, Page *269*, *21*(1), *269*. <https://doi.org/10.3390/IJMS21010269>
- Thuy, V. T. B., Ky, H., Ba, T. T., Hien, N. L., & Yeap, S. K. (2016). Assessment of genetic diversity of chili rootstock using ISSR marker. *Can Tho University Journal of Science*, *03*, 7–13. <https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2016.017>
- Toquica, S. P., Rodríguez, F., Martínez, E., Duque, M. C., & Tohme, J. (2003). Molecular characterization by AFLPs of *Capsicum* germplasm from the Amazon Department in Colombia, characterization by AFLPs of *Capsicum*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *50*(6), 639–647. <https://doi.org/10.1023/A:1024429320771>
- Torres, K. C. (1989). Stages of Micropropagation. In K. C. Torres (Ed.), *Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops* (pp. 52–65). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9756-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9756-8_3)
- Tsaballa, A., Ganopoulos, I., Timplalexi, A., Alik, X., Bosmali, I., Irini, N. O., ... Madesis, P. (2015). Molecular characterization of Greek pepper (*Capsicum annuum* L) landraces with neutral (ISSR) and gene-based (SCoT and EST-SSR) molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, *59*, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.02.005>
- Ulukan, H. (2009). The evolution of cultivated plant species: Classical plant breeding versus genetic engineering. *Plant Systematics and Evolution*, *280*(3–4), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0118-8>
- Vassilev, D., Leunissen, J., Atanasov, A., Nenov, A., & Dimov, G. (2005). Application of Bioinformatics in Plant Breeding. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *19*, 139–152. <https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817293>
- Venkataiah, P., Bhanuprakash, P., Suman Kalyan, S., & Subhash, K. (2016). Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Capsicum baccatum* L. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *14*(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.02.001>
- Villa-Rivera, M. G., & Ochoa-Alejo, N. (2020). Chili Pepper Carotenoids: Nutraceutical Properties and Mechanisms of Action. *Molecules* *2020*, Vol. *25*, Page *5573*, *25*(23), *5573*. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25235573>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Vol. *69*, pp. 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Walker, S. J., & Bosland, P. W. (1999). Inheritance of Phytophthora Root Rot and Foliar Blight Resistance in Pepper. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *124*(1), 14–18. <https://doi.org/10.21273/JASHS.124.1.14>
- Walsh, B. M., & Hoot, S. B. (2001). Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: The chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. *International Journal of Plant Sciences*, *162*(6), 1409–1418. <https://doi.org/10.1086/323273>
- Wang, P., Liu, X., Guo, J., Liu, C., Fu, N., & Shen, H. (2015). Identification and Expression Analysis of Candidate Genes Associated with Defense Responses to *Phytophthora capsici* in Pepper Line “PI 201234.” *International Journal of Molecular Sciences* *2015*, Vol. *16*, Pages *11417–11438*, *16*(5), 11417–11438. <https://doi.org/10.3390/IJMS160511417>
- Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018, January 1). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. *13*, pp. 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wang, W., Liu, X., Han, T., Li, K., Qu, Y., & Gao, Z. (2020). Differential Potential of *Phytophthora capsici* Resistance Mechanisms to the Fungicide Metalaxyl in Peppers. *Microorganisms* *2020*, Vol. *8*, Page *278*, *8*(2), *278*. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020278>

- Wang, Y.-Y., Sun, C.-S., Wang, C.-C., & Chien, N.-F. (1973). Citation. *Scientia Sinica*, 16(1), 147–151. <https://doi.org/10.1360/ya1973-16-1-147>
- Wang, Y. J., Li, C. L., & Jiang, Z. G. (1981). New development in anther culture of *Capsicum annuum* and *C. annuum* var. *Grossum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 8(2), 41–46. Retrieved from <https://worldveg.tind.io/record/4929>
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012, May 28). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 13, pp. 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
- Zapata-Castillo, P. Y., Flick, A. C., López-Puc, G., Solís-Ruiz, A., Barahona-Pérez, F., Santana-Buzzy, N., & Iglesias-Andreu, L. (2007). Somatic embryogenesis in Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions. *HortScience*, 42(2), 329–333. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.2.329>
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B. H. (2017, January 1). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, Vol. 10, pp. 5–24. <https://doi.org/10.1111/eva.12434>
- Zhang, Y.-L., Jia, Q.-L., Li, D.-W., Wang, J.-E., Yin, Y.-X., & Gong, Z.-H. (2013). Characteristic of the Pepper CaRGA2 Gene in Defense Responses against *Phytophthora capsici* Leonian. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 8985-9004, 14(5), 8985–9004. <https://doi.org/10.3390/IJMS14058985>
- Zhang, Y. L., Li, D. W., Gong, Z. H., Wang, J. E., Yin, Y. X., & Ji, J. J. (2013). Genetic determinants of the defense response of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici* (Oomycetes; Pythiaceae). *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 3605–3621. <https://doi.org/10.4238/2013.September.13.5>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO  
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
INSTITUTO DE HORTICULTURA  
COORDINACIÓN ESTUDIOS DE POSGRADO



Chapingo, Méx., a 14 de julio 2021

NÚMERO DE OFICIO: HOR2021/114

ASUNTO: Liberación Antecedentes académicos

LIC. GERARDO ESCOBAR CRUZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E:

Por medio del presente, le comunico que el alumno **FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA** con número de matrícula **1813001-3** ha cubierto el número de créditos y la calificación requeridos (se anexa historial académico), ha cubierto el puntaje requerido en el examen TOEFL (se anexa comprobante) y ha escrito el documento de tesis según las normas y al menos un artículo científico, con lo cual cumple con lo necesario para que se le autorice la realización del examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agrícola.

Agradeciendo dar trámite al proceso para que la estudiante pueda llevar a cabo el examen de grado de manera virtual en fecha próxima, me despido de usted.

Agradeciendo de antemano su fina atención, quedo a sus órdenes.

Vo. Bo.

**A T E N T A M E N T E**

*"Enseñar la Explotación de la Tierra, no la del Hombre"*

DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO  
COORDINADOR DE LOS PROGRAMAS DE ESTUDIO  
DE POSGRADO DEL DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
Y DEL INSTITUTO DE HORTICULTURA



C.c.p.- Dr. José Oscar Mascorro Gallardo. Coordinación de Estudios de Posgrado del Departamento de Fitotecnia.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

## DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA

Chapingo, México

DEPTO. DE SERV. ESCOLARES  
 POSGRADO  
 MATRICULA: 1813001-3  
 CATEGORIA: Tiempo Completo

### RELACION DE CALIFICACIONES

EL QUE SUSCRIBE: **JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO.**

### H A C E C O N S T A R

QUE EL C. **GUERRERO VALENCIA FRANCO ARMANDO** ES ALUMNO(A)  
 DE ESTA UNIVERSIDAD Y CURSA ACTUALMENTE EL QUINTO SEMESTRE DEL  
 PROGRAMA DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA AGRICOLA  
 INGENIERIA GENETICA**

HABIENDO OBTENIDO LOS PROMEDIOS FINALES SIGUIENTES:

Clave	Nombre del curso	Gdo.	Créditos	Calificación
	<b>Primavera 2019</b>	<b>1</b>		
BIO-615	BIOQUIMICA VEGETAL		3	95 (NOVENTA Y CINCO)
BIO-612	BIOLOGIA MOLECULAR		3	94 (NOVENTA Y CUATRO)
BIO-611	GENETICA AVANZADA		3	92 (NOVENTA Y DOS)
BIO 601	SEMINARIO I		1	85 (OCHENTA Y CINCO)
BIO-699	INVESTIGACION		2	90 (NOVENTA)
	<b>Verano 2019</b>	<b>1</b>		
BIO-699	INVESTIGACION		1	95 (NOVENTA Y CINCO)
613	METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR		3	92 (NOVENTA Y DOS)
	<b>Otoño 2019</b>	<b>2</b>		

AL CONTESTAR ESTE OFICIO CITENSE  
 LOS DATOS CONTENIDOS EN EL CUADRO  
 DEL ANGULO SUPERIOR DERECHO



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

## DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA

Chapingo, México

DEPTO. DE SERV. ESCOLARES  
 POSGRADO  
 MATRICULA: 1813001-3  
 CATEGORIA: Tiempo Completo

	Otoño	2019	2		
BIO-602	SEMINARIO II			1	98 (NOVENTA Y OCHO)
BIO-626	CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS			4	96 (NOVENTA Y SEIS)
BIO-623	BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS			3	93 (NOVENTA Y TRES)
BIO-699	INVESTIGACION			2	96 (NOVENTA Y SEIS)
BIO-622	INGENIERIA GENETICA DE PLANTAS			4	97 (NOVENTA Y SIETE)
	<b>Primavera</b>	<b>2020</b>	<b>3</b>		
BIO-699	INVESTIGACION			2	95 (NOVENTA Y CINCO)
BIO-662	PROBLEMA ESPECIAL: POTENCIAL EMBRIOGENICO Y ORGANOGENICO DE EXPLANTES DE CHILE MANZANO CULTIVADOS IN-VITRO			3	96 (NOVENTA Y SEIS)
BIO-614	BIOLOGIA CELULAR			3	96 (NOVENTA Y SEIS)
	<b>Verano</b>	<b>2020</b>	<b>3</b>		
BIO-699	INVESTIGACION			1	96 (NOVENTA Y SEIS)
	<b>Otoño</b>	<b>2020</b>	<b>4</b>		
752	FITOQUIMICA APLICADA			4	93 (NOVENTA Y TRES)

AL CONTESTAR ESTE OFICIO CITENSE  
 LOS DATOS CONTENIDOS EN EL CUADRO  
 DEL ANGULO SUPERIOR DERECHO



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

## DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA

Chapingo, México

DEPTO. DE SERV. ESCOLARES  
 POSGRADO  
 MATRICULA: 1813001-3  
 CATEGORIA: Tiempo Completo

Otoño 2020 4  
 BIO-699 INVESTIGACION 2 96 (NOVENTA Y SEIS)

Total de créditos: 45

Promedio general ponderado: 94 (NOVENTA Y CUATRO)

ESCALA DE CALIFICACIONES DEL 000 AL 100  
 MINIMA PARA SER APROBRADO 080

A SOLICITUD DEL(A) INTERESADO(A) Y PARA LOS FINES LEGALES QUE AL(A LA) MISMO(A) CONVenga, SE EXTIENDE LA PRESENTE RELACION DE CALIFICACIONES EN CHAPINGO, ESTADO DE MEXICO A LOS 18 dias del mes de Febrero de 2021.

A T E N T A M E N T E  
 "ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
 LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"  
 EL JEFE DEL DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES

  
 M.C. GILBERTO DAVID VELÁZQUEZ CASTRO

(ADA) Materia Acreditada  
 (REV) Materia Revalidada  
 (MPR) Materia Pendiente por Reportar  
 (RFE) Reporte al Final de Estudios  
 (A) Materia Aprobada  
 (R) Materia no Aprobada



OFICINA DE POSTGRADO  
 DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES

## ORCID DEL ESTUDIANTE Y COMITÉ

🆔 Franco Armando Guerrero Valencia (estudiante):

<https://orcid.org/0000-0002-7401-5059>

🆔 Dr. José Luis Rodríguez de la O (director):

<https://orcid.org/0000-0002-2331-9984>

🆔 Dr. José Óscar Mascorro Gallardo (asesor):

<https://orcid.org/0000-0001-9713-4758>

🆔 Dr. Mario Pérez Grajales (asesor):

<https://orcid.org/0000-0003-3769-2357>

## CORREOS ELECTRÓNICOS DEL EESTUDIANTE Y COMITÉ

Franco Armando Guerrero Valencia (estudiante):

[guerrerofranco066@gmail.com](mailto:guerrerofranco066@gmail.com)

Dr. José Luis Rodríguez de la O (director):

[jlrde lao@gmail.com](mailto:jlrde lao@gmail.com)

Dr. José Óscar Mascorro Gallardo (asesor):

[jomg2013@gmail.com](mailto:jomg2013@gmail.com)

Dr. Mario Pérez Grajales (asesor):

[perezgm7@yahoo.com.mx](mailto:perezgm7@yahoo.com.mx)

## TOEFL ITP Score Report

Name of Institution: HARMON HALL TEXCOCO

Name: GUERRERO VALENCIA FRANCO

Student Number: 210614732

DOB: 01/12/1993

Sex: M

Degree:

Times Taken TOEFL: 2+

Native Country: Mexico

Native Language: Spanish

Scaled Scores:

Listening Comprehension:

54

Test Date: 05/22/2021

Structure & Written Expression:

54

Form: TOEFL ITP

Reading Comprehension:

57

Total Score:

550

# TOEFL ITP

Student's File Co  
Do Not Co

*Use of this document has a security background. The back contains a watermark. Hold at an angle to view.*

TOEFL® ITP Assessment Series is designed to be used for placement, progress monitoring, exit purposes. TOEFL® ITP scores can also be used for admissions to programs and institutions where English is not the dominant language of instruction for content courses. Learn more at [ets.org/toefl\\_itp/use](https://ets.org/toefl_itp/use).

ETS Form 16573 • FB619R100 • Printed in U.S.A.

I.N. 770462

Copyright ©2012 by Educational Testing Service

Texcoco de Mora, Estado de México.

A 15 días del mes de julio del 2021

**COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

Por medio de la presente, me comprometo a entregar toda la documentación en físico correspondiente a los trámites de graduación en los 30 días después de que la Universidad Autónoma Chapingo abra sus instalaciones y en los respectivos lugares de entrega una vez que se reanuden las actividades presenciales en la UACH, o cuando lo consideren necesario.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE:



---

Franco Armando Guerrero Valencia

Estudiante de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola



**SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE EXAMEN**

**NOMBRE:**

Franco Armando Guerrero Valencia

**FECHA DE NACIMIENTO:** 12 de enero de 1993

**CURP:** GUVF930112HCSRLR02

**GENERACIÓN:** 2019-2020

**MATRÍCULA:** 1813001-3

**FECHA DE INGRESO:** 21 de enero 2019

**DIRECCIÓN, ESTADO, CODIGO POSTAL, TELÉFONO:** Adolfo López Mateos 10, Boyeros, Texcoco, México.

Código postal: 56263; Tel: 5522025230

E-mail: guerrerofranco066@gmail.com

**TITULO DE LA TESIS:** Avances biotecnológicos en *Capsicum* L.

**PROGRAMA:** Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola

**LUGAR DE TRABAJO Y TELEFONO:**

--

**JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Datos	Presidente	Asesor	Asesor
Grado Y Nombres Completos	Dr. José Luis Rodríguez de la O	Dr. José Óscar Mascorro Gallardo	Dr. Mario Pérez Grajales
RFC	ROOL540614CCA	MAGO5705116X9	PEGM650820GR8
Cedula Profesional Del Grado Que Corresponde	3308079	3242946	5146971
Teléfono	5554348377	5959570508	5611696288
E-Mail	<a href="mailto:jlrdeiao@gmail.com">jlrdeiao@gmail.com</a>	<a href="mailto:jomg2013@gmail.com">jomg2013@gmail.com</a>	<a href="mailto:perezgm7@yahoo.com.mx">perezgm7@yahoo.com.mx</a>
Procedencia	Universidad Autónoma Chapingo	Universidad Autónoma Chapingo	Universidad Autónoma Chapingo

Chapingo, Méx., a 15 de julio de 2021.

Vo.Bo.

**DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO**  
**COORDINADOR DE ESTUDIOS DE POSTGRADO DE FITOTECNIA**  
**Y DEL INSTITUTO DE HORTICULTURA**

**ACUERDO DEL C. DIRECTOR ACADÉMICO**

En virtud de haber sido satisfechos todos los requisitos que establece el Reglamento General de Posgrado en vigor, esta Dirección tiene a bien conceder el **EXAMEN DE GRADO** al C.

**FRANCO ARMANDO GUERRERO VALENCIA**

De la Maestría en Ciencias en "**Biotecnología Agrícola**", para el 21 de julio de 2021 a las 12:00 horas con el siguiente Jurado:

<b>PRESIDENTE</b>	<b>DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O</b>
<b>ASESOR:</b>	<b>DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO</b>
<b>ASESOR:</b>	<b>DR. MARIO PÉREZ GRAJALES</b>

**CHAPINGO, MÉX., A 16 de julio de 2021**

**A T E N T A M E N T E**  
**"ENSEÑAR LA EXPLOTACIÓN**  
**DE LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"**  
**EL DIRECTOR GENERAL ACADÉMICO**

**DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS**

**ACL\***

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO  
DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
REALIZACIÓN DE EXAMEN DE GRADO

FORMA RE-EG

AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR EXAMEN DE GRADO

En virtud de que el **C. Franco Armando Guerrero Valencia** ha satisfecho todos los requisitos que establece la normatividad universitaria para el caso, y el mismo lo ha solicitado, la Dirección General Académica emite el acuerdo siguiente:

SE LE AUTORIZA LA REALIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO DE: **MAESTRO EN CIENCIAS**

Lugar: Aula Virtual Z ID: 81832027374, Posgrado de Fitotecnia. Fecha: 21 de julio de 2021. Hora: 12:00 horas

Programa: **BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

Nombre de la tesis **“AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum L.*”**

Con el siguiente Jurado:

Presidente:	<b>DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O</b>
Asesor.	<b>DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO</b>
Asesor.	<b>DR. MARIO PÉREZ GRAJALES</b>

Atentamente, el Director General Académico

**DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS**

Nombre

Firma

16 de julio de 2021.

Fecha

**El sustentante deberá entregar los ejemplares de la tesis correspondiente, antes del examen de grado.**

**Nota: Esta autorización tiene una vigencia de 10 días hábiles a partir de la fecha de emisión.**

ACTA DEL EXAMEN AUTORIZADO

Los miembros del jurado conocieron con anticipación la tesis y la aprobaron.

El Presidente del jurado instaló el mismo, con la sanción favorable del Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado correspondiente.

Después de realizado el examen, el jurado deliberó llegando al dictamen siguiente:

“ \_\_\_\_\_.”

El examen se realizó el día 21 de julio de 2021, en el recinto académico: Aula Virtual Z ID: 81832027374 del Posgrado de Fitotecnia a las 12:00 horas.

Los integrantes del jurado avalan lo asentado mediante su firma en dos tantos y el Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado correspondiente sanciona favorablemente el proceso.

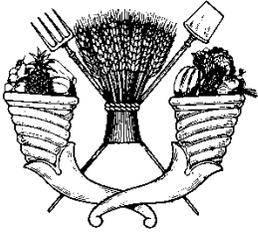
Presidente:	<b>DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O</b>	Firma:
-------------	--	--------

Asesor:	<b>DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO</b>	Firma:
---------	---	--------

Asesor:	<b>DR. MARIO PÉREZ GRAJALES</b>	Firma:
---------	---------------------------------	--------

Coordinador del Programa:	<b>DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO</b>	Firma:
---------------------------	---	--------

**Notas: Es imprescindible entregar esta acta a Exámenes Profesionales para dar por concluido el proceso.  
El segundo tanto de ésta, es para el interesado.**



"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

# Universidad Autónoma Chapingo

Dirección General de Investigación y Posgrado  
Coordinación General de Estudios de Posgrado

---

Chapingo, México, 16 de julio de 2021

**M. C. GILBERTO DAVID VELAZQUEZ CASTRO**  
JEFE DEL DPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
P R E S E N T E

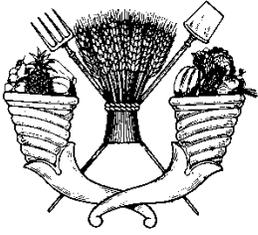
Me permito informarle que el C. **Franco Armando Guerrero Valencia** de la **Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola** concluyó satisfactoriamente su plan de estudios y elaboró la tesis "**AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN *Capsicum L.***". Esta tesis y su jurado cumplen con lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado y está libre de plagio. Anexo los documentos requeridos para dar trámite a la realización del examen de grado correspondiente

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
"ENSEÑAR LA EXPLOTACIÓN DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

Dr. Maximino Huerta Bravo  
Coordinador General de Estudios de Posgrado  
Universidad Autónoma Chapingo





"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

# Universidad Autónoma Chapingo

Dirección General de Investigación y Posgrado  
Coordinación General de Estudios de Posgrado

No. Oficio: 116/2021

Asunto: Solicitud autorización examen de grado

*Chapingo, México, 16 de julio de 2021*

**DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS**  
**DIRECTOR GENERAL ACADÉMICO**  
**PRESENTE**

Por medio del presente, solicito a usted de la manera más atenta autorizar el Examen de Grado de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola del **C. Franco Armando Guerrero Valencia** para el día **21 de julio de 2021**, ya que ha cumplido con todos los requisitos establecidos en el Reglamento General de Estudios de Posgrado.

Estoy anexando el expediente de la persona antes indicada.

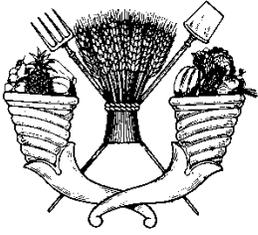
Agradeciendo de antemano su atención al presente, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**EL COORDINADOR GENERAL**

Dr. Maximino Huerta Bravo



C.c.p. Dr. José Oscar Mascorro Gallardo, Coordinador del Posgrado de Fitotecnia. Presente.



"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE  
LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"

# Universidad Autónoma Chapingo

*Dirección General de Investigación y Posgrado  
Coordinación General de Estudios de Posgrado*

**Asunto:** Solicitud de prórroga para examen de grado

*Chapingo, México, 16 de julio de 2021*

**DR. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS  
DIRECTOR GENERAL ACADÉMICO  
PRESENTE**

Considerando que no se cumplió con el Artículo 53 del Reglamento General de Estudios de Posgrado, por este medio solicito a usted de la manera más atenta considerar una prórroga para la presentación del examen de grado el 21 de julio del año en curso del C. **Franco Armando Guerrero Valencia**, alumno del Programa **Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola**.

Atentamente

**Maximino Huerta Bravo**  
Coordinador General de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. José Oscar Mascorro Gallardo , Coordinador del Posgrado de Fitotecnia. Presente.  
C.c.p. Alumno Franco Armando Guerrero Valencia. Presente.