

---

Implementación de un protocolo de cultivo de tejidos para la propagación de chile mirasol (*Capsicum annuum*) e identificación de genes asociados a la producción de semilla

---

Adriana María Gil Herrera



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Implementación de un protocolo de cultivo de tejidos  
para la propagación de chile mirasol (*Capsicum  
annuum*) e identificación de genes asociados a la  
producción de semilla**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Adriana María Gil Herrera  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,  
2024



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Implementación de un protocolo de cultivo de tejidos  
para la propagación de chile mirasol (*Capsicum  
annuum*) e identificación de genes asociados a la  
producción de semilla**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por  
Adriana María Gil Herrera  
para optar al grado académico de Licenciada en Bioquímica y  
Microbiología

Guatemala,  
2024



Vo.Bo.:

(f)   
Msc. Mariafernanda Alarcón Méndez

Tribunal Examinador:

(f)   
Msc. Mariafernanda Alarcón Méndez

(f)   
Msc. Martha Patricia Herrera Gonzalez

(f)   
PhD. Krisztina Rios-Gonzalez

Fecha de aprobación del examen de graduación: Guatemala, 29 de enero de 2024.

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones involucradas en este trabajo de graduación, en especial quiero agradecer a:

A mis papás, porque sin ellos nada de esto habría sido posible. A mis hermanas por siempre escucharme y alentarme. A toda mi familia por estar a mi lado, apoyandome y dandome cariño. A mis amigos, por alegrarme los días.

A Mariafernanda Alarcón, asesora de este trabajo de graduación, por todo el apoyo, guía y acompañamiento desde el inicio del proyecto.

A Patricia Herrera, por su apoyo constante durante todo el proyecto, estando siempre dispuesta a resolver mis dudas.

Al Laboratorio de Protección Vegetal, por todo el material brindado, así como el apoyo de todas las personas que pertenecen a este centro de estudios.

Al doctor Takahiro Maki, por amablemente contestar mi correo y enviarme las secuencias que necesitaba para realizar los análisis genéticos.

A la doctora Ríos y a la doctora Pennington, por haber sido mis mentoras durante estos cinco años de carrera, brindando consejos, apoyandome en los distintos retos y oportunidades que se me presentaron durante mis estudios.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todas las profesoras y profesores que he tenido a lo largo de mi vida, sin duda aprendí valiosas lecciones de cada uno.

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Prefacio</b>  | <b>III</b>  |
| <b>Lista de figuras</b>  | <b>VI</b>   |
| <b>Lista de cuadros</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>Listado de abreviaturas</b>   | <b>VIII</b> |
| <b>Resumen</b>   | <b>IX</b>   |
| <b>I. Introducción</b>   | <b>1</b>    |
| <b>II. Objetivos</b>   | <b>2</b>    |
| A.    Objetivo general . . . . .   | 2           |
| B.    Objetivos específicos . . . . .  | 2           |
| <b>III. Justificación</b>  | <b>3</b>    |
| <b>IV. Marco teórico</b>   | <b>5</b>    |
| A.    Agricultura en Guatemala . . . . .   | 5           |
| 1.    Agricultura . . . . .  | 5           |
| 2.    Especies nativas . . . . .   | 5           |
| 3.    Comercio . . . . .   | 6           |
| B.    Importancia del chile en mesoamérica . . . . .                                 | 6           |
| 1.    Chiles <i>Capsicum annuum</i> . . . . .  | 7           |
| 2.    Chile mirasol . . . . .  | 7           |
| C.    Cultivo <i>in vitro</i> de plantas . . . . .                                   | 8           |
| 1.    Cultivo de tejidos . . . . .   | 8           |
| 2.    Hormonas en cultivo de tejidos . . . . .                                       | 10          |
| D.    Genética de <i>Capsicum annuum</i> . . . . .                                   | 11          |
| 1.    Genes asociados a la producción de semilla de <i>Capsicum annuum</i> . . . . . | 12          |
| E.    Análisis de genoma . . . . .   | 12          |
| 1.    Extracción de ADN . . . . .  | 13          |
| 2.    Librerías genómicas . . . . .  | 13          |
| <b>V. Antecedentes</b>   | <b>15</b>   |
| A.    Cultivo de tejidos en <i>Capsicum annuum</i> . . . . .                         | 15          |
| B.    Genes asociados a la producción de semillas . . . . .                          | 15          |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>VI. Metodología</b>   | <b>17</b> |
| A. Diseño y enfoque . . . . .  | 17        |
| 1. Diseño, enfoque y tipo de investigación . . . . .   | 17        |
| 2. Población y muestra . . . . .   | 17        |
| 3. Criterios de inclusión y exclusión . . . . .  | 17        |
| 4. Variables . . . . .   | 17        |
| 5. Hipótesis . . . . .   | 18        |
| B. Metodología . . . . .   | 18        |
| 1. Cultivo de chile mirasol a partir de semillas . . . . .                                     | 18        |
| 2. Cultivo de tejidos por medio de hojas de chile mirasol . . . . .                            | 20        |
| 3. Amplificación de genes asociados a la producción de semilla . . . . .                       | 22        |
| 4. Análisis de datos . . . . .   | 24        |
| <b>VII. Resultados</b>   | <b>25</b> |
| A. Cultivo de tejidos por medio de hojas de chile mirasol . . . . .                            | 25        |
| 1. Siembra de semillas en medio de cultivo . . . . .   | 25        |
| 2. Desinfección de explante . . . . .  | 26        |
| 3. Efectividad de las fitohormonas en la inducción de callo en los medios de cultivo . . . . . | 27        |
| B. Resultados de amplificación genética . . . . .  | 30        |
| 1. Detección de genes por PCR . . . . .  | 30        |
| 2. Validación de gen <i>tn-1</i> por PAGE . . . . .  | 32        |
| <b>VIII. Discusión de resultados</b>   | <b>33</b> |
| A. Cultivo de tejidos por medio de hojas de chile mirasol . . . . .                            | 33        |
| 1. Siembra de semillas en medio de cultivo . . . . .   | 33        |
| 2. Desinfección de explante . . . . .  | 33        |
| 3. Efectividad de las fitohormonas en la inducción de callo en los medios de cultivo . . . . . | 34        |
| B. Resultados de amplificación genética . . . . .  | 35        |
| 1. Detección de genes por PCR . . . . .  | 35        |
| 2. Validación de gen <i>tn-1</i> por PAGE . . . . .  | 35        |
| 3. Implicaciones de la presencia de los genes en el chile mirasol . . . . .                    | 36        |
| <b>IX. Conclusiones</b>  | <b>37</b> |
| <b>X. Recomendaciones</b>  | <b>38</b> |
| <b>XI. Referencias</b>   | <b>39</b> |
| . . . . .  | 39        |
| <b>XII. Anexos</b>   | <b>45</b> |
| A. Anexo I . . . . .   | 45        |
| 1. POE I: Preparación de medios de cultivo con distintas hormonas para tratamientos . . . . .  | 45        |
| B. Anexo II . . . . .  | 49        |
| 1. POE II: Desinfección, siembra y cuidado de semilla de chile mirasol . . . . .               | 49        |
| C. Anexo III . . . . .   | 52        |
| 1. POE III: Desinfección y siembra de explantes de hojas de chile mirasol . . . . .            | 52        |
| D. Anexo IV . . . . .  | 56        |
| 1. POE IV: Medición y enraizamiento de callos . . . . .  | 56        |
| E. Anexo V . . . . .   | 60        |
| 1. POE V: Extracción de ADN y realización de PCR . . . . .                                     | 60        |
| F. Anexo VI . . . . .  | 65        |
| 1. POE VI: Electroforesis en geles de poliacrilamida de 10cm . . . . .                         | 65        |
| G. Anexo VII . . . . .   | 70        |
| 1. Datos brutos . . . . .  | 70        |

---

## Lista de figuras

---

|   |    |
|---|----|
| IV.1. Mapa en donde se muestra el altiplano guatemalteco . . . . .                              | 6  |
| IV.2. Figura esquemática de los tres tipos de cultivo <i>in vitro</i> . . . . .                 | 9  |
| VI.1. Plantas de chile mirasol . . . . .  | 20 |
| VI.2. Cajas con explantes de chile mirasol . . . . .  | 21 |
| VII.1 Resultado de siembra de semillas . . . . .  | 25 |
| VII.2 Ejemplo de contaminación por hongo . . . . .  | 26 |
| VII.3 Comparación entre cajas con fungicida y sin fungicida . . . . .                           | 27 |
| VII.4 Cajas con callo . . . . .   | 27 |
| VII.5 Callos crecidos de distintos tratamientos . . . . .                                       | 28 |
| VII.6 Efecto del tratamiento sobre la inducción de callo . . . . .                              | 30 |
| VII.7 Gel de agarosa con los productos de PCR para el gen <i>tn-1</i> y <i>CaCKI1</i> . . . . . | 31 |
| VII.8 Gel de agarosa con productos para gen <i>tn-1</i> . . . . .                               | 32 |
| VII.9 Gel de acrilamida con productos para gen <i>tn-1</i> . . . . .                            | 32 |
| XII.1 Amplificación <i>in silico</i> del gen <i>CaCKI1</i> . . . . .                            | 70 |
| XII.2 Amplificación <i>in silico</i> del gen <i>tn-1</i> . . . . .                              | 70 |



---

## Lista de cuadros

---

|   |    |
|---|----|
| VI.1. Descripción de variables . . . . .  | 18 |
| VI.2. Concentraciones de fitohormonas en cada medio de cultivo . . . . .  | 21 |
| VI.3. Concentraciones y reactivos utilizados para realizar Mastermix para la PCR . . . . .                                    | 23 |
| VII.1. Análisis de Varianza . . . . .   | 29 |
| VII.2. Comparaciones por parejas de Tukey . . . . .   | 29 |
| VII.3. Pureza y concentración de la muestra de ADN . . . . .  | 30 |
| XII.1. Concentraciones y volúmenes de fitohormonas a utilizar para un (1) litro de medio de cultivo por tratamiento . . . . . | 49 |
| XII.2. Master mix para PCR para 25 $\mu$ L por reacción . . . . .   | 64 |
| XII.3. Datos sin analizar sobre inducción de callo en el medio . . . . .  | 71 |
| XII.4. Datos sin analizar sobre inducción de callo en el medio segunda parte . . . . .  | 72 |
| XII.5. Datos sin analizar sobre inducción de callo en el medio tercera parte . . . . .  | 73 |

---

## Abreviaturas

---

ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ANA: Ácido 1-naftalenacético  
BSA: Análisis segregante masivo  
CAPS: Secuencia polimórfica amplificada escindida  
EtOH: Etanol  
GL: Grados de libertad total  
Kin: Kinetina  
MC: Media de los cuadrados  
Medio MS: Medio de Murishage y Skoog  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
SC: Suma de cuadrados  
SNP: Polimorfismo de nucleótido único  
spp.: Especies  
WT: Silvestre  
2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

El objetivo de este estudio fue diseñar un protocolo para la propagación de chile mirasol (*Capsicum annuum*) por medio de cultivo *in vitro* de tejidos e identificar genes asociados a la producción de semillas. Esto se realizó probando medios de cultivos con distintas concentraciones de fitohormonas, en donde por cada uno se colocaron cuatro explantes de hoja de chile mirasol previamente desinfectados. Luego de al menos 40 días se observaron las magentas con los explantes para determinar la cantidad de callos inducidos. Los explantes se contaron y por medio de un ANOVA y una comparación de medias de Tukey se determinó que el tratamiento 3, con 2.0mg/L de 2,4-D y 0.5mg/L de Kin fue significativamente mejor para la inducción de callos que el resto de tratamientos probados. La evaluación de genes asociados a la producción de semilla se realizó por medio de la amplificación de los genes *tn-1* y *CaCKII* con los oligonucleótidos presentados en la literatura. Se lograron amplificar los fragmentos esperados, por lo que hay una alta probabilidad que los genes no mutados se encuentren en la variedad de chile mirasol sembrado en Guatemala. Se recomienda secuenciar los fragmentos obtenidos para asegurar que los productos obtenidos son las secuencias de ADN buscadas. Se debe aclarar que fue un estudio exploratorio, por lo que hay un número pequeño de repeticiones durante el experimento.

En Guatemala la agricultura juega un papel importante en la economía del país, siendo una fuente de empleo importante para muchas personas, principalmente pertenecientes a comunidades rurales e indígenas. Por su ubicación geográfica, la región mesoamericana tiene una alta diversidad en su flora y fauna, en donde también se comparten tradiciones, historia y agricultura desde tiempos precolombinos. Entre los cultivos nativos se encuentra el chile (*Capsicum annuum*), el cual ha sido utilizado en la cocina y en la medicina. Actualmente hay un gran interés a nivel internacional por el chile pimienta, por sus múltiples usos en ensaladas y cocina de distintas índoles. Lastimosamente este interés no se ha expandido al resto de chiles mesoamericanos nativos.

En este estudio se busca conocer más sobre el chile mirasol, mejor conocido como chile guaque, el cual se utiliza en la cocina guatemalteca principalmente en su forma seca. Es un elemento básico para la cocina tradicional, al encontrarse en platillos como los tamales y el pepián. A pesar de ser tan importante para dar sabor a las comidas, se siembra poco y se estudia aún menos. La siembra en Guatemala se da principalmente en el área de Chimaltenango y Sololá. La información sobre el chile mirasol es limitada, siendo el líder tanto en producción como en investigación sobre este tema México, y aún así no hay información suficiente acerca de la genética y otras formas de cultivo de este chile.

Por lo presentado anteriormente en este estudio se buscó desarrollar un proceso estandarizado para el cultivo de chile mirasol por medio de cultivo de tejido. Con lo mismo se espera que sea más fácil realizar investigación en este chile, al ya tener un protocolo claro de como puede manejarse y generar callo en un ambiente controlado de laboratorio. Al mismo tiempo se quiso entender más sobre la genética del chile, observando por medio de PCR si el chile mirasol posee los genes *tn-1* y *CaCK11* no mutados. Estos genes al mutar han sido identificados por generar un fruto sin semilla. Al observar que los genes se encuentran en la planta de chile mirasol, se podría comenzar un proyecto futuro para editar genéticamente el chile y obtener chiles sin semilla. Con este último punto se ve de nuevo la importancia del cultivo de tejidos, ya que brindará una forma de propagación del chile sin necesidad de poseer semillas.

### A. Objetivo general

Diseñar un protocolo para la propagación del chile mirasol (*Capsicum annuum*) por medio de cultivo *in vitro* de tejidos e identificar genes asociados a la producción de semillas.

### B. Objetivos específicos

- Elaborar un protocolo de cultivo de tejidos utilizando micropropagación por callogénesis para la diseminación del chile mirasol.
- Evaluar distintos tratamientos de fitohormonas en su efectividad para aumentar la cantidad de callos por explante.
- Identificar en la literatura genes asociados a la producción de semilla en *C. annuum*.
- Verificar si los genes identificados que se ha visto están asociados a la producción de semilla en *C. annuum* se encuentran en el chile mirasol.



---

## Justificación

---

En Guatemala, la agricultura juega un papel importante en la economía, al proveer empleo a un 40 % de la población guatemalteca (IFAD, 2011). Gracias a la ubicación geográfica del país, se ha dado una gran diversificación y domesticación genética de la vegetación nativa (Martínez, 1996). Tomando esto en cuenta, es importante promover el desarrollo e investigación en la agricultura guatemalteca, al ser un pilar no solamente económico, sino también cultural. En el área mesoamericana, las sociedades precolombinas compartieron entre ellos sus tradiciones, historia y agricultura, habiendo evidencia de al menos 80 especies nativas que se han seguido cultivando (Miller y Schaal, 2005). Entre estos cultivos nativos se encuentra el chile (*Capsicum annuum*), el cual ha sido utilizado tanto en la cocina como para usos medicinales (Swapan, A K M Mominul, y A K M Aminul, 2017). En Guatemala el principal chile que se produce es el chile pimiento, el cual pertenece a *C. annuum*, siendo producido principalmente en los departamentos de Jutiapa, Baja Verapaz, Chiquimula, Alta Verapaz y Sacatepéquez (MAGA, 2016). Al ser este un chile sumamente utilizado a nivel internacional, hay información acerca del mismo, y existe interés en ampliar las investigaciones relacionadas a variedades de chiles nativos de mesoamérica pertenecientes a *C. annuum*, en este trabajo de tesis se utilizará el chile mirasol.

El chile mirasol es un elemento común de las comidas mesoamericanas, siendo principalmente utilizado en su forma seca, el cual se conoce como chile gUAQUE. En la cocina tradicional es utilizado en platos como tamales y pepián, proveyendo no solo sabor, pero también un color achocolatado a los platos. En Guatemala el chile mirasol es de suma importancia para la fiesta del *Corpus cristi*, ya que en esta festividad uno de los platillos principales es el pepián, en donde se tiende a utilizar este chile para prepararlos (Lima Montenegro, 2008) y (Dardón, 2004). La siembra del chile mirasol en Guatemala se da principalmente en el altiplano central de Guatemala, en San Andrés Iztapa, Tecpán, Santa Polonia, Patzún y Patzicía en Chimaltenango y San Andrés Semetabaj y Godinez en Sololá (Lima Montenegro, 2008). La información acerca del chile mirasol es limitada, aunque sí se ha realizado investigación al respecto del mismo, principalmente con relación a su ubicación geográfica, composición química y patógenos. A pesar de ser un chile que se encuentra en mesoamérica, la mayor parte de investigaciones se han realizado en México. Para la producción de chile, el sistema tradicional de producción tiene una baja sostenibilidad, ya que hay múltiples operaciones aplicadas en la plantación durante todo el ciclo del cultivo (Amador-Ramírez, Velásquez-Valle, y Sánchez-Toledano, 2013). En México el chile mirasol es de los más cultivados en la región, existiendo un déficit de semilla requerida para cubrir la demanda del mercado, lo que lleva a los agricultores a comprar semillas no certificadas y/o de mala calidad, ocasionando altos costos de producción, baja calidad genética y riesgo de obtener bajos rendimientos y mala calidad del fruto (Cabañas, Galindo,

Reveles, y Bravo, 2006). Al desarrollar un proceso estandarizado para el cultivo de chile mirasol por medio de cultivo de tejidos se puede apoyar a solucionar la problemática de mala calidad de semilla a la hora de la compra y siembra. La producción de productos sin semillas ha sido un tema de gran importancia social y económica, como se observa en la producción de uva de mesa sin semilla. Esto se debe principalmente a la exportación hacia el mercado norteamericano, el cual busca ser más diverso para los consumidores, teniendo a disponibilidad amplias gamas de variedades que satisfagan al mercado en precio y calidad (Tiznado Hernández y cols., 2015). En los chiles las semillas poseen capsaicinoides, que son un grupo de amidas ácidas derivadas de vainillilamina, estas suponen un papel de protección química para las semillas (Vásquez-Flota y cols., 2007). Los capsaicinoides es lo que da la sensación de picor al comer chile, y al estos encontrarse principalmente en la semilla, la producción de un chile que no contenga semillas supondría un chile menos picante, proveyendo así una opción más en el mercado para las personas que no disfrutan el picor en su comida. Se puede añadir que en los procesos de cocina, para preparar las salsas de tamal, pepián, mole, o hacer chiles rellenos, el primer paso es sacarle todas las semillas al chile, lo cual puede ser tedioso si se cocina en grandes cantidades, además de tomar en cuenta que las semillas del chile son pequeñas, por lo que es difícil quitarlas todas.

## A. Agricultura en Guatemala

### 1. Agricultura

La agricultura es una palabra ampliamente utilizada para denotar las formas en las cuales las plantas de cultivo y animales domésticos sostienen a la población al proporcionar alimentos y otros productos. Esta incluye un espectro amplio de actividades, las cuales son parte integral de la agricultura y tienen sus propios términos descriptivos, como lo puede ser el cultivo, domesticación, agricultura, arboricultura y horticultura, así como formas de gestión ganadera, que puede ser la agricultura mixta de cultivos, pastoreo y ganadería (Harris y Fuller, 2014). En este estudio se utilizará el término agricultura de manera restringida al cultivo de cosechas, excluyendo la cría de animales domésticos.

En Guatemala la agricultura juega un papel importante en la economía del país, sosteniendo un quinto del PIB y proveyendo empleo a un 40 % de la población guatemalteca, siendo principalmente personas de comunidades rurales e indígenas quienes se encuentran en la fuerza laboral (IFAD, 2011). Aproximadamente un 70 % de la población empobrecida vive en áreas rurales, en donde la agricultura es la principal actividad de sustento, fuente de ingresos y alimento (Lopez-Ridaura y cols., 2019). Estas comunidades se encuentran concentradas principalmente en el altiplano occidental guatemalteco (Figura IV.1), en donde la agricultura es la estrategia más importante para obtener ingresos y así intentar lograr una seguridad alimentaria local (Lopez-Ridaura y cols., 2019).

### 2. Especies nativas

Guatemala tiene una diversidad genética a nivel vegetal por su ubicación geográfica, que ha permitido la diversificación y domesticación de las mismas. El germoplasma cultivado en Guatemala tiene dos fuentes de origen, las nativas que van a ser encontradas principalmente en los sistemas de agricultura tradicional, y los procedentes a otros centros de origen, como el Medio Oriente y el mediterráneo, que tienden a ser utilizados en una agricultura tecnificada, con cultivos como la arveja china y el guisante de nieve (Martinez, 1995) y (Méndez, Galluzzi, y Say, 2015). La forma en la que la FAO definió las especies nativas que más atención reciben en Guatemala fue tomando



Figura IV.1: Mapa en donde se muestra el altiplano guatemalteco

(Tendencia, bosques y medios de vida en el altiplano de Guatemala, s.f.)

las siguientes características: alimentario-nutricionales, agroindustriales, agronómicas, económicas y agroclimáticas. Entre los cultivos que reciben máxima atención se encuentran el aguacate (*Persea americana*), algodón (*Gossypium spp.*), arroz (*Oryza sativa*), banano (*Musa paradisiaca*), café (*Coffea arabica*), entre otros. Entre los cultivos que reciben una atención media se encuentran el cacao (*Theobroma*), cítricos, chile (*Capsicum spp.*), ajo (*Allium sativum*), entre otros. Por último algunos de los cultivos que reciben atención restringida y son cultivados a menor escala son , uva (*Vitis vinifera*), yuca (*Manihot esculenta*), mango (*Mangifera indica*), entre otros (Martinez, 1995). Las especies más importantes nativas se encuentra en maíz y el frijol, al constituir gran parte de la alimentación básica guatemalteca, a pesar de esto no se tienden a aprovechar las distintas especies silvestres de estos géneros, y por la eliminación de hábitats naturales, todas las especies nativas corren riesgos de extinción (Martinez, 1995).

### 3. Comercio

El comercio en la agricultura es sumamente importante, ya que un 40 % de la población depende de esta para sobrevivir (IFAD, 2011). En Guatemala las tierras están mal distribuidas para este propósito, ya que un 80 % de las tierras fértiles están controladas por menos del 5 % de la población, a pesar que se realizaron acuerdos luego del conflicto armado interno para cambiar la situación (Aguilar-Støen, Taylor, y Castellanos, 2016). Actualmente se realiza una exportación y siembra de cultivos no tradicionales, con el objetivo de potenciar la agricultura y la nutrición en el núcleo de las familias agricultoras, como cultivos no tradicionales se entienden aquellos que no forman parte de la dieta y agricultura local. Estas prácticas han sido orientadas principalmente como una estrategia de crecimiento para reducir la pobreza y combatir la inseguridad alimentaria, prometiendo con esto más empleos y crecimiento de los agricultores, logrando así una estrategia de ganancia tanto para el mercado internacional como para las familias (Méhot y Bennett, 2018). Junto a estas prácticas comerciales, en las que se incluye la siembra masiva de aceite de palma y caña de azúcar, se afecta la agricultura de pequeños campesinos y la biodiversidad nativa del país (Dürr, 2016).

## B. Importancia del chile en mesoamérica

El área definida como mesoamérica abarca desde la mitad meridional de México, Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador, Costa Rica y Nicaragua, es un área en donde las sociedades que

habitaron anteriormente no conformaban una misma unidad política, pero sí compartieron sus tradiciones e historia (Instituto nacional de antropología e historia (INAH), s.f.). Junto a la calabaza, maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), el chile (*Capsicum*) fue una base alimenticia para las culturas mesoamericanas, habiendo evidencias arqueológicas que el producto fue cultivado principalmente en regiones como Tehuacán, Puebla, Ocampo y Tamaulipas en México (Aguirre y Muñoz, 2015). Muchas de las especies que son originarias de Mesoamérica se han domesticado en el espacio geográfico que abarca desde el centro de México hasta el noroeste costarricense, en donde hay al menos 80 especies nativas que han sido cultivadas (Miller y Schaal, 2005). Actualmente el chile no solamente es importante por su uso en la cocina, sino también por sus distintos usos en la industria médica. A nivel nutricional el chile tiene grandes cantidades de vitaminas C, A, B6 y K, también minerales como lo son el calcio, magnesio, folato, potasio, tiamina, hierro, etc. La capsaicina, que es el principal componente bioactivo del chile, tiene usos farmacéuticos atribuidos al alivio del dolor, antiartríticas, antibacterianas, antiinflamatorias, antirinitis y analgésicas. Se ha visto que puede tener un papel como refuerzo de la inmunidad para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y obesidad (Swapan y cols., 2017).

La domesticación de *Capsicum* se dio principalmente en cinco especies: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz y Pav, siendo *C. annuum* el mayor cultivado a nivel mundial.

## 1. Chiles *Capsicum annuum*

### Distribución geográfica

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae, subfamilia Solanoideae, en el grupo Capsiceae. Dentro de *Capsicum* se pueden encontrar 27 especies, de las cuales solamente 5 se encuentran domesticadas (Pickersgill, 1991). Las especies encontradas en el género *Capsicum* son originarias de América. La distribución precolombina se extendió probablemente desde el borde meridional de Estados Unidos a la zona templada cálida de Sudamérica (Aguirre y Muñoz, 2015). Actualmente se consumen mundialmente, siendo México considerado como uno de los centros más importantes de diversificación y domesticación de la especie *Capsicum annuum* (Laborde Cancino y Compadonico, 1984). Su consumo tuvo lugar principalmente en América, en donde en el año 1493 migró hacia Europa por los viajes de Cristóbal Colón. Gracias a esta migración, que luego se extendió por toda África y Asia, se ha diversificado masivamente, dando así nuevas variedades tradicionales adaptadas a zonas variadas, presentando al mismo tiempo una gran diversidad fenotípica (Ortega, 2020). A pesar de ser consumido a nivel mundial, la información de origen geográfico aún es poca, hasta ahora se ha observado que la península de Yucatán contiene una gran cantidad de haplotipos, algunos únicos, indicando que esta región fue importante para la domesticación, así como un centro de diversificación (Aguilar-Meléndez, Morrell, Roose, y Kim, 2009).

De los chiles en Mesoamérica, *Capsicum annuum*, es uno de los cinco tipos de chiles domesticados en las américas, siendo junto al maíz uno de los elementos principales de la dieta mesoamericana (Aguilar-Meléndez y cols., 2009).

## 2. Chile mirasol

El chile mirasol es una variedad de *C. annuum*, convirtiéndolo en un elemento común en las comidas mesoamericanas. Es utilizando principalmente su forma seca, conocida como chile guajillo, guaque o huaque. Entre sus características morfológicas se encuentran tallo y hojas glabras, nudos verde púrpura, pedicelo en anthesis pendiente, cáliz con márgenes dentados y frutos con manchas negruzcas en el estado inmaduro, tomando un color rojo intenso a la hora de madurar (Lima Montenegro, 2008). Por su sabor delicado, el chile mirasol se utiliza en platillos con pollo, pescado, cerdo



y papas (Velásquez-Valle y cols., 2020). La composición química del chile ha sido estudiada, principalmente en respecto a su contenido de vitamina C, E, beta-caroteno y carotenoides (Conforti, Statti, y Menichini, 2007). México es el productor principal de chile mirasol, habiendo tenido una producción agrícola de 2,249 miles de toneladas de producto fresco en el 2007 (Crespo Ruiz, 2013). Entre los patógenos que atentan contra la producción del chile mirasol se encuentran el “beet mild curly top virus” (BMCTV) y *Candidatus Phytoplasma trifolii* (Velásquez-Valle y cols., 2020).

## Chile mirasol en Guatemala

Se puede encontrar en las áreas del altiplano central de Guatemala, entre las localidades de San Andrés Iztapa, Tecpan, Santa Polonia, Patzún y Patzucía en Chimaltenango, y San Andrés Semetabaj y Godinez en Sololá (Lima Montenegro, 2008). A pesar de ser un chile que se encuentra en mesoamérica, la mayor parte de investigaciones se han realizado en México. Para la producción de chile, el sistema tradicional de producción tiene una baja sostenibilidad, ya que hay múltiples operaciones aplicadas en la plantación durante todo el ciclo del cultivo (Amador-Ramírez y cols., 2013). Entre el manejo primario se encuentra la aplicación de barbecho, rastreo, nivelación y surcado, para luego hacer remoción de surcos, escardas y deshierbes dependiendo el problema que se tenga con las malezas, además de todo el manejo secundario que se le va a dar a la planta (Amador-Ramírez y cols., 2013). En México el chile mirasol es de los más cultivados en la región, existiendo un déficit de semilla requerida para cubrir la demanda del mercado, lo que lleva a los agricultores a comprar semillas no certificadas y/o de mala calidad, ocasionando altos costos de producción, baja calidad genética y riesgo de obtener bajos rendimientos y mala calidad del fruto (Cabañas y cols., 2006).

Sus usos son principalmente en cocina tradicional, en platillos como tamales, pepián y mole por nombrar algunos. Usualmente se consume seco, en donde presenta una coloración achocolatada, en estado inmaduro se utiliza para la elaboración de chiles rellenos (Lima Montenegro, 2008). La gastronomía guatemalteca es importante para la población, al ser una actividad en donde las personas sienten que pueden unirse con sus familias, raíces y país. En Guatemala el calendario gastronómico está dictado principalmente por las fechas religiosas o festividades familiares, como lo son cumpleaños, Navidad, Semana Santa, entre otros. El chile mirasol es ampliamente utilizado en la preparación de chiles rellenos y pepián para conmemorar el *Corpus Cristi*, una festividad católica celebrada en varios puntos del país (Dardón, 2004). Esto es importante para la población, ya que las fiestas al encontrarse fuertemente relacionadas con la comida que se cocina y se consume en este tiempo, los ingredientes típicos, en este caso el chile mirasol, deben poder estar disponibles y con la calidad esperada para realizar los platillos.

## C. Cultivo *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* es un método aplicado para el crecimiento y desarrollo de las células, tejidos y órganos de una planta, utilizando un medio de cultivo nutritivo bajo condiciones estériles. Este método biotecnológico es considerado uno de los más prometedores y amigables ambientalmente. Como se puede observar en la Figura IV.2, hay tres formas principales de un cultivo *in vitro*, los cuales incluyen la organogénesis, rizogénesis y callogénesis (Norouzi, Hesami, Pepe, Dutta, y Jones, 2022).

### 1. Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos es una herramienta importante tanto para realizar estudios específicos, como también para su aplicación industrial. Los primeros cultivos de tejidos fueron realizados por el científico alemán Haberlandt en los inicios del siglo 20, desde ahí ha habido distintos científicos que

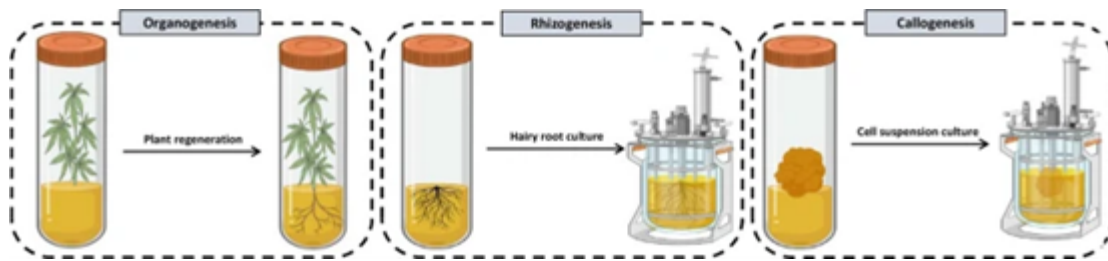


Figura IV.2: Figura esquemática de los tres tipos de cultivo *in vitro*.

(Norouzi y cols., 2022)

han desarrollado distintas técnicas para lograr lo que se conoce ahora. Gracias a este descubrimiento inicial, el cultivo de tejidos puede ser aplicado en múltiples disciplinas, entre las cuales se encuentra la modificación y mejora vegetal (Thorpe, 2007). Generalmente el cultivo de tejidos se divide en dos grupos, los cultivos semisólidos y los cultivos en medios líquidos. También pueden ser divididos dependiendo de la complejidad de los órganos que se están cultivando; sin importar la forma de división, siempre se deben tomar en cuenta aspectos generales relacionados con el explante, como lo son la asepsia, el medio de cultivo correcto y las condiciones en las que se debe incubar (Mroginski, Echenique, Rubinstein, Hopp, y Levitus, 2004). En el cultivo de tejidos se debe tomar en cuenta el comportamiento celular, así como la morfogénesis y patología de los mismos. Se han realizado estudios sobre la estructura y fisiología en las células quiescentes en los explantes, los cambios en la estructura celular asociados con la inducción de la división celular y las características del callo en desarrollo; los cuales se han llevado a cabo por medio de la microscopía óptica y electrónica (Thorpe, 2007).

Entre los aspectos estudiados desde el principio se tiene el aspecto nutricional. Los cultivos *in vitro* han sido útiles para lograr estudiar el metabolismo primario y secundario de las plantas, así como el poder obtener órganos intactos para estudiarlos. Gracias a estas técnicas se ha avanzado en la investigación acerca de metabolismos internos de la planta, como el metabolismo de carbohidratos y el fotosintético, permitiendo comprender de mejor manera el mundo vegetal (Thorpe, 2007). Al lograr comprender los mecanismos, se pueden luego extrapolar a la utilización industrial, como por ejemplo la producción de compuestos de interés comercial.

### Condiciones ideales de cultivos y trasplante

Para el cultivo de tejidos vegetales se deben tomar en cuenta los pasos y materiales a utilizar para que sea efectivo. Entre los medios más utilizados se encuentra el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), modificándolo según sea conveniente con sales y vitaminas B5 (Phillips y Garda, 2019). Existen otros medios de cultivo menos utilizados, como lo son el "Woody Plant Medium" y el "Driver and Kuniyuki Woody plant medium". Hay medios que se utilizan para aplicaciones más específicas, como lo es el Nitsch y Nitsch, usado para el cultivo de tabaco con el objetivo de producir plantas haploides, siendo un buen medio para inducir la androgénesis de otras plantas. Otro ejemplo es el medio Kao y Michayluk, el cual fue creado para el cultivo de protoplastos, pudiendo ser utilizados para la inducción de protoplastos de varias especies por su gran suplemento de B5, aminoácidos, otras vitaminas, ácidos orgánicos y azúcares (Phillips y Garda, 2019). Para las condiciones de incubación, los espacios deben tener un control de temperatura, poder variar la intensidad de luz, tomando en cuenta las ondas, control de fotoperíodos y en algunos casos control de humedad. La temperatura normalmente debe mantenerse constante dependiendo de la necesidad de la planta (entre 22 - 28°C), aunque en algunos casos necesitan de tratamientos de calor y frío (siendo 35° de calor y 4°C de frío los más comunes). Los períodos de luz tienden a ser de 16h, teniendo así 8h de oscuridad por día,

pero pueden ser ajustados acorde a la especie de interés (Phillips y Garda, 2019).

Dependiendo del crecimiento del callo, se puede definir cuándo se debe trasladar del medio de cultivo a un medio normal. Los callos, cultivos de proliferación de brotes y cultivos de enraizamiento en medios semisólidos son típicamente sub cultivados a intervalos de 3 a 4 semanas, este tiempo puede cambiar según el sistema de cultivo y las condiciones de incubación, pues podría llegar a ser un tiempo de hasta 8 semanas (Phillips y Garda, 2019).

### **Cultivo de *Capsicum annuum***

El cultivo del chile pimienta ha sido de suma importancia por su utilización como vegetal alrededor del mundo, el chile pimienta es la especie de *Capsicum annuum* que más se cultiva y sobre la que más se investiga por su valor comercial. Su cultivo debe ser cuidadoso, se da en un clima cálido o templado, la temperatura mínima para germinar y crecer es de 15°C, mientras que para florecer y fructificar esta debe ser mínimo de 18°C, siendo ideal una oscilación entre los 20 y 25°C. Es una planta exigente a la luz, principalmente en los primeros estadios de desarrollo y floración. La humedad debe mantenerse entre el 50 y 70 %, si es más elevada, se pueden desarrollar enfermedades en las partes aéreas de la planta, dificultando la fecundación; si la humedad es baja y coincide con altas temperaturas, la planta dejará caer las flores y/o frutos; mientras que una temperatura baja durante el desarrollo dará lugar a formación de flores con anomalías, pétalos curvados y formación de múltiples óvulos. El suelo debe ser profundo, suelto y rico en materia orgánica, con buen drenaje, ya que es una planta sensible a la asfixia radicular. Debe tener un pH que fluctúa entre 6,0 y 6,5 y con una salinidad con valores de <1,5 mS/cm de CE en el extracto saturado del suelo y < 1,0 mS/cm de CE en el agua de riego, valores CE muy altos pueden dar origen a semillas necróticas (Alvarez y Pino, 2018).

El primer cultivo celular exitoso de *C. annuum* fue reportado en china por Wang en 1973, desde ese momento se han realizado diversos estudios para determinar la forma más eficiente de realizar el cultivo celular (Irikova, Grozeva, y Rodeva, 2011). Entre los medios que se utilizan actualmente se encuentra principalmente el medio MS, el cual ha exhibido eficiencia a la hora de producir la planta haploide, y al utilizarlo de base se agregan distintos reguladores o aditivos para asegurar el crecimiento de las plantas, o como experimentación para observar cambios en el crecimiento. La fuente de carbono principal son comúnmente carbohidratos en una concentración del 3%, siendo la sacarosa la más común. Entre los reguladores más utilizados se encuentra la Kinetina, la cual cambia en concentraciones si se busca una embriogénesis o una callogénesis, también se han realizado pruebas combinando la kinetina con 6-benzyladenina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y ácido indol-3 acético. En cuestión de temperatura se ha observado que las temperaturas alrededor de 35°C proveen los mejores resultados para la producción (Irikova y cols., 2011).

## **2. Hormonas en cultivo de tejidos**

Entre las hormonas más utilizadas se encuentra la kinetina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 6-benzyladenina, ácido indol-3-acético, ácido 1 - naftalenacético, ácido abscisico y ácido giberélico (Irikova y cols., 2011) y (Jiménez, 2005). Para este estudio las hormonas que se utilizarán serán la kinetina (kin), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido 1 - naftalenacético (ANA).

### **Kinetina (Kin)**

La kinetina fue la primer citoquina descubierta como hormona en plantas, como un producto de degradación del ADN que promovía la división celular en plantas (Barciszewski, Massino, y Clark, 2007). La kinetina juega un rol importante en la activación de S6 quinasa en *Arabidopsis*, induciendo

la fosforilación de la proteína S6 ribosomal y la activación del cognato quinasa, la cual está regulada por fitohormonas (Barciszewski y cols., 2007). Esto es importante ya que las proteínas ribosomales son conocidas por tener distintas funciones dentro de la regulación del metabolismo celular, así como en la síntesis proteica (Y.-K. Kim y cols., 2014). La kinetina se utiliza en conjunto con 2,4-D para lograr medios eficientes en la inducción de callos, ayudando a la kinetina a estimular la división celular y el control de morfogénesis (Dalila, Jaafar, y Manaf, 2012).

#### **Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)**

El 2,4-D fue el primer herbicida sintético en ser creado a nivel comercial, siendo comúnmente utilizado como herbicida para hojas anchas. Es un herbicida que mata a las dicotiledóneas de manera selectiva sin afectar a las monocotiledóneas, imitando la auxina natural a un nivel molecular (Song, 2014). 2,4-D es estructuralmente y funcionalmente parecida a la auxina natural ácido-3-indol-acético (IAA), funcionando también como una auxina activa en planta. La razón por la que 2,4-D puede ser utilizado como herbicida es que a pesar que actúa y se ve como una auxina, las plantas no pueden metabolizarla (Song, 2014). Se ha observado que la presencia de 2,4-D promueve la inducción de callos en cultivo de tejidos en distintas especies de plantas (Tahir, Victor, y Abdulkadir, 2011), a pesar de su efecto para una proliferación celular rápida, se ha observado que la auxina debe removerse del medio luego de la generación del callo para que este pueda regenerarse de la mejor manera (Zheng y Konzak, 1999).

#### **Ácido 1-naftalenacético (ANA)**

El ANA es una hormona sintética de la familia de las auxinas, es muy similar al ácido indoleacético en plantas. Sus funciones son principalmente la estimulación de la división celular, elongación celular, elongación de brote, síntesis de ARN, permeabilidad de membrana y absorción de agua. ANA ha sido utilizado para lograr mejor calidad y cantidad de frutas en árboles de plantas, principalmente en Europa, Estados Unidos y Japón (Basuchaudhuri, 2016). ANA es activo en la generación de raíces, produciendo un crecimiento rápido de raíces cortas y gruesas (Lopez, 2017). Se debe observar la aplicación de ANA, ya que la aplicación puede afectar a la planta de manera positiva como suplemento, o interfiriendo con la síntesis, translación o inactivación de los niveles de hormonas naturales en la planta (Basuchaudhuri, 2016).

## **D. Genética de *Capsicum annuum***

*C. annuum* posee 12 cromosomas, con un tamaño de genoma de 3.2Gb (NCBI, 2017). Se han identificado nueve genes que afectan a la altura de la planta, cuatro tipos de fenotipos flácidos, así como genes responsables de los hábitos de las ramas, en donde se han observado genes que controlan el crecimiento y número de ramas en la misma, así como el gen supresor (Wang y Bosland, 2006). Se ha reportado que controlando la redondez de la fruta existe una relación entre los genes *A* y *O* de 6.5cM y afectando el color del fruto se encontró un gen en el cromosoma 3 (Wang y Bosland, 2006). Han encontrado al menos 20 genes responsables por una esterilidad masculina, encontrándose entre estos los genes *ms-3*, *ms-4*, *ms-6*, *ms-7*, y *ms-8*, siendo los más comunes a la hora de irradiar a la planta, además de expresarse principalmente en esterilidad del polen. En *C. annuum* el gen recesivo responsable por la esterilidad funcional es el *fms*. En resistencia a enfermedades, se ha observado que posee resistencia contra la bacteria del punto de hoja, contra antracnosis, nemátodos (*Meloidogyne acrita*) y tiene el gen *Bzt* que es responsable de la tolerancia contra el bentazon (Wang y Bosland, 2006).

## 1. Genes asociados a la producción de semilla de *Capsicum annuum*

La producción de chile pimiento sin semillas se ha dado por mutagénesis inducida utilizando metanosulfonato de etilo (EMS), al ser un mutagénico que induce mutaciones puntuales al ser utilizado en puntos específicos del desarrollo (Alcantara, Bosland, y Smith, 1996). Una forma utilizada para obtener híbridos en la producción de semillas es al controlar el gen recesivo nuclear *ms*, el cual está caracterizado por causar esterilidad masculina. En este caso se puede tener tanto la esterilidad masculina génica (EMG) y la esterilidad masculina citoplásmica (EMC). Los mutantes con EMC son sensibles a la temperatura y son más inestables, dando así líneas que producen poco polen cuando la temperatura baja de las ideales, por lo que su utilización en la industria es difícil, ya que las interacciones entre los genes y la temperatura son fuertes. Tomando en cuenta esto, es difícil sacar provecho de manera industrial de la EMC, por la sensibilidad que estos tienen y el resultado distinto que se puede obtener dependiendo del ambiente en el que se encuentre la planta (Swamy, Hedau, G.v., Kant, y Pattanayak, 2017). El gen *ms-12* es un gen nuclear de esterilización masculina que se ha utilizado para lograr híbridos en semillas. El gen *ms10* es uno de los que controla la esterilidad masculina, pero es complicado incorporarlo a la hora de querer realizar un híbrido, en el estudio de Aulakh (2016) identificaron los marcadores SRR AVRDC-PP12 and AVRDC\_MD997\* que se encuentran relacionados con el gen *ms10* (Aulakh, Dhaliwal, Jindal, Schafleitner, y Singh, 2016).

Tanaka y otros, 2019 caracterizaron e identificaron un pimiento *C. annuum* mutante sin semillas, el cual fue denominado como *tn-1*. El chile que utilizaron fue el Yume-matsuri, un chile ornamental japonés, el cual mutaron al tratarlo con metanosulfonato de etilo (Tanaka y cols., 2021). Identificaron el gen mutado responsable de que no haya semillas en el fruto por medio de un marcador CAPS, que realizaron basándose en un SNP de una región cercana identificada previamente por un BSA. El producto luego fue digerido con enzimas de restricción, específicamente *Hinf1*, en donde con el corte, se pudo observar en donde se encontraba la mutación, así como si la planta mutada era heterocigota u homocigota para el gen (Tanaka y cols., 2021).

Luego en estudios posteriores, Maki y otros en el 2023 identificaron que la mutación de *CaCKII* causa pimientos sin semilla en el chile Yume-matsuri. El cual podría ser la mutación que cause *tn-1*. El gen *CaCKII* no mutado es el que codifica para la histidina kinasa involucrada en el desarrollo del gameto femenino (Maki y cols., 2023). En el análisis observaron que hay una inserción de 3pb en el gen candidato, en donde el chile WT luego de la amplificación el fragmento presentó 96pb y el mutado el fragmento midió 99pb (Maki y cols., 2023).

## E. Análisis de genoma

El genoma es el set completo de ADN, en donde se encuentra toda la información de los organismos. Al realizar un análisis del genoma, el objetivo es la identificación, medición y comparación de las características genómicas, como lo es el ADN, la variación estructural del mismo, la expresión de genes, la regulación o mal funcionamiento de un elemento desde un punto genómico (Nature portfolio, 2023). Desde su inicio en 1990 el análisis del genoma es un acercamiento revolucionario en el estudio de la estructura y función de los genes de un organismo. Actualmente las técnicas de secuenciación se han refinado, existiendo tecnologías como la secuenciación de nueva generación, lo que ha hecho posible el secuenciar, construir y analizar el genoma de diversas plantas. Gracias a este progreso ahora hay aún más modelos de organismos, que apoyan a los estudios ecológicos, económicos y de agricultura. No se debe olvidar que la parte más importante y más difícil del análisis genómico es tener resultados interpretados, ya que los datos crudos no son comprensibles ni utilizables fácilmente (Gülsüm, 2016).

## 1. Extracción de ADN

La extracción de ADN es el punto de partida para cualquier investigación que se lleve a cabo en la biología molecular. La primera extracción de ADN fue realizada por Friedrich Mieser en 1869, cuando accidentalmente purificó ADN del núcleo mientras investigaba las proteínas de los leucocitos (Dahm, 2005). Los pasos en los que consiste una extracción de ADN exitosa son los siguientes: Primero se debe dar la disrupción del citoplasma y membranas nucleares, luego se debe separar y purificar el ADN de los otros componentes del lisado celular, como lo son los lípidos, proteínas y otros ácidos nucleicos, y por último se debe concentrar y purificar el ADN. Al extraer el ADN se debe estar seguro que las proporciones y método de extracción permitirán utilizar el resultado para el resto de las aplicaciones que se le quiera dar (Dairawan y Shetty, 2020).

### Análisis de PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de laboratorio que de manera rápida va a producir millones de copias de un segmento específico del ADN para que luego pueda ser estudiado en mayor detalle. Para esto se utilizan pequeños fragmentos de ADN realizados sintéticamente llamados primers u oligonucleótidos, los cuales indicarán a la polimerasa el segmento que se desea amplificar (Smith, 2023). Otros componentes claves de la PCR son las enzimas, los desoxirribonucleótidos trifosfatados o dNTPs, magnesio, una solución amortiguadora y agua. La PCR tiene tres etapas principales, las cuales son desnaturalización, hibridación y extensión, las cuales se realizan a distintas temperaturas y por distintos tiempos. Todo el proceso se realiza en un termociclador (Tamay de Dios, Ibarra, y Velasquillo, 2013). Últimamente han surgido nuevas técnicas y tecnologías para realizar una PCR, como la qPCR o la PCR en tiempo real, las cuales se utilizan dependiendo el objetivo que se tenga en el experimento. En el caso de una PCR convencional, el resultado se podrá observar en una electroforesis para luego continuar con el estudio, el cuál puede ser un análisis de alelos por tamaño de la banda, o una secuenciación al cortar el pedazo de interés del gel (Peña-Castro, Gregorio-Ramírez, y Barrera-Figueroa, 2013).

## 2. Librerías genómicas

Una librería genómica es un set de clones de ADN que idealmente contienen el contenido completo de ADN del genoma para el cual fueron creadas (Nierman y Feldblyum, 2001). La construcción de librerías permite realizar una análisis crítico de la función de los genes, así como detectarlos y relacionarlos con genes de distintas fuentes. Las librerías genómicas son utilizadas para ensamblar la gran cantidad de secuencias e información que produce la secuenciación de nueva generación; también pueden ser utilizadas para descubrir y optimizar procesos bioquímicos (Godiska, 2013).

### Secuenciación

La secuenciación de ADN consiste en determinar el orden correcto de las pares de bases que componen a el ADN, con esta información se puede analizar un organismo, así como sus funciones regulatorias y mutaciones (NIH, 2019). La primera secuenciación fue introducida por Sanger en 1975, al publicar un método rápido para determinar secuencias de ADN mediante síntesis cebada con ADN polimerasa. En 1977 se publicaron dos artículos, la técnica de secuenciación de ADN didesoxienzimático de Frederick Sanger y la degradación química de Allan Maxam y Walter Gilbert; con estos dos artículos se incluyeron los primeros secuenciadores de ADN automatizados liderado por Caltech, que luego fue comercializado por distintas casas comerciales. El refinamiento y comercialización del método de secuenciación condujo a una amplia difusión en la comunidad de investigación mundial (Pareek, Smoczynski, y Tretyn, 2011). En el 2000 Jonathan Rothberg desarrolló la primera plata-

forma comercial para el next generation sequencing (NGS), esta técnica fue validada exitosamente al combinar una emulsión de una sola molécula de PCR con una secuenciación de pistola. A partir de esto se ha desarrollado e indagado más en las técnicas, lo que ha ayudado a indagar aún más en distintos temas, teniendo un impacto altamente positivo en la investigación con mamíferos (Pareek y cols., 2011).

### **Herramientas bioinformáticas**

La información que nos brindan las distintas técnicas de investigación, como lo es la secuenciación, viene en una gran cantidad de datos, que si no son interpretados y trabajados de manera correcta, no van a ser útiles para la investigación o la búsqueda de respuestas. Las herramientas bioinformáticas y todo su campo, brindan una forma de analizar las grandes cantidades de información en el menor tiempo posible y la mejor comprensión del mismo. La bioinformática tiene tres objetivos, el primero es ordenar los datos en una forma que los investigadores tengan acceso a la información previa y que puedan agregar la nueva información mientras la producen. El segundo es proveer las herramientas necesarias para el análisis de los datos, como lo puede ser el comparar secuencias con otras ya existentes. Por último es el utilizar estas herramientas para interpretar los resultados de una manera biológicamente relevante, en donde puedan ser aplicados y comparados con el fin de lograr nuevo conocimiento (Luscombe, Greenbaum, y Gerstein, 2001).

## A. Cultivo de tejidos en *Capsicum annuum*

El cultivo de tejido en *Capsicum annuum*, la variante de chile morrón, fue lograda por primera vez por Wang, en 1973, en Ghina. Continuando con el cultivo de chiles, George y Narayanaswamy logró la regeneración por medio de tejidos en india el mismo año (Irikova y cols., 2011). Como base para la investigación, se utilizó el artículo de Umamaheswari y Lalitha (2007), en donde se observa el efecto de distintas hormonas para el crecimiento de *Capsicum annuum* L. o chile morrón en la inducción de callos y producción de capsina. Se tomaron las concentraciones de hormona que utilizaron en donde obtuvieron un mayor número de callos y un mejor crecimiento, para observar si de igual manera se logra una mejor inducción de callos en el chile mirasol.

## B. Genes asociados a la producción de semillas

Las semillas son sumamente importantes para las plantas, al ser la forma en la que estas son capaces de reproducirse. Los frutos de la planta juegan un rol importante en la maduración de la semilla, protección y dispersión de la misma, ayudándose de animales y pájaros que se alimenten de los frutos y con el movimiento diseminan las semillas (Valenta, Nevo, Martel, y Chapman, 2017). Hay múltiples genes que juegan parte en la producción de semilla en una planta, por ejemplo los genes *HAIKU1* (*IKU1*) e *IKU2* en *Arabidopsis* controlan el tamaño de la semilla al afectar el desarrollo del endosperma (Martínez-Andújar, Martín, y Nonogaki, 2011). De igual manera el gen *Sw4.1* es de suma importancia para el tamaño de semilla en *Solanum*, en donde se puede ver principalmente en el tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) (Martínez-Andújar y cols., 2011).

Se ha observado que al agregar auxinas al cultivo, estas promueven el crecimiento y la aparición de la fruta en el desarrollo, por lo que aplicar fitohormonas ha sido una práctica común para producir frutos sin semillas (Tanaka y cols., 2021). Naturalmente se pueden encontrar frutos mutantes sin semillas que pueden deberse a distintos factores genéticos, como lo puede ser la partenocaria, en donde se desarrollan frutos sin polinización; y la esternospermocarpia, en donde el óvulo aborta sin producir células maduras para la semilla. En el mismo contexto la esterilidad masculina o femenina en la planta también puede causar frutos sin semillas (Tanaka y cols., 2021). En el caso del chile *C. annuum* las semillas no son una característica deseable a la hora del consumo. El equipo de Tanaka



(2021) encontró la mutación *tn-1*, en chile Yume-matsuri sin semilla. Se observó que esta mutación se encuentra en el cromosoma 12 de la planta, y podría estar asociada a la producción de fruto sin semilla. Esta mutación si presenta cambios de características en el fruto, pero no se han observado cambios negativos en la forma de las hojas y la morfología de la flor. Al realizar un análisis genético más riguroso, observaron que esta mutación produce esterilidad, ya que los óvulos son abortados antes de formar una semilla madura luego de la polinización (Tanaka y cols., 2021).

Continuando la misma línea de investigación, el equipo de Maki (2023) identificó y caracterizó el gen *CaCK11*, en donde al insertar una lysina (K) en el exón, el fruto no tenía semilla. Este estudio sugiere que la inserción puede reducir la fosforilación de *CaCK11*, impidiendo un desarrollo normal del gametofito femenino, resultado en la producción de frutos sin semilla de *tn-1* (Maki y cols., 2023).

### **A. Diseño y enfoque**

#### **1. Diseño, enfoque y tipo de investigación**

La investigación tiene un diseño experimental, específicamente cuasi experimental, ya que solamente se cuenta con manipulación de variables y grupo control pero no con aleatorización.

#### **2. Población y muestra**

La muestra se tomó de plantas de chile mirasol cultivado en San Antonio Palopó. Comenzando el experimento con 4 magentas por tratamiento, y que en cada magenta haya 4 explantes.

#### **3. Criterios de inclusión y exclusión**

En el muestreo se incluyen hojas de plantas jóvenes de chile mirasol. Se excluye cualquier otra parte de la planta, así como otros tipos de chile o planta.

#### **4. Variables**

Las variables involucradas en la investigación se describen en el Cuadro VI.1.

| Nombre                                    | Definición   | Naturaleza   | Interrelación | Unidades de medición |
|---|--|--------------|---------------|----------------------|
| Hormonas                                  | Concentración de hormonas utilizadas en los distintos tratamientos                           | Cuantitativa | Independiente | mg/L                 |
| Número de callos                          | Cantidad de callos producidos por explantes  | Cuantitativa | Dependiente   | Conteo               |
| Presencia de genes productores de semilla | Observación de la presencia de genes productores de semilla de chile morrón en chile mirasol | Cualitativa  | Independiente | N/A                  |

Cuadro VI.1: Descripción de variables

## 5. Hipótesis

Hipótesis nula: El uso de las fitohormonas 2,4-D, Kin y ANA no aumentará la cantidad de callos producidos por cultivo de tejidos para chile mirasol (*Capsicum annuum*).

Hipótesis alternativa: El uso de las fitohormonas 2,4-D, Kin y ANA aumentará la cantidad de callos producidos por cultivo de tejidos para chile mirasol (*Capsicum annuum*).

Hipótesis nula: Las regiones de de genoma responsables de la producción de semilla que se encuentran en chile Yume-matsuri (*Capsicum annuum*), no se encuentran en el chile mirasol (*Capsicum annuum*).

Hipótesis alternativa: Las regiones de de genoma responsables de la producción de semilla que se encuentran en chile Yume-matsuri (*Capsicum annuum*), también se encuentran en el chile mirasol (*Capsicum annuum*).

## B. Metodología

### 1. Cultivo de chile mirasol a partir de semillas

#### Obtención de semillas

Las semillas se puede encontrar en las áreas del altiplano central de Guatemala. Se compraron semillas de agricultor proveniente de San Antonio Palopó.

#### Siembra y crecimiento de semillas de chile mirasol *in vitro*

Se colocaron dos semillas por cada bolsa de oganza. Se sumergieron en una solución de NaClO al 0.4%(p/v) por 1 minuto. Luego se descartó el NaClO y las semillas se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 1 minuto. Se ingresaron en la campana de flujo laminar mientras se encontraban en la solución de etanol. Se lavaron tres veces con agua destilada estéril, cada lavado

duró un minuto. Con la ayuda de pinzas estériles se sacó cada una de las semillas y se secaron cuidadosamente utilizando mayordomo estéril. Una vez secas se colocaron en magentas con medio MS previamente preparado. En cada caja se colocaron 5 semillas para su germinación. Cada semilla se sembró de manera que solamente quedara la mitad de la semilla cubierta por el medio (Rojas, 2023).

Las magentas con semilla se colocaron en un ambiente oscuro hasta que las semillas germinaran, en este caso fueron 14 días. Una vez germinadas, se trasladaron a un ambiente con luz en intervalos de 12 horas (Beltrán-Burboa, López-Peralta, Hernández-Meneses, y Cruz-Huerta, 2019).

Luego de aproximadamente 15 días de la germinación, se comienza a observar un tallo y raíz. Estas plantas germinadas se sacaron del medio original con ayuda de pinzas. Luego las raíces se lavaron con agua destilada, para quitar cualquier rastro de medio viejo, secándolas por último con mayordomo antes de ingresarlas a un nuevo medio de cultivo MS, colocando solamente una planta por caja.

Una vez las plantas crecieron más en tamaño, se les colocó una caja magenta encima para no interferir con su crecimiento. Simultáneamente se preparó un sistema con dos cajas magenta y tierra suave con piedras pequeñas y un poco de agua, el cual se esterilizó en la autoclave. La planta se sacó cuidadosamente del medio de cultivo, se lavaron las raíces con agua destilada, procurando quitar cualquier resto de medio de cultivo, se secaron con mayordomo estéril y se trasplantaron a la tierra (Amiri y Mohammadi, 2021).

### **Siembra de semilla de chile mirasol en la tierra**

Se cultivaron las semillas en una bandeja de germinación, con tierra peat moss. Se colocaron en la oscuridad hasta su germinación, la cual tardó aproximadamente 13 días. Luego fueron expuestas a la luz durante la mañana y la tarde, evitando dejarlas a los rayos del sol al medio día. Una vez crecidas las plantas se trasladaron a un invernadero, en donde fueron trasplantadas a macetas. Estas plantas se mantuvieron en el invernadero durante el resto del experimento. En la Figura VI.1 se pueden observar las plantas de chile mirasol utilizadas para el experimento, así como el fruto del chile.

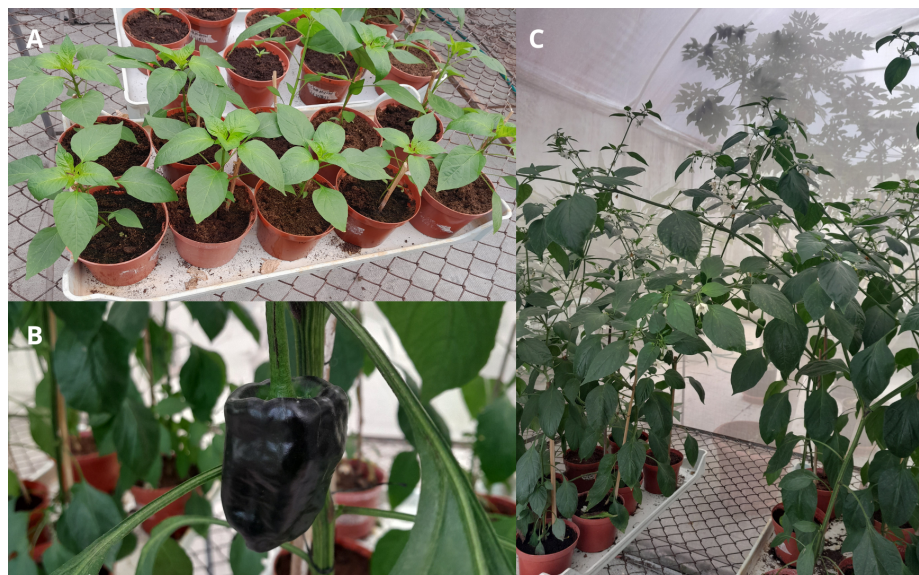


Figura VI.1: Plantas de chile mirasol

Se pueden observar las plantas de chile mirasol utilizadas durante el experimento, donde en A se observan las plantas en sus primeras semanas de crecimiento, en la Figura C se observan las plantas luego de aproximadamente 60 días y en la B se puede observar el fruto del chile.

## 2. Cultivo de tejidos por medio de hojas de chile mirasol

Se tomaron hojas de las plantas de chile mirasol jóvenes, las tomadas para este experimento se encontraban ente 4 y 10 semanas, se lavaron con agua de llave para retirar cualquier partícula. Se colocó cada hoja en una bolsa de oganza, luego se sumergieron en agua desmineralizada con una gota de Tween 20® por cada 100mL de agua, se colocó en agitación durante 10 minutos. Una vez pasado el tiempo, se realizaron tres lavados con agua desmineralizada, después se agregó una solución de NaClO al 0.04%(p/v) y se colocó en agitación durante 10 minutos (Ticona Aliaga y Triguero Triguero, s.f.). Se realizaron tres lavados con agua desmineralizada y se agregó una solución de Banrot ®a 0.5mg/L, colocándolo en agitación durante 10 minutos. Se realizaron tres lavados con agua desmineralizada estéril, y se agregó una solución de etanol al 70 % durante 1 minuto. Mientras se encontraban en el etanol se ingresaron a la campana y se les realizaron tres lavados con agua estéril. (García Lozano, Ocampo Guerrero, y Mesa López, 2015).

De una bolsa de oganza, se sacó la hoja desinfectada utilizando pinzas estériles, está se colocó en un mayordomo estéril sobre una caja petri. Se tomaron explantes de la hoja de *C. annuum* con un tamaño de 1 x 1 cm, los cuales se cortaron con la ayuda de un bisturí estéril y cuadrados de papel 1x1 previamente esterilizados (Park, Kim, Jeon, y Kim, 2021).

Simultáneamente, se realizaron 6 medios con distintas concentraciones de hormonas y un medio control. Para el medio base, se utilizó medio básico MS, en donde un litro de medio se realizó con los siguientes reactivos: sacarosa (30g/L), 100mL de solución de macronutrientes, 1mL de solución de micronutrientes , 2mL de solución de vitaminas, 10mL de solución de calcio, 10mL de solución de hierro, 900µL Luna®Experience 40SC y 2g de agar rite. Se llevo el pH del medio a 5.7 con NaOH y HCl.

Para los medios experimentales se utilizaron diferentes fitohormonas, siendo estas, ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (Kin), las concentraciones utilizadas se pueden observar en el Cuadro XII.1 (Umamaheswa y Lalitha, 2007). Se esterilizaron los medios en la autoclave durate 15 minutos a 121°C, y se colocaron en magentas. Se mantuvieron

a una temperatura ambiental de  $26\pm 2^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa de 30 % (Beltrán-Burboa y cols., 2019).

| Medio | ANA (mg/L) | 2,4-D (mg/L) | Kin (mg/L) |
|-------|------------|--------------|------------|
| T1    | -          | -            | -          |
| T2    | 0.2        | -            | 0.5        |
| T3    | -          | 2.0          | 0.5        |
| T4    | 0.75       | -            | 0.5        |
| T5    | -          | -            | 0.5        |
| T6    | -          | -            | 1.0        |
| T7    | -          | -            | 1.5        |

Cuadro VI.2: Concentraciones de fitohormonas en cada medio de cultivo

Se utilizaron cuatro (4) cajas de medio de cultivo por tratamiento, teniendo un total de 28 cajas. A cada caja se le colocaron 4 explantes de hoja de  $1 \times 1$  cm, como se puede observar en el Cuadro VI.2. Las cajas se sellaron con parafilm y se colocaron a la luz en intervalos de 12 horas.

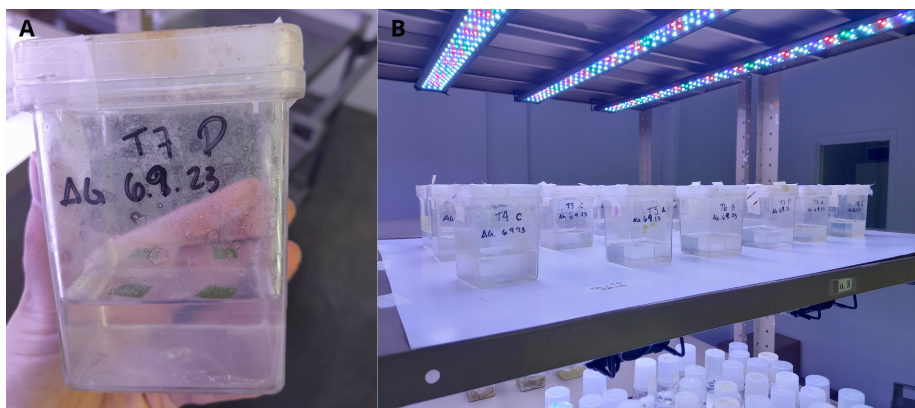


Figura VI.2: Cajas con explantes de chile mirasol

Se puede observar en la Figura A un ejemplo de explantes recién sembrados, mientras que en la Figura B se puede observar la incubación de los explantes con lámparas de luz en intervalos de 12 horas.

### Conteo y análisis visual de callos

Para observar el efecto de la inducción de callos por las hormonas de crecimiento, se observaron los callos constantemente, anotando sus cambios durante 40 días (Park y cols., 2021) y (H. Kim y Lim, 2019). En caso de haber contaminación en alguna parte del proceso, si la contaminación era causada por hongos, se descartó la caja sin abrirse, mientras que si la contaminación era con bacteria, se descontaminó sumergiendo el explante brevemente en etanol al 70 %, luego lavándolo con agua estéril y por último secándolo con mayordomo, pasándolo a un nuevo medio de cultivo sin contaminación. Luego del tiempo establecido, se sacaron los callos de las cajas magenta para todos los tratamientos y se midió cada callo en ancho, profundidad y altura con un vernier. (Poeaim, Poraha, Pongjaroenkit, y Pongthongkam, 2016).

## Regeneración de la planta a partir del callo

Para la regeneración de la planta los callos se transfirieron a cajas magenta con medio MS, al cual se le agregó 0.5mg/L ácido 1 - naftalenacético (ANA), procurando un pH de 5.7. Se incubaron a 25°C en condiciones de luz.

## 3. Amplificación de genes asociados a la producción de semilla

### Extracción de ADN

El ADN fue extraído de hojas jóvenes utilizando el protocolo de extracción de ADN basado en CTAB-Cloroformo, basado en el procedimiento de Doyle y Doyle con modificaciones del Laboratorio de Protección Vegetal.

Se seleccionaron 6 hojas y se colocaron en un tubo abierto, cerrando con la tapadera para dejar discos de las hojas dentro del tubo. Se precalentó el Buffer de extracción CTAB a 65°C, se incubó la muestra a -20°C durante 20 minutos. Se agregaron a la muestra 600µL del buffer de extracción CTAB, precalentado a 65°C, y se maceró durante 30 a 60 segundos. Se incubó a 65°C durante 15 – 30 minutos. Durante la incubación se colocó una gradilla a -20°C en el congelador. Luego de la incubación, se dejaron enfriar las muestras durante 5 minutos en la gradilla fría y se esperó a que alcanzara temperatura ambiente. Se agregaron 500µL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se vortexó la mezcla por 10 segundos, o hasta que se observe una solución lechosa homogénea. Se centrifugó a 13,000rpm por 10 minutos, o hasta que se observe una separación de fases. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se agregó al sobrenadante 1 volumen de isopropanol frío y 1/10 de volumen de acetato de amonio 7.5M. Se mezcló por inversión e incubó a -20°C durante 20 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13,000rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 150µL de etanol 70% frío y se centrifugó a 13,000rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado al aire por 45 minutos o en el horno a 30°C por 10 a 20 minutos. Se resuspendió el pellet en 50µL de buffer TE precalentado a 65°C. Se almacenó el ADN resuspendido a 4°C. (Doyle y Doyle, 1987; Laboratorio de Protección Vegetal, s.f.).

### Búsqueda de genes de interés

Se comenzó con una revisión bibliográfica, en donde se hizo una investigación exhaustiva para encontrar genes ya descubiertos que pudieran estar relacionados a la producción de semilla en *C. annuum*. El criterio principal de selección para los genes fue la información disponible de investigaciones previas. Se seleccionaron los genes *tn-1* y *CaCKI1*. Estos genes fueron encontrados en el chile Yume-matsuri (*C. annuum*), pudiendo ser los causantes al estar mutados de no producir semilla. El gen *tn-1* mutado puede producir esterilidad, ya que los óvulos son abortados antes de formar una semilla madura luego de la polinización (Tanaka y cols., 2021). El gen *CaCKI1*, al insertar una lysina (K) en el exón, se puede reducir la fosforilación del mismo gen, impidiendo un desarrollo normal del gametofito femenino, resultando en la producción de frutos sin semilla (Maki y cols., 2023). En los artículos principales para cada uno de estos genes se encontraban las secuencias de cebadores, así como las secuencias de los genes no mutados. Esto fue parte clave de la selección de los mismos, ya que se pudo replicar la PCR realizada por Tanaka y Maki, observando así si los cebadores de igual manera podrían ser utilizados en el chile mirasol y si los genes amplificados tendrían los tamaños descritos por los autores. De igual forma al tener las secuencias de los genes no mutados, se podrá en el futuro realizar una secuenciación y comparar con la información provista por los autores si efectivamente se tienen los genes en el chile mirasol,

## PCR para amplificación de zonas de interés

Se cuantificó el ADN en un Nanodrop <sup>®</sup>, y se realizaron las diluciones correspondientes con buffer TE hasta llegar a 100ng/ $\mu$ L. Se realizó el master mix para la PCR, con las concentraciones que se pueden observar en el Cuadro VI.3, agregando 1 $\mu$ L de ADN por reacción, para hacer un total de 25 $\mu$ L (Promega, s.f.).

| Reactivo                 | Concentración |
|--------------------------|---------------|
| green goTaq <sup>®</sup> | 1X            |
| dNTPs                    | 0.2mM         |
| Primer F                 | 0.4 $\mu$ M   |
| Primer R                 | 0.4 $\mu$ M   |
| Go taq pol               | 0.008 $\mu$ M |

Cuadro VI.3: Concentraciones y reactivos utilizados para realizar Mastermix para la PCR

Se agregó 1 $\mu$ L de ADN por muestra, a partir de un stock de 150ng/L de ADN. Se realizó una PCR buscando dos fragmentos de ADN. El fragmento Chr12\_235495618\_CAPS (*tn-1*) fue amplificado a partir de los oligonucleótidos Chr12\_235495618\_CAPS\_Hinf1\_F: AGGTGTAGACATCACCTACCC y Chr12\_235495618\_CAPS\_Hinf1\_R: TGGGAACAAAGGACCTTAAAAA (Tanaka y cols., 2021). Se realizaron tres PCR con distintas temperaturas de templado, utilizando la temperatura descrita por Tanaka, la temperatura ideal tomando en cuenta la T<sub>m</sub> comercial de los oligonucleótidos y el promedio entre la temperatura de Tanaka y la temperatura ideal. Procedimiento de PCR según Tanaka: 1 ciclo de 2 minutos a 96°C; 35 ciclos de 10s a 98°C, 30s a 55°C y 1 minuto a 68°C; con una extensión final de 5 minutos a 68°C (Tanaka y cols., 2021). Procedimiento de PCR promediado: 1 ciclo de 2 minutos a 96°C; 35 ciclos de 10s a 98°C, 30s a 57.8°C y 1 minuto a 68°C; con una extensión final de 5 minutos a 68°C. Procedimiento de PCR a partir de T<sub>m</sub>: 1 ciclo de 2 minutos a 96°C; 35 ciclos de 10s a 98°C, 30s a 60.6°C y 1 minuto a 68°C; con una extensión final de 5 minutos a 68°C. Se espera una banda entre 250-300pb (Tanaka y cols., 2021).

El fragmento CA12g21620 (*CaCKI1*) fue amplificado a partir de los oligonucleótidos CaCKI1\_F: TGAAGCAACCAAACGCATTA y CaCKI1\_R: TCGGTTTCTTCCTTTTCTGTATG (Maki y cols., 2023). Se realizaron dos PCR con distintas temperaturas de templado, utilizando la temperatura descrita por Tanaka y la temperatura ideal tomando en cuenta la T<sub>m</sub> comercial de los oligonucleótidos. Procedimiento de PCR según Tanaka: 1 ciclo de 2 minutos a 96°C; 35 ciclos de 10s a 98°C, 30s a 55°C y 1 minuto a 68°C; con una extensión final de 5 minutos a 68°C (Tanaka y cols., 2021). Procedimiento de PCR promediado: 1 ciclo de 2 minutos a 96°C; 35 ciclos de 10s a 98°C, 30s a 56.8°C y 1 minuto a 68°C; con una extensión final de 5 minutos a 68°C. Se espera una banda de 96pb (Maki y cols., 2023).

## Visualización de resultados en gel de agarosa y en gel de poliacrilamida

Se realizó un gel de agarosa al 2% a partir de TAE 1X. Se cargaron 4 $\mu$ L de producto de PCR mezclado con 1 $\mu$ L de Diamond<sup>™</sup>Nucleicacid dye. Se utilizaron dos escaleras moleculares, una de 100pb y una de 50pb, de las cuales se cargaron 1.5 $\mu$ L mezclado con 1 $\mu$ L de Diamond<sup>™</sup>Nucleicacid dye. Se corrió la electroforesis durante 1 hora a 70 voltios y 500 amperios. Se visualizó en un transiluminador con luz UV para observar las bandas amplificadas.

Al haber dos bandas en el gel de *tn-1*, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida, para poder separar de mejor manera los fragmentos. Se utilizó el mismo procedimiento que descrito anteriormente para el master mix y la PCR, utilizando el colorless 5X GoTaq <sup>®</sup>Reaction Buffer en lugar del Green 5X GoTaq<sup>®</sup>Reaction Buffer utilizado anteriormente.

Se preparó una solución de poliacrilamida al 10%, mezclando 6.6mL de agua destilada, 2.4mL de



Buffer SB 5X, 3mL de acrilamida, 20 $\mu$ L de TEMED y 20 $\mu$ L de APS. Se agitó la solución inmediatamente y se vertió entre el vidrio espaciador y el vidrio corto, evitando la formación de burbujas. Se dejó polimerizar durante una hora. Luego se cargaron las muestras, agregando 4 $\mu$ L de muestra y 1 $\mu$ L de stop mix. Se corrió durante 1 hora a 130 voltios, con un amperaje de 500. Para teñir, se colocó el gel en un recipiente con 150mL de solución de fijación y se agitó durante 20 minutos. Luego se recuperó la solución en el erlenmeyer y se realizaron tres lavados con agua desmineralizada por dos minutos cada uno. Se agregaron 150mL de solución de tinción y se agito por 20 minutos. Se recuperó la solución de tinción y se lavó con agua desmineralizada por 10 segundos. Se agregó 150mL de solución de revelado a 4°C y se agitó hasta que se revelaron las bandas. Una vez se tuvo la intensidad deseada, se vertió la solución de fijación para detener la reacción. Se agitó hasta la completa neutralización. Por último, se escanearon los geles y se guardaron en acetato para posterior análisis.

#### 4. Análisis de datos

El análisis para determinar la diferencia de tratamientos, tanto para la inducción de callos como para el tamaño que estos obtuvieron, se realizó un ANOVA con un  $\alpha < 0.05$  y una comparación de medias por Tukey utilizando minitab (minitab, s.f.).

## A. Cultivo de tejidos por medio de hojas de chile mirasol

### 1. Siembra de semillas en medio de cultivo

En la Figura VII.1 se puede observar una de las plantas de chile mirasol ya crecidas, en donde se ve la comparación entre la siembra y el resultado final. Cuando la planta comenzó a crecer se colocó una unión de magenta y otra caja encima para permitirle el crecimiento. Algunas de las plantas tornaron sus hojas a amarillas a los 48 días, por lo que se cambiaron a tierra estéril, donde luego de unos días sus hojas volvieron al color verde característico y como se observa en la Figura VII.1.

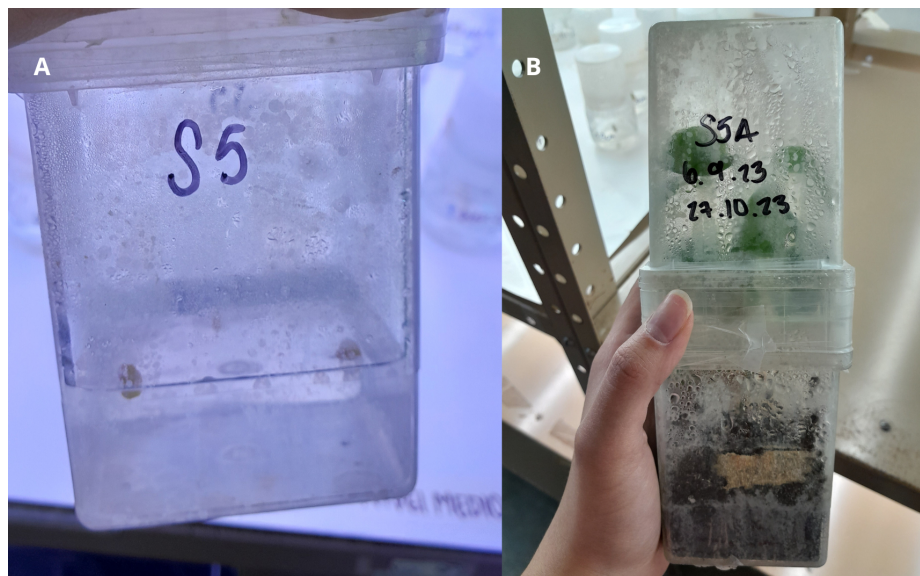


Figura VII.1: Resultado de siembra de semillas

En la Figura A se puede observar la caja S5 con las semillas sembradas hasta la mitad del medio.

En la Figura B se puede observar una de las semillas germinadas y crecidas, la cual se cambió a tierra.

## 2. Desinfección de explante

Durante el experimento se tuvo un total de 126 cajas, con distintos tratamientos, de las cuales solamente 82 cajas (69.49 %) se contaminaron y murieron antes de cumplir el tiempo para observar la presencia o ausencia de callo. La pérdida de cajas durante el experimento se dio por contaminación, cuando las contaminaciones fueron ligeras y de bacteria, se desinfectaron los explantes con etanol al 70 %, pero cuando la contaminación fue intensa o con hongos, se descartó la caja. Los primeros medios y métodos desinfección de los explantes no contenían fungicida, este cambio se implementó luego de observar la gran contaminación provocada por hongos durante el experimento. En la Figura VII.3 se puede observar la comparación de cuantas cajas llegaron al final del experimento cuando no se utilizó fungicida y luego de utilizarlo. De todas las cajas sin fungicida, un 85.87 % fueron descartadas, mientras que un 14.13 % sí llegó al final del experimento, a diferencia de las cajas en donde se implementó el uso de Luna y Banrot, donde un 69.70 % de las cajas si llegaron a ser contadas y un 30.30 % fueron descartadas por contaminación. En la Figura VII.2 se puede observar un ejemplo de contaminación por hongo.

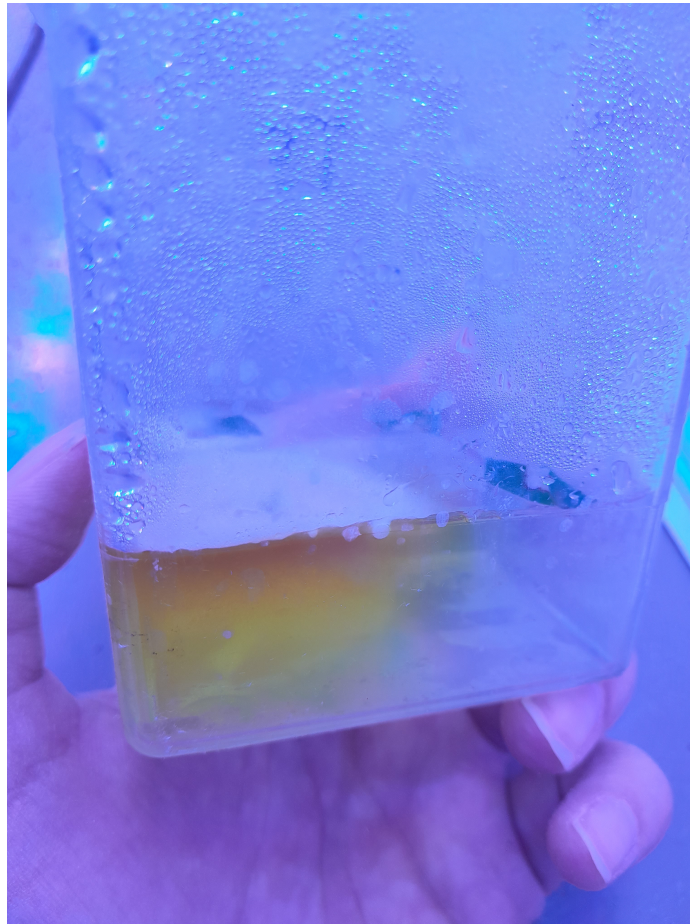


Figura VII.2: Ejemplo de contaminación por hongo  
Se puede observar un ejemplo de contaminación por hongo en la caja del tratamiento 5. Siendo la contaminación de color naranja.

### Comparación entre cajas con fungicida y sin fungicida

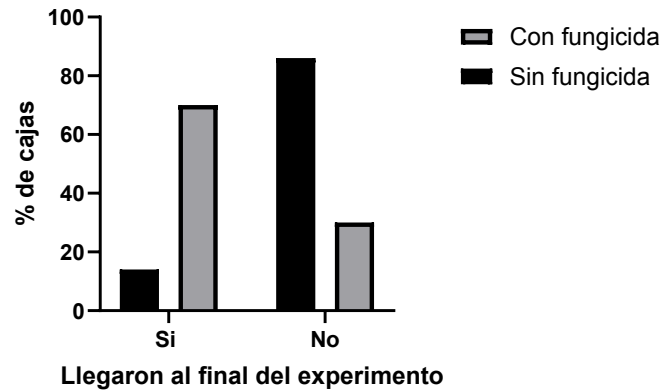


Figura VII.3: Comparación entre cajas con fungicida y sin fungicida. La comparación se realizó utilizando como 100 % la cantidad de cajas totales para cada caso, siendo 85 cajas sin fungicida y 33 cajas con fungicida.

### 3. Efectividad de las fitohormonas en la inducción de callo en los medios de cultivo

Se puede observar en la Figura VII.4, los explantes en distintos tratamientos luego de más de 30 días, en donde se puede observar para cada uno de ellos tanto un avance en el crecimiento e inducción de callos, como lo es en C, o que no hay ningún crecimiento en los mismos. La formación de callos se comenzó a observar entre los 14 y 20 días, para los explantes que sí generaron callo.

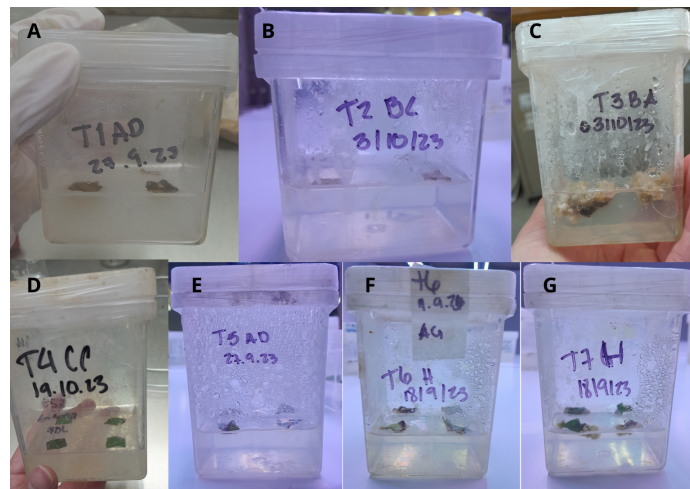


Figura VII.4: Cajas con callo

En la Figura A se observa el tratamiento 1, en la Figura B se observa el tratamiento 2, en la Figura C se observa el tratamiento 3, en la Figura D se observa el tratamiento 4, en la Figura E se observa el tratamiento 5, en la Figura F se observa el tratamiento 6 y en la Figura G se observa el tratamiento 7. Todas las imágenes se tomaron cuando ya había inducción de callo en cada uno de los tratamientos, o luego de una cantidad de días mayor a 30 en caso no tenga callo.

Los callos que crecieron se midieron como se observa en la Figura VII.5 C, al sacarlos de la caja y colocarlos en un mayordomo estéril, donde fueron medidos con un vernier para determinar que tanto crecieron por tratamiento. Estas mediciones no fueron utilizadas para el análisis final, ya que como los callos tienen una superficie desigual, con los instrumentos de medición no se fue capaz de realizar una estandarización del proceso para no tener errores o sesgos en las medidas. El dato utilizado para el resto del análisis fue el conteo de callos en la caja magenta. Se puede observar en la Figura VII.5 que los callos de distintos tratamientos presentan callos de distintas formas, en donde en A, con un tratamiento 4, se observan ligeras raíces en el callo, en B con un tratamiento 6, hay callos principalmente en las esquinas y más pequeños, C con un tratamiento 3 con un callo más grande en donde no se observa la hoja que se encontraba originalmente y D con un tratamiento 7 donde se ven pequeños callos en las esquinas y orillas de los explantes.

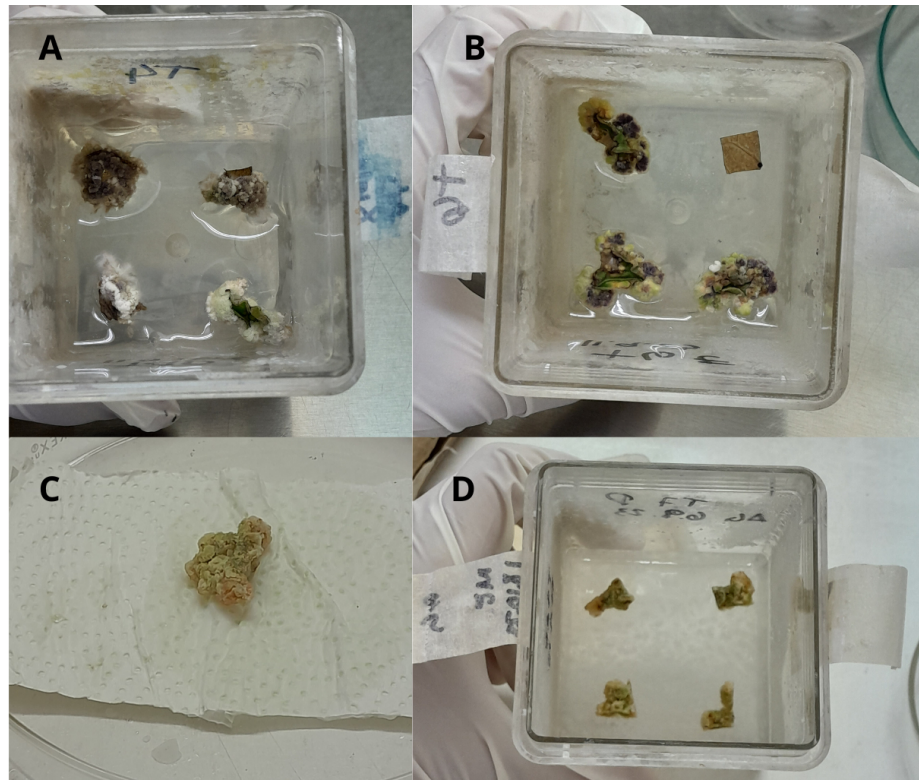


Figura VII.5: Callos crecidos de distintos tratamientos

En la Figura A se observan callos crecidos del tratamiento 4, en la Figura B se observan callos crecidos del tratamiento 6, en la Figura C se observa un callo del tratamiento 3 fuera del medio de cultivo y en la Figura D se observan los callos formados del tratamiento 7.

Para realizar el análisis estadístico se utilizó un ANOVA con un análisis lineal general (LGM) y Tukey. Para el análisis se utilizaron un total de 118 muestras, utilizando todas las cajas realizadas. En donde si tuvieron que ser descartadas antes de pasar el tiempo para el conteo, se tomó como que no hubo inducción de callo. Todo el análisis se realizó con una confianza de 95 %.

La hipótesis nula para el análisis es que las medias de la inducción de callo en los distintos tratamientos son iguales, por lo que no habría diferencia entre tratamientos. En el Cuadro VII.1 se puede observar que el valor p es de 0.018 y al ser menor que el alfa de 0.05 se rechaza la hipótesis nula, indicando que las medias de inducción de callo por tratamiento son significativamente distintas.

| Fuente      | GL  | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor P |
|-------------|-----|-----------|-----------|---------|---------|
| Tratamiento | 6   | 1.439     | 0.23987   | 2.69    | 0.018   |
| Error       | 111 | 9.900     | 0.08919   |         |         |
| Total       | 117 | 11.339    |           |         |         |

Cuadro VII.1: Análisis de Varianza

En el Cuadro anterior se puede observar que el valor p es menor a alfa de 0.05, denotando que existe una diferencia significativa entre las medias de los distintos tratamientos en su capacidad de inducir callos.

Con la prueba de Tukey en el Cuadro VII.2, se puede observar que el tratamiento 3 es el único diferente a los demás, porque a pesar que comparte la letra A con el resto de tratamientos, todos los demás tratamientos comparten la letra B exceptuando el 3. La cantidad de repeticiones por muestras varían ya que para algunos tratamientos se realizaron más cajas para que hubiera más muestras que llegaran al final del experimento sin contaminación.

| Tratamiento | N  | Media (unidades) | Agrupación |   |
|-------------|----|------------------|------------|---|
| T3          | 15 | 0.382251         | A          |   |
| T6          | 17 | 0.179070         | A          | B |
| T7          | 17 | 0.149658         | A          | B |
| T4          | 17 | 0.097331         | A          | B |
| T5          | 14 | 0.089593         | A          | B |
| T2          | 19 | 0.066621         |            | B |
| T1          | 19 | 0.000164         |            | B |

Cuadro VII.2: Comparaciones por parejas de Tukey

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. N indica la cantidad de repeticiones por tratamiento.

En la Figura VII.6 Se puede observar que el tratamiento que tiene una mayor proporción de callos es el tratamiento 3, mientras que el resto de tratamientos se encuentran más cerca de la media. Esto concuerda con lo observado anteriormente en el Cuadro VII.2, en donde se observa que el tratamiento con una media significativamente distinta es el 3.



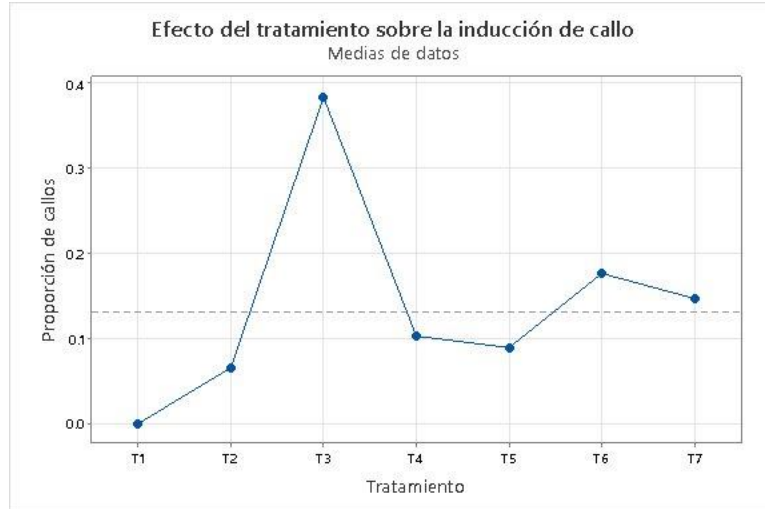


Figura VII.6: Efecto del tratamiento sobre la inducción de callo  
 En donde la línea punteada indica la media entre los tratamientos de la proporción de callos. Las medias para cada tratamiento fueron dadas a partir de cuantos callos crecieron por caja y la comparación de cajas en general, en donde el crecimiento de callo en los 4 explantes se denotó como 1, el crecimiento de 3 callos como 0.75, de 2 callos como 0.50 y de un callo como 0.25. El análisis fue realizado en minitab®.

## B. Resultados de amplificación genética

### 1. Detección de genes por PCR

La amplificación se realizó a partir de hojas de chile mirasol obtenidas del invernadero de la Universidad del Valle de Guatemala, de las mismas plantas utilizadas para la realización de explantes e inducción de callo. En el Cuadro VII.3 se puede observar la pureza y concentración de la muestra de ADN que se utilizó.

| Muestra       | ng/ $\mu$ L | A260/280 | A260/230 |
|---------------|-------------|----------|----------|
| Chile mirasol | 148.7       | 1.67     | 0.82     |

Cuadro VII.3: Pureza y concentración de la muestra de ADN

En el cuadro se puede observar la pureza y concentración de ADN, medido con un Nanodrop®

Se buscaron los fragmentos *tn-1* y *CaCKII* por medio de una PCR. En la Figura VII.7, para el gen *tn-1*, se observa que la muestra A solamente presenta una banda de 283 pb, mientras que las muestras B y C presentan una banda de 238 pb y además una banda más pequeña de 167pb. Luego en la misma Figura se puede observar para el gen *CaCKII* que hay una banda de 93pb en las muestras D, E y F. Para todas las muestras se puede observar que los blancos no presentan amplificación, en donde el blanco para la muestra A se encuentra en el pozo 3, el blanco para las muestras B y C se encuentra en el pozo 6, el blanco para la muestra D se encuentra en el pozo 9 y el blanco para las muestras E y F se encuentra en el pozo 12.

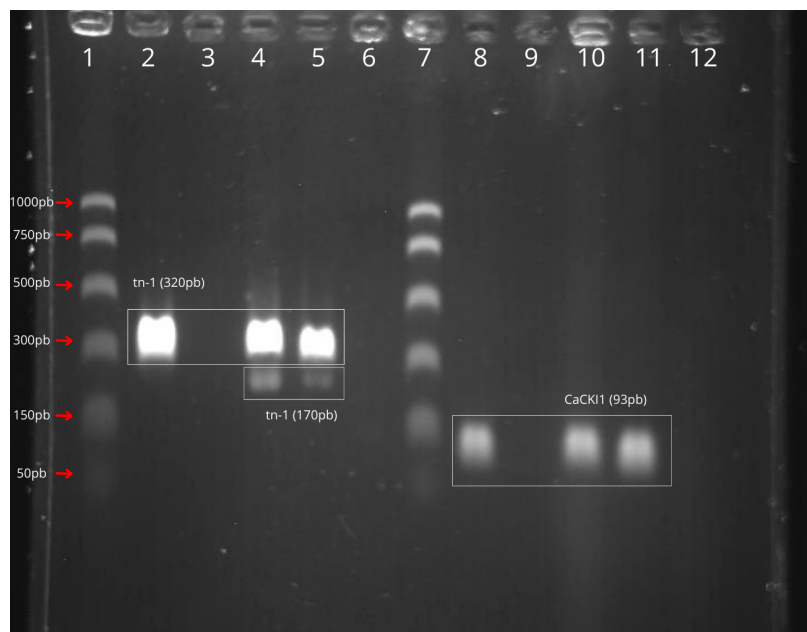


Figura VII.7: Gel de agarosa con los productos de PCR para el gen *tn-1* y *CaCKII*

En los pozos 1 y 7 se encuentra la escalera PCR Marker de 50pb. En el pozo 2 se encuentra la muestra A para el gen *tn-1* con una temperatura de templado de 55°C. En el pozo 4 y 5 se encuentra la muestra B y C para el gen *tn-1* con una temperatura de templado de 60.6°C, se puede observar que presenta dos bandas, en el pozo 3 se encuentra el blanco para A y en el pozo 6 el blanco para B y C. En el pozo 8 se encuentra la muestra D para el gen *CaCKII* con una temperatura de templado de 55°C, mientras que en los pozos 10 y 11 se encuentran las muestras E y F para el gen *CaCKII* con una temperatura de templado de 56.8°C. En el pozo 9 se encuentra el blanco para D y en el pozo 12 el blanco para E y F.

En la Figura VII.8 se observa el resultado en donde se realizaron PCR en tres temperaturas de amplificación distintos, para observar la presencia de distintas bandas. Se utilizaron los ciclos de PCR definidos previamente en la metodología, en donde los que tienen una temperatura de templado de 57.8°C (H) y 60.6°C (B e I) presentan dos bandas, de 421pb y 293pb, mientras que en la muestra G, con una temperatura de templado de 55°C presenta solamente una banda de 412pb. En los pozos 6, 7 y 8 se pueden observar los blancos para las muestras en el gel, en donde no hay amplificación alguna.



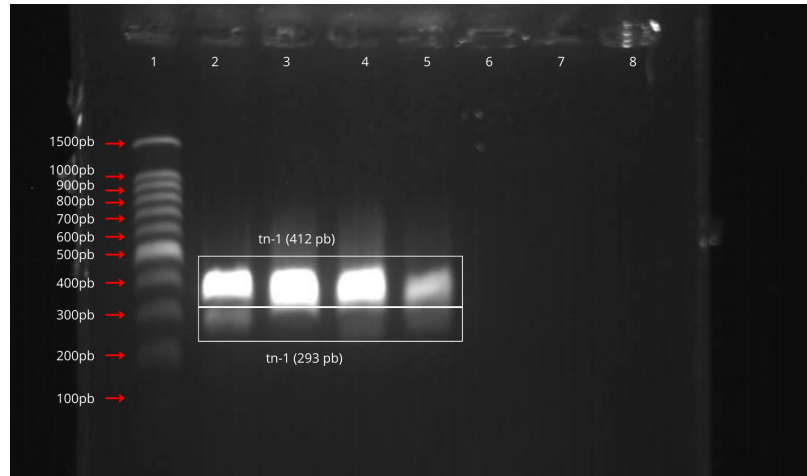


Figura VII.8: Gel de agarosa con productos para gen *tn-1*

En el pozo 1 se encuentra una escalera de 100pb. En el pozo 2 se encuentra el producto de PCR B, en el pozo 3 se encuentra el producto de PCR G con temperatura de templado de 55°C, en el pozo 4 se encuentra H con temperatura de 57.8°C, en el 5 se encuentra I con temperatura de 60.6°C. Por último en los pozos 6, 7 y 8 se encuentran los blancos para las muestras G, H e I respectivamente.

## 2. Validación de gen *tn-1* por PAGE

En el gel de acrilamida (Figura VII.9) se pueden observar los productos para las PCR con distintas temperaturas de templado, en las tres muestras se observa una sola banda de 358pb.

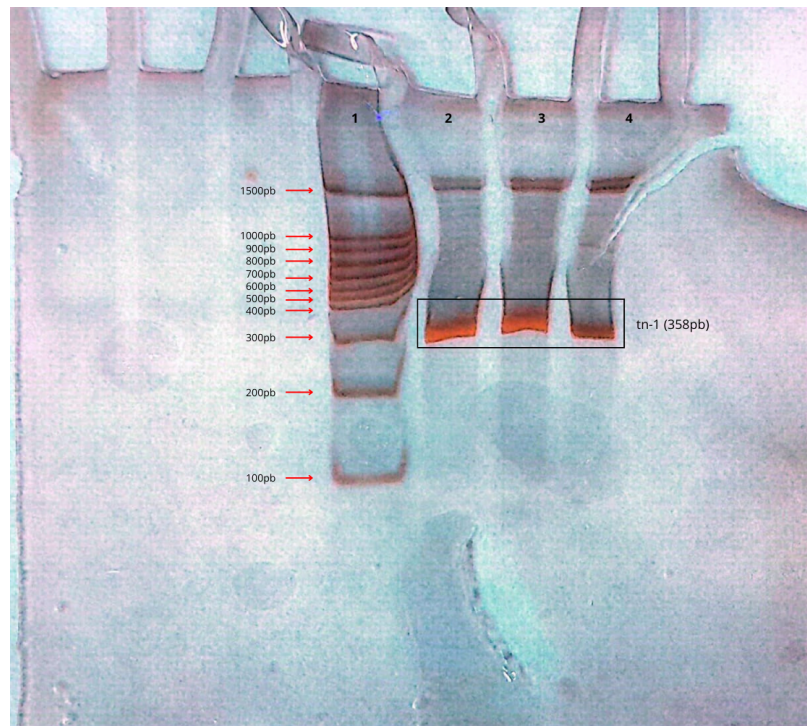


Figura VII.9: Gel de acrilamida con productos para gen *tn-1*

En el pozo 1 se encuentra una escalera de 100pb. En el pozo 2 se encuentra el producto de PCR G, en el pozo 3 se encuentra el producto de PCR H y en el pozo 4 se encuentra el producto de PCR I.

### A. Cultivo de tejidos por medio de hojas de chile mirasol

#### 1. Siembra de semillas en medio de cultivo

La siembra de semillas de chile mirasol en un medio de cultivo *in vitro* se realizó con el objetivo de observar el comportamiento de la planta en un medio MS, ya que al haber poca literatura acerca de la misma, no se sabía como se iba a ver el proceso en la misma. A pesar de las desinfecciones que se realizaron, igual algunas semillas se contaminaron cuando estaban en el medio de cultivo, por lo que la desinfección realizada para las semillas puede no haber sido la ideal. El error en la desinfección puede haber sido principalmente el tiempo y el orden de los desinfectantes, ya que se realizó la desinfección primero con cloro al 0.4%(p/v) durante un minuto y luego se sumergieron en etanol al 70% durante un minuto, utilizando el procedimiento de (Rojas, 2023). Mientras que en otros procedimientos lavan primero las semillas con etanol durante un minuto, luego 15 minutos con cloro al 15% y por último con peróxido de hidrógeno durante dos horas (Aguilar-Jiménez, Rodríguez-De-la O, Aguilar-Jiménez, y Rodríguez-De-la O, 2020). Por lo que se puede recomendar intentar otros métodos de desinfección para las semillas, en donde se tenga más tiempo las semillas en desinfección e intentando otro orden de desinfectantes.

#### 2. Desinfección de explante

Durante el experimento se observó una fuerte contaminación con hongos al principio del proyecto, como se puede observar en la VII.2. La contaminación en el cultivo de tejidos puede venir tanto de acarrear microorganismos desde las superficies y explantes, o por protocolos no ideales realizados en el laboratorio (Cassells, 1991). Hay que tomar en cuenta que las superficies de las plantas son hábitat para múltiples microorganismos, así como que la contaminación en el cultivo depende del tipo de explante utilizado. Si se utiliza el meristemo, es más probable que todos los microorganismos sean eliminados, mientras que en las hojas, pecíolo o tallo la probabilidad de acarrear la mayoría, si no es que todos los microorganismos es más probable (Cassells, 1991). Al haber realizado el explante a partir de hojas se puede observar al comparar con la literatura que la probabilidad de contaminación es más alta. Por lo mismo durante el experimento, luego de observar que solamente con una desinfección al explante con cloro y etanol no era suficiente, se agregó fungicida. Como

se observa en la Figura VII.3, luego de agregar fungicida tanto al medio como a la desinfección de los explantes, disminuyó la mortalidad de los mismos y más explantes cumplieron los 40 días mínimos para poder ser medidos sus callos o determinar que no creció callo en el medio. En este caso el principal contaminante de los explantes fueron hongos, y luego bacterias, que es con lo que se contaminaron los explantes que sí tenían fungicida e igual no lograron llegar al final del experimento. Se puede considerar que la contaminación vino del mismo explante, ya que los medios de cultivo sin explante no se contaminaron en ningún momento, y de igual manera se notó que toda la contaminación salía del explante. Para la siembra de explantes se utilizó una campana de flujo, guantes y mascarilla, así como pinzas estériles en todo momento y un mechero, procurando así mantener el área lo más estéril posible, y tocando las hojas solamente con instrumentos y nunca con las manos, por lo que se considera que se mantuvieron las mejores condiciones de esterilidad posibles en el laboratorio. Por lo mismo se puede decir que es mejor utilizar fungicida para la siembra del explante, ya que al ser de hoja la probabilidad de contaminación en el medio es mayor.

### 3. Efectividad de las fitohormonas en la inducción de callo en los medios de cultivo

Al ser el objetivo de esta sección observar qué medio de cultivo puede ser una buena opción para realizar crecimiento *in vitro* de chile mirasol, así como observar si las fitohormonas son necesarias o si un agar básico MS puede ser suficiente. Para elegir las concentraciones y qué fitohormonas utilizar se utilizó la información generada por Umamaheswari (2007). En donde se tomaron las combinaciones de hormonas que presentaron mejores resultados en su experimentación. En la Figura VII.4 se puede observar la formación de callo en los distintos medios, donde se observa en la imagen C que hay un callo grande y suave en el medio con tratamiento 3. Al compararlo con lo provisto por Umamaheswari, se obtuvo un resultado similar, ya que ellos en la combinación de 2.0mg/L de 2,4-D y 0.5mg/L de Kin obtuvieron un resultado similar de la hoja (Umamaheswa y Lalitha, 2007). Al observar la Figura VII.5 se puede observar que los callos de los distintos medios son diferentes. En donde en los tratamientos 4, 6 y 7 se puede observar que los callos se encuentran en las orillas del explante, lo que concuerda de igual manera con lo presentado por (Umamaheswa y Lalitha, 2007).

Era importante observar si hay una diferencia significativa en la inducción de callos en los distintos medios para poder determinar si el uso de fitohormonas es necesaria y en ese caso cuales. Por lo mismo se realizó un ANOVA como se observa en el Cuadro VII.1, en donde el valor importante es el valor P. Ya que el valor P es menor a un alfa de 0.05 para una confianza del 95 % se rechaza la hipótesis nula, en donde se indica que no hay ninguna diferencia entre los tratamientos (minitab, s.f.). Lo que indica que sí hay una diferencia significativa en las medias de inducción de callos en los distintos tratamientos. Para observar esta diferencia se realizó una comparación por parejas de Tukey como se puede observar en el Cuadro VII.2. Aquí se observa por medio de letras las agrupaciones de los tratamientos que tienen medias similares, en donde se ve que el único tratamiento que no comparte la letra B es el tratamiento 3, indicándonos que su media es significativamente diferente a las demás. Lo cual se puede comprobar de manera gráfica en la Figura VII.6, donde se observa que la media de callos inducidos en el tratamiento 3 es mucho mayor que en el resto de los tratamientos. Si se compara directamente con el tratamiento 1, se puede observar que el tratamiento 1 tiene una media de 0, ya que no creció ningún callo en este medio durante todo el experimento, mientras que el tratamiento tres tiene una media de 0.4, lo que indica que un 40 % de los explantes en tratamiento 3 indujeron callo.

El tratamiento 3, que indujo significativamente más a los explantes a tener callo que el resto de tratamientos estaba compuesto de 2.0mg/L de 2,4-D y 0.5mg/L de Kin. En trigo se ha observado que la presencia de 2,4-D en concentraciones de 2.0 o 4.0mg/L y un período de inducción entre 10 y 15 días han sido suficientes para obtener un crecimiento de callos (Zheng y Konzak, 1999). También en callos a partir de cotiledones de soya se ha observado que convierten el 2,4-D aplicado externamente en al menos siete conjugados de aminoácidos activos, al menos dos metabolitos hidroxilados en anillo

inactivos, y en menor medida glucosa o ésteres de azúcar (Feung, Loerch, Hamilton, y Mumma, 2002).

En cuanto a la kinetina se ha observado que la aplicación de esta en el medio puede ser esencial para el crecimiento de callos y raíces en rebanadas de papa (Okazawa, Katsura, y Tagawa, 1967). En otros estudios observaron que la adición de auxinas y kinetina hasta 2mg/L no tiene una diferencia estadísticamente significativa en respecto a solo agregar la auxina al medio para la inducción de callos (Ogihara y Tsunewaki, 1978). En este caso al haber utilizado en todos los medios como se observa en el Cuadro XII.1 no se puede saber si el solamente utilizar la auxina hubiera dado un resultado igual en el caso de los tratamientos 2, 3 y 4. Lo que sí se puede observar es que el tratamiento 5, 6 y 7 que solamente tienen kinetina sí tuvieron inducción de callo. Por lo que se puede inferir que la auxina 2,4-D sí propició la inducción de callo en conjunto con la kinetina, pero para determinar si solamente la auxina podría ser suficiente se necesitaría realizar otro experimento.

## B. Resultados de amplificación genética

### 1. Detección de genes por PCR

La detección genética por PCR se realizó de dos genes, *tn-1* y *CaCKII* (Tanaka y cols., 2021; Maki y cols., 2023). Estos genes son los utilizados al haber más información sobre los mismos con las secuencias de los oligonucleótidos para poder replicarlo. El objetivo en esta sección fue determinar si en el chile mirasol se encontraban los genes sin mutar de *tn-1* y *CaCKII*, y así poder ver en futuros estudios si se pueden mutar para obtener chile mirasol sin semilla. Esto se logró al utilizar los oligonucleótidos presentados en cada estudio respectivo para la PCR sin hacer el proceso de enzimas de restricción, ya que al tener chiles sembrados por medio de semilla, y el fruto observado tiene semillas también, se espera que no haya ninguna mutación.

En la extracción de ADN se obtuvo una pureza aceptable para A260/280, y contaminado con sales, fenoles e hidratos de carbono para A260/230 (bancoadn, 2020). Al realizar la PCR se observó que para el gen *CaCKII* se obtuvo en un gel de agarosa al 2% una banda de 93pb en las tres amplificaciones. Esto es indicador que sí es el gen que se está buscando, ya que está reportado con un peso de 96pb, y considerando que el fragmento no fue secuenciado, no se puede asegurar con exactitud la cantidad de pb que se encuentran, pero un aproximado (Maki y cols., 2023). En la Figura VII.7 en el gen *tn-1* se observó una banda extra al correr la PCR con una temperatura de templado de 60.6°C. En el protocolo de referencia no hay un peso en pb exacto del gen *tn-1* que se amplificó, y al corroborar por medio de *in silico* se determinó que el peso es aproximadamente 300pb. Por lo que la segunda banda podría ser amplificación inespecífica del set de oligonucleótidos, ya que la primer banda se encuentra alrededor de la banda de 300pb de bases en la escalera.

### 2. Validación de gen *tn-1* por PAGE

Ya que el gel (Figura VII.7) presentó dos bandas en *tn-1* se realizaron tres PCR con temperaturas de templado diferentes como se observa en la Figura VII.8. En este se observa que tanto con la temperatura de templado ideal para los oligonucleótidos (60.6°C) indicado por el proveedor, y el promedio entre la temperatura indicada por el proveedor y la temperatura indicada por el artículo (Tanaka y cols., 2021), se encuentra la segunda banda observada previamente. Solamente en el pozo 3, en donde se realizó el procedimiento del artículo no existe esta segunda banda. Al estar ambas bandas tan juntas, se decidió realizar un gel de poliacrilamida, ya que este puede separar moléculas de ADN cuyos largos sean diferentes por solamente 0.1% (Green y Sambrook, 2020). En la Figura VII.9 se observa solamente una banda en el gel de poliacrilamida. A pesar que el revelado de las bandas de escalera no fue del todo claro, se puede observar en la región de interés, que solamente se ve una banda indicada por el cuadro negro. Esta banda se encuentra en los tres productos de PCR y

mide aproximadamente 300pb. Ya que el ADN obtenido de un gel de poliacrilamida es más puro, se puede inferir que la segunda banda que se observaba en la Figura VII.8 es amplificación inespecífica y poca, que al correr en el gel de poliacrilamida se quedó más distribuida en la misma purificación que el gel provee (Green y Sambrook, 2020).

### 3. Implicaciones de la presencia de los genes en el chile mirasol

La observación de los productos de PCR por medio del gel de agarosa indican que los oligonucleótidos presentados por Tanaka y Maki para los genes *tn-1* y *CaCKII* sí amplifican para el chile mirasol. Ya que estos genes se encuentran relacionados con la producción de semilla en el chile Yume-Matsuri, el cual es una variedad de *C. annuum*, es probable que en el chile mirasol también estén relacionados con la producción de semilla. Por lo tanto el siguiente paso para este estudio sería el realizar una secuenciación para comprobar que lo amplificado por los oligonucleótidos sí son los genes buscados. En caso luego de la amplificación, los genes sí sean los deseados, esto implicaría que se podría realizar una edición genética específica para intentar obtener chile mirasol sin semilla. Asimismo, cabe resaltar que estos genes podrían encontrarse en otros chiles *C. annuum*, por lo que si la edición genética en el chile mirasol fuera exitosa, podría abrirse una línea de investigación para esta especie de chile. El gen *CaCKII*, cambia a ser mutante y produce chiles sin semilla cuando se da una inserción de tres pares de base en su genoma, en donde pasa de medir 96pb a medir 99pb (Maki y cols., 2023). Con las novedosas herramientas actuales, como lo es el CRISPR-Cas9, se puede editar el ADN de la planta. Se ha observado que los transcritos de ARN de guía único pueden ser bombardeados a las células inmaduras de la planta, para luego inducir la propagación de callos a partir de estas, seleccionarlas y regenerar las plantas mutantes (Yin, Gao, y Qiu, 2017). Esto resalta la importancia conjunta del estudio realizado, en donde simultáneamente se observó qué medio de cultivo puede ser el más adecuado para la inducción de callo en el chile mirasol, y la probable presencia de genes relacionados a la producción de semilla en el chile mirasol.

---

### Conclusiones

---

1. Se diseñó un protocolo para la propagación del chile mirasol, en donde se describen los métodos de desinfección, así como los reactivos, materiales y técnicas a utilizar durante todo el proceso.
2. Se evaluaron distintos tratamientos de fitohormonas evaluando la efectividad para aumentar la cantidad de callos por explante, en donde se obtuvo que el tratamiento 3, con una concentración en el medio de 2.0mg/L de 2,4-D y 0.5mg/L de Kin fue significativamente mejor para la inducción de callos que el resto de los tratamientos probados.
3. Se identificaron en la literatura genes que podrían estar relacionados a la producción de semilla en *C. annuum*. Entre estos se trabajó con los genes *tn-1* y *CaCKI1*, al ser los que mayor información y sustento tenían en la literatura.
4. Se verificó por medio de PCR que los oligonucleótidos presentados en los artículos para los genes *tn-1* y *CaCKI1* sí amplifican para regiones en el chile mirasol, en donde las bandas tienen tamaños parecidos a los presentados en la literatura.

---

### Recomendaciones

---

1. Se recomienda comparar el crecimiento de callo a partir de explantes de chile mirasol al agregar únicamente la auxina 2,4-D en el medio y omitiendo la kinetina, para observar si la kinetina tiene un efecto en la inducción del callo o solamente la auxina es suficiente para la inducción del mismo.
2. Se recomienda secuenciar los productos de PCR obtenidos luego de la amplificación para comprobar que sean efectivamente los genes buscados. De ser así, se podría continuar con investigaciones para intentar crear una variedad de chile mirasol sin semilla.
3. Se recomienda realizar más investigación acerca del chile mirasol y otros chiles endémicos a la región mesoamericana, ya que hay poca información y no se encuentra actualizada.

- Aguilar-Jiménez, D., Rodríguez-De-la O, J. L., Aguilar-Jiménez, D., y Rodríguez-De-la O, J. L. (2020). Efecto de nitrato de plata en la germinación in vitro de *euphorbia nutans* lag. *Biotecnología Vegetal*, 20(4), 338–350. Descargado 2024-01-01, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2074-86472020000400338&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2074-86472020000400338&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (Publisher: Instituto de Biotecnología de las Plantas)
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, P. L., Roose, M. L., y Kim, S.-C. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*capsicum annuum*; solanaceae) from mexico. *American Journal of Botany*, 96(6), 1190–1202. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3732/ajb.0800155> doi: 10.3732/ajb.0800155
- Aguilar-Støen, M., Taylor, M., y Castellanos, E. (2016). Agriculture, land tenure and international migration in rural guatemala. *Journal of Agrarian Change*, 16(1), 123–144. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/joac.12091> doi: 10.1111/joac.12091
- Aguirre, E., y Muñoz, V. (2015). El chile como alimento. *Ciencia*, 16–23. Descargado de [https://amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/66\\_3/PDF/Chile.pdf](https://amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/66_3/PDF/Chile.pdf)
- Alcantara, T. P., Bosland, P. W., y Smith, D. W. (1996). Ethyl methanesulfonate-induced seed mutagenesis of *capsicum annuum*. *Journal of Heredity*, 87(3), 239–241. Descargado de <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a022992> doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a022992
- Alvarez, F., y Pino, M. T. (2018). Aspectos generales del manejo agronómico del pimiento en chile. *Santiago: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*.(360), 41–58. Descargado de <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6651>
- Amador-Ramírez, M., Velásquez-Valle, R., y Sánchez-Toledano, B. (2013). Efecto del manejo reducido y convencional en chile mirasol en la región norte centro de México. *Bioagro*, 25(2), 129–136. Descargado de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1316-33612013000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1316-33612013000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Amiri, S., y Mohammadi, R. (2021). Establishment of an efficient in vitro propagation protocol for sumac (*rhus coriaria* l.) and confirmation of the genetic homogeneity. *Sci Rep*, 11, 173. Descargado 2023-11-29, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7794432/> doi: 10.1038/s41598-020-80550-4
- Aulakh, P. S., Dhaliwal, M. S., Jindal, S. K., Schafleitner, R., y Singh, K. (2016). Mapping of male sterility gene ms10 in chilli pepper (*capsicum annuum* l.). *Plant Breeding*, 135(4), 531–



535. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pbr.12389> doi: 10.1111/pbr.12389
- bancoadn. (2020). *Programa de control de calidad de muestras de ADN y ARN*. Universidad de Salamanca. Descargado de <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Barciszewski, J., Massino, F., y Clark, B. F. C. (2007). Kinetin—a multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(3), 182–192. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813006002133> doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.024
- Basuchaudhuri, P. (2016). 1-naphthaleneacetic acid in rice cultivation. *Current Science*, 110(1), 52–56. Descargado de <https://www.jstor.org/stable/24906610> (Publisher: Current Science Association)
- Beltrán-Burboa, J. N., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., y Cruz-Huerta, N. (2019). GERMINACIÓN in vitro DE CHILE CHILTEPÍN (capsicum annum l. var. glabriusculum) y REGENERACIÓN POR ORGANOGÉNESIS. *Agrociencia*, 54(2), 195–208. Descargado de <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1901>
- Cabañas, B., Galindo, G., Reveles, M., y Bravo, A. (2006). *Selección, producción y conservación de semilla de cultivares de chile seco*. Tecnología de producción de chile seco. Descargado de [http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/Tecnologia\\_de\\_produccion\\_de\\_chile\\_seco.pdf#page=25](http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/Tecnologia_de_produccion_de_chile_seco.pdf#page=25)
- Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. En P. C. Debergh y R. H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation: Technology and application* (pp. 31–44). Springer Netherlands. Descargado 2023-12-31, de [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_3) doi: 10.1007/978-94-009-2075-0\_3
- Conforti, F., Statti, G. A., y Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (capsicum annum var. acuminatum l.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry*, 102(4), 1096–1104. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814606005371> doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.047
- Crespo Ruiz, C. (2013). Comportamiento agronómico en rendimiento y calidad de fruto en seco de doce poblaciones avanzadas de chile (capsicum annum l.) tipo mirasol. Descargado de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/7360> (Accepted: 2015-10-22T18:19:57Z Publisher: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro)
- Dahm, R. (2005). Friedrich miescher and the discovery of DNA. *Developmental Biology*, 278(2), 274–288. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160604008231> doi: 10.1016/j.ydbio.2004.11.028
- Dairawan, M., y Shetty, P. (2020). The evolution of DNA extraction methods. *AJBSR*, 8(1), 39–45. Descargado de <https://biomedgrid.com/fulltext/volume8/the-evolution-of-dna-extraction-methods.001234.php> doi: 10.34297/AJBSR.2020.08.001234
- Dalila, Z. D., Jaafar, H., y Manaf, A. A. (2012). Effects of 2,4-d and kinetin on callus induction of barringtonia racemosa leaf and endosperm explants in different types of basal media. *Asian J. of Plant Sciences*, 12(1), 21–27. Descargado de <https://www.scialert.net/abstract/?doi=ajps.2013.21.27> doi: 10.3923/ajps.2013.21.27
- Dardón, G. (2004). *Caracterización de la gastronomía guatemalteca en el departamento de sacatepéquez* (Tesis para obtener el título de licenciada en administración de empresas de la hospitalidad). Descargado de <https://glifos.unis.edu.gt/digital/tesis/2004/12849.pdf>
- Dotmatics. (2023). *Geneious*. Descargado 2024-01-03, de <https://www.geneious.com/>
- Doyle, J., y Doyle, J. (1987). A rapid dna isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*(19), 11–15.
- Dürr, J. (2016). Sugar-cane and oil palm expansion in guatemala and its consequences for the regional economy. *Journal of Agrarian Change*, 17(3), 557–570. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/joac.12150> (\_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/joac.12150>) doi: 10.1111/joac.12150
- Feung, C. S., Loerch, S. L., Hamilton, R. H., y Mumma, R. O. (2002). *Comparative metabolic fate of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in plants and plant tissue culture*. Descargado 2024-

- 01-03, de <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf60219a009> (Archive Location: world Publisher: American Chemical Society) doi: 10.1021/jf60219a009
- García Lozano, D. L., Ocampo Guerrero, M. L., y Mesa López, N. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de aspidosperma polyneuron. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 17(2), 76–84. Descargado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/54277> doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277
- Godiska, R. (2013). *Genomic library - an overview | ScienceDirect topics* (second edition ed.). Descargado de <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/genomic-library>
- Green, M. R., y Sambrook, J. (2020). Polyacrylamide gel electrophoresis. *Cold Spring Harb Protoc*, 2020(12). doi: 10.1101/pdb.prot100412
- Gülsüm, A. (2016). Genome analysis of plants. En K. R. Hakeem, H. Tombuloğlu, y G. Tombuloğlu (Eds.), *Plant omics: Trends and applications* (pp. 1–27). Springer International Publishing. Descargado de [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8_1) doi: 10.1007/978-3-319-31703-8\_1
- Harris, D. R., y Fuller, D. Q. (2014). Agriculture: Definition and overview. En C. Smith (Ed.), *Encyclopedia of global archaeology* (pp. 104–113). Springer. Descargado de [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0465-2\\_64](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0465-2_64) doi: 10.1007/978-1-4419-0465-2\_64
- IFAD. (2011). Enabling poor rural people to overcome poverty in guatemala. *International Fund for Agricultural Development*. Descargado de <https://www.ifad.org/documents/10180/16e68b93-2e7f-4804-8385-b8d53d784130>
- Instituto nacional de antropología e historia (INAH). (s.f.). *Regiones culturales*. Mediateca INAH. Descargado de <https://lugares.inah.gob.mx/es/zonas-arqueologicas/regiones-culturales.html#:~:text=Mesoam%C3%A9rica%20tiene%20la%20mayor%20extensi%C3%B3n,Salvador%2C%20Nicaragua%20y%20Costa%20Rica.>
- Irikova, T., Grozeva, S., y Rodeva, V. (2011). Anther culture in pepper (*capsicum annum* l.) in vitro. *Acta Physiol Plant*, 33(5), 1559–1570. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0736-6> doi: 10.1007/s11738-011-0736-6
- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul*, 47(2), 91–110. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s10725-005-3478-x> doi: 10.1007/s10725-005-3478-x
- Kim, H., y Lim, J. (2019). Leaf-induced callus formation in two cultivars: hot pepper ‘CM334’ and bell pepper ‘dempsey’. *Plant Signaling & Behavior*, 14(7), 1604016. Descargado de <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604016> (Publisher: Taylor & Francis \_eprint: <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1604016>) doi: 10.1080/15592324.2019.1604016
- Kim, Y.-K., Kim, S., Shin, Y.-j., Hur, Y.-S., Kim, W.-Y., Lee, M.-S., ... Verma, D. P. S. (2014). Ribosomal protein s6, a target of rapamycin, is involved in the regulation of rRNA genes by possible epigenetic changes in arabidopsis\*. *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), 3901–3912. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002192582044178X> doi: 10.1074/jbc.M113.515015
- Laboratorio de Protección Vegetal. (s.f.). *EXTRACCIÓN ADN a PARTIR DE TEJIDO VEGETALY CULTIVOS FÚNGICOS*. Universidad del valle de Guatemala.
- Laborde Cancino, J. A. C., y Compodonico, O. P. (Eds.). (1984). *PRESENTE y PASADO DEL CHILE EN MEXICO*. SARH.
- Lima Montenegro, O. A. (2008). *Estudio de la capacidad antioxidante de chiles (capsicum spp) autóctonos de guatemala y el efecto de procesamiento*. (Thesis). Descargado de <https://repositorio.uvg.edu.gt/xmlui/handle/123456789/324> (Accepted: 2016-07-06T22:16:04Z)
- Lopez, R. M. (2017). EFECTO DE LA APLICACIÓN DE NIVELES DE ÁCIDO ALFA NAF-TALENACÉTICO EN EL ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES DE LIGUSTRO (*ligustrum ovalifolium hassk*) BAJO AMBIENTE PROTEGIDO EN VIACHA.
- Lopez-Ridaura, S., Barba-Escoto, L., Reyna, C., Hellin, J., Gerard, B., y van Wijk, M. (2019). Food security and agriculture in the western highlands of guatemala. *Food Sec.*, 11(4), 817–833. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s12571-019-00940-z> doi: 10.1007/s12571-019-00940-z

- Luscombe, N. M., Greenbaum, D., y Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics? an introduction and overview. *Yearb Med Inform*, 10(1), 83–100. Descargado de <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1638103> (Publisher: Georg Thieme Verlag KG) doi: 10.1055/s-0038-1638103
- MAGA. (2016). *Chile pimienta*. Descargado de [https://www.maga.gob.gt/sitios/diplan/download/informacion\\_del\\_sector/agro\\_en\\_cifras/2016/individuales/Chile%20pimiento%20Agro%20en%20Cifras%202016.pdf](https://www.maga.gob.gt/sitios/diplan/download/informacion_del_sector/agro_en_cifras/2016/individuales/Chile%20pimiento%20Agro%20en%20Cifras%202016.pdf)
- Maki, T., Kusaka, H., Matsumoto, Y., Yamazaki, A., Yamaoka, S., Ohno, S., ... Tanaka, Y. (2023). The mutation of CaCKI1 causes seedless fruits in chili pepper (*capsicum annuum*). *Theor Appl Genet*, 136(4), 85. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04342-w> doi: 10.1007/s00122-023-04342-w
- Martinez, J. (1995). *Guatemala: Informe nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos (leipzig, 1996)*. Descargado de <https://www.fao.org/pgrfa-gpa-archive/gtm/pdfs/guatemala.pdf>
- Martínez-Andújar, C., Martín, R. C., y Nonogaki, H. (2011, 08). Seed Traits and Genes Important for Translational Biology—Highlights from Recent Discoveries. *Plant and Cell Physiology*, 53(1), 5–15. Descargado de <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr112> doi: 10.1093/pcp/pcr112
- Miller, A., y Schaal, B. (2005). Domestication of a mesoamerican cultivated fruit tree, *spondias purpurea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12801–12806. Descargado de <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0505447102> (Publisher: Proceedings of the National Academy of Sciences) doi: 10.1073/pnas.0505447102
- minitab. (s.f.). *Comprar minitab, engage, quality trainer y más - costo de la licencia | minitab*. Descargado 2024-01-03, de <https://www.minitab.com/es-mx/try-buy/>
- Mroginski, L., Echenique, D. V., Rubinstein, D. C., Hopp, D. E., y Levitus, D. G. (2004). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. , 17–25.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x> (\_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>) doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Méndez, W., Galluzzi, G., y Say, E. (2015). *La importancia de los intercambios internacionales de recursos fitogenéticos para la mejora de los cultivos en guatemala* [Working Paper]. Descargado de <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/72439> (Accepted: 2016-03-03T13:46:04Z)
- Méhot, J., y Bennett, E. M. (2018). Reconsidering non-traditional export agriculture and household food security: A case study in rural guatemala. *PLOS ONE*, 13(5), e0198113. Descargado de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0198113> (Publisher: Public Library of Science) doi: 10.1371/journal.pone.0198113
- Nature portafolio. (2023). *Genomic analysis articles from across nature portfolio*. Descargado de <https://www.nature.com/subjects/genomic-analysis#:~:text=Genomic%20analysis%20is%20the%20identification,annotation%20at%20a%20genomic%20scale>.
- NCBI. (2017). *Capsicum annuum genome assembly UCD10xv1.1*. Descargado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF\\_002878395.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF_002878395.1/)
- Nierman, W. C., y Feldblyum, T. V. (2001). Genomic library. En S. Brenner y J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of genetics* (pp. 865–872). Academic Press. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0122270800005590> doi: 10.1006/rwgn.2001.0559
- NIH. (2019). *Secuenciación del ADN*. Descargado de <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
- Norouzi, O., Hesami, M., Pepe, M., Dutta, A., y Jones, A. M. P. (2022). In vitro plant tissue culture as the fifth generation of bioenergy. *Sci Rep*, 12(1), 5038. Descargado de <https://www.nature.com/articles/s41598-022-09066-3> (Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group) doi: 10.1038/s41598-022-09066-3
- Ogihara, Y., y Tsunewaki, K. (1978). Tissue culture in *Haworthia*. *Bot Mag Tokyo*, 91(1), 83–91. Descargado 2024-01-03, de <https://doi.org/10.1007/BF02489105> doi: 10.1007/BF02489105

- Okazawa, Y., Katsura, N., y Tagawa, T. (1967). Effects of auxin and kinetin on the development and differentiation of potato tissue cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 20(4), 862–869. Descargado 2024-01-03, de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1967.tb08373.x> (\_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1399-3054.1967.tb08373.x>) doi: 10.1111/j.1399-3054.1967.tb08373.x
- Ortega, N. (2020). *Análisis de la expresión de genes en pimiento (capsicum annum) en respuesta a deficiencia de fósforo en raíz* (Tesis de master en mejora genética vegetal).
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., y Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet*, 52(4), 413–435. doi: 10.1007/s13353-011-0057-x
- Park, S.-i., Kim, H.-B., Jeon, H.-J., y Kim, H. (2021). Agrobacterium-mediated capsicum annum gene editing in two cultivars, hot pepper CM334 and bell pepper dempsey. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3921. Descargado de <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/3921> (Number: 8 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute) doi: 10.3390/ijms22083921
- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., y Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237–246. Descargado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0187-893X2013000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-893X2013000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (Publisher: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química)
- Phillips, G. C., y Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 55(3), 242–257. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5> doi: 10.1007/s11627-019-09983-5
- Pickersgill, B. (1991). 8 - cytogenetics and evolution of capsicum l. En T. Tsuchiya y P. K. Gupta (Eds.), *Developments in plant genetics and breeding* (Vol. 2, pp. 139–160). Elsevier. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444882608500136> doi: 10.1016/B978-0-444-88260-8.50013-6
- Poeaim, A., Poeaim, S., Poraha, R., Pongjaroenkit, S., y Pongthongkam, P. (2016). Optimization for callus induction and plant regeneration from mature seeds of thai rice variety: Nam roo (oryza sativa l.). *bb*, 4(5), 95–99. Descargado de [http://www.hrpub.org/journals/article\\_info.php?aid=5520](http://www.hrpub.org/journals/article_info.php?aid=5520) doi: 10.13189/bb.2016.040504
- Promega. (s.f.). *GoTaq® reaction buffers for PCR*. Descargado 2023-12-12, de <https://worldwide.promega.com/es-es/products/pcr/taq-polymerase/gotaq-reaction-buffers/>
- Rojas, D. (2023). *Desarrollo de protocolo de tejidos en solanum lycopersicum, análisis bioinformático de tobrfv y diseño de material genético para transformación*. Universidad del Valle de Guatemala. (En proceso de publicación)
- Smith, M. (2023). *Polymerase chain reaction (PCR)*. Descargado de <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Polymerase-Chain-Reaction>
- Song, Y. (2014). Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(2), 106–113. Descargado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jipb.12131> (\_eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jipb.12131>) doi: 10.1111/jipb.12131
- Swamy, B. N., Hedau, N. K., G.v., C., Kant, L., y Pattanayak, A. (2017). CMS system and its stimulation in hybrid seed production of capsicum annum l. *Scientia Horticulturae*, 222, 175–179. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423817303059> doi: 10.1016/j.scienta.2017.05.023
- Swapan, c., A K M Mominul, I., y A K M Aminul, I. (2017). Nutritional benefits and pharmaceutical potentialities of chili: A review. , 2(2), 227–232. Descargado de <http://www.f2ffoundation.org/faa/index.php/home/article/view/74>
- Tahir, S. M., Victor, K., y Abdulkadir, S. (2011). The effect of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-d) concentration on callus induction in sugarcane (saccharum officinarum). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 19(2). Descargado de <https://www.ajol.info/index.php/njbas/article/view/73846> (Number: 2) doi: 10.4314/njbas.v19i2
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de

- la polimerasa (pcr) y de la pcr en tiempo real. *Tecnología en salud*, 2(2), 39–45. Descargado de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tanaka, Y., Mitani, A., Shimizu, N., Goto, T., Yoshida, Y., y Yasuba, K.-i. (2021). Characterization and bulk segregant analysis of a novel seedless mutant tn-1 of chili pepper (*capsicum annuum*). *Scientia Horticulturae*, 276, 109729. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423820305574> doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109729>
- Tendencia, bosques y medios de vida en el altiplano de Guatemala. (s.f.). *Recomendaciones de política*. Descargado de [https://www2.cifor.org/tenure-reform/data/files/guatemala/policy\\_briefs/pb\\_guatemala1.pdf](https://www2.cifor.org/tenure-reform/data/files/guatemala/policy_briefs/pb_guatemala1.pdf)
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol*, 37(2), 169–180. doi: 10.1007/s12033-007-0031-3
- Ticona Aliaga, J., y Triguero Triguero, M. L. (s.f.). Evaluación de tres métodos de desinfección para el establecimiento in vitro de papaya (carica papaya l.) en la estación experimental sapecho. , 6(1), 24–29. Descargado 2023-11-30, de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2409-16182019000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2409-16182019000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (Publisher: Universidad Mayor de San Andrés)
- Tiznado Hernández, M. E., Miranda Jiménez, A., Ojeda Contreras, J., Sánchez Estrada, A., Arreola Ortiz, H. J., y Martínez Díaz, G. (2015). Desarrollo de nuevas variedades de uva (*vitis vinifera* l.) sin semilla mediante rescate de embriones. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 917–928. Descargado de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2007-09342015000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-09342015000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es) (Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias)
- Umamaheswa, A., y Lalitha, V. (2007). In vitro effect of various growth hormones in capsicum annuum l. on the callus induction and production of capsaicin. *J. of Plant Sciences*, 2(5), 545–551. Descargado de <https://www.scialert.net/abstract/?doi=jps.2007.545.551> doi: 10.3923/jps.2007.545.551
- Valenta, K., Nevo, O., Martel, C., y Chapman, C. (2017). Plant attractants: integrating insights from pollination and seed dispersal ecology. *Evol. Ecol.*, 31(8), 249–267.
- Velásquez-Valle, R., Villa-Ruano, N., Hidalgo-Martínez, D., Zepeda-Vallejo, L. G., Pérez-Hernández, N., Reyes-López, C. A., ... Becerra-Martínez, E. (2020). Revealing the 1h NMR metabolome of mirasol chili peppers (*capsicum annuum*) infected by *candidatus phytoplasma trifolii*. *Food Research International*, 131, 108863. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919307495> doi: 10.1016/j.foodres.2019.108863
- Vásquez-Flota, F., Miranda-Ham, M., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velásquez-García, C., y Nieto-Pelayo, Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Rev. Fitotec*, 30(4), 353–360. Descargado de <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/30-4/2r.pdf>
- Wang, D., y Bosland, P. (2006). The genes of capsicum. *HortScience*, 41(5), 1169–1187. Descargado de <https://journals.ashs.org/downloadpdf/journals/hortsci/41/5/article-p1169.pdf>
- Yin, K., Gao, C., y Qiu, J.-L. (2017). Progress and prospects in plant genome editing. *Nature plants*, 3(8), 1–6.
- Zheng, M. Y., y Konzak, C. F. (1999). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*triticum aestivum* l.). *Plant Cell Reports*, 19(1), 69–73. Descargado de <https://doi.org/10.1007/s002990050712> doi: 10.1007/s002990050712

## A. Anexo I

### 1. POE I: Preparación de medios de cultivo con distintas hormonas para tratamientos

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Código del POE                | I   |
| Área                          | Cultivo de tejidos  |
| Versión                       | Primera   |
| Idioma                        | Español   |
| Título                        | Preparación de medios de cultivo con distintas hormonas para tratamientos |
| Escrito por<br>Fecha y firma  | Adriana Gil<br>30 de julio del 2023                                       |
| Revisado por<br>Fecha y firma |   |
| Revisado por<br>Fecha y firma |   |

#### 1. Propósito

Realizar medios de cultivo con distintas concentraciones de fitohormonas para los distintos tratamientos a los que se expondrán los explantes de chile mirasol.

#### 2. Aplicación

Las fitohormonas en medios de cultivo pueden ayudar a la planta a propagarse y crecer de mejor manera, por lo que la experimentación con distintas concentraciones de las mismas busca determinar qué concentraciones son ideales para el objetivo del estudio. En este caso la generación de callos a partir de explantes de hoja.

### 3. Referencias

Beltrán-Burboa, J. N., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., y Cruz-Huerta, N. (2019). Germinación *in vitro* de chile chiltepin (*capsicum annuum l. var. glabriusculum*) y regeneración por organogénesis. *Agrociencia*, 54(2), 195–208. Descargado de <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1901>

Umamaheswa, A., y Lalitha, V. (2007). In vitro effect of various growth hormones in *capsicum annuum l.* on the callus induction and production of capsaicin. *J. of Plant Sciences*, 2(5), 545-551. Descargado de <https://www.scialert.net/abstract/?doi=jps.2007.545.551> doi: 10.3923/jps.2007.54.551

### 4. Terminología y abreviaciones

- Medio MS: Medio Murashige y Skoog.
- ANA: ácido 1-naftalenacético
- 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- Kin: Kinetina

### 5. Principio

La prueba de distintos medios de cultivo con diferentes concentraciones de fitohormonas permitirá determinar qué combinaciones serán las ideales para el crecimiento de callos a partir de explantes de hoja de chile mirasol.

### 6. Seguridad

Uso de guantes y bata de laboratorio mientras se manipulen los distintos reactivos.

### 7. Equipos materiales y reactivos

#### Equipo y materiales

- Bote para medio de cultivo
- Probeta de 10, 100 y 1000mL
- Beaker de 250mL
- Micropipeta de 1000 $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 1000 $\mu$ L
- Agitador magnético
- Frijol magnético
- Balanza analítica
- Barco de pesaje
- Autoclave

- Caja magenta estériles
- pHímetro
- Pizeta
- Kimwipe®
- Tape indicador de autoclave
- Campana de flujo laminar
- Parafilm

### Reactivos

- Solución stock de macronutrientes estéril ( 16.5g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 19.0 g/L  $\text{KNO}_3$ , 3.7g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1.7g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 4.40g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )
- Solución stock de micronutrientes estéril (6.2g/L  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , 16.9g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 8.6g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.25g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.025g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.025g/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  y 0.83g/L KI)
- Solución stock de vitaminas estéril (2.50g/L tiamina · HCl, 0.25g/L ácido nicotínico, 0.25g/L Piridoxina · HCl y 25.00g/L Myo-inositol)
- Solución stock de calcio estéril (0.33g/10mL Ca)
- Solución stock estéril de Hierro (Disolver 0.373g/100mL  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  con agua desmineralizada y un poco de calor, agregar 0.278g/100mL  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , solución final debe ser amarilla. Cubrir con aluminio para evitar oxidación.)
- Agua desmineralizada
- Sacarosa
- Solución de ácido 1-naftalenacético stock (1mg/10mL ANA)
- Solución de Kinetina stock (1mg/mL Kin, para 10mL diluir 0.1gKin en 1mL NaOH 1M y agregar 9mL  $\text{H}_2\text{O}$  estéril)
- Solución de ácido 2,4-diclorofenoxiacético stock (1mg/5mL 2.4D)
- Gel rite
- Luna®Experience 40SC
- HCL 0.2M
- NaOH 0.2M

### 8. Procedimiento

1. En total se realizarán siete (7) distintos medios de cultivo, el procedimiento general es para un litro de cualquiera de estos medios.
2. Para realizar un litro de medio, tomar un bote para medio de cultivo y colocar en un agitador con un frijol magnético.
3. Pesar 30g de sacarosa y agregar al bote.



4. Medir 100mL de solución de macronutrientes y agregar.
5. Medir 1mL de solución de micronutrientes y agregar.
6. Medir 2mL de solución de vitaminas y agregar.
7. Medir 10mL de solución de calcio y agregar.
8. Medir 10mL de solución de hierro y agregar.
9. Llevar a un (1) litro con agua desmineralizada.
10. Agregar 900 $\mu$ L de Luna<sup>®</sup>Experience 40SC.
11. Agitar hasta que todos los componentes estén completamente disueltos.
12. Mientras se encuentre en agitación medir el pH.
13. Tomar con cuidado el pHímetro y lavar el bulbo con agua desmineralizada, secar con pequeños toques con una kimwipe<sup>®</sup>.
14. Colocar el pHímetro dentro del medio y medir.
15. Mientras se encuentra en agitación, agregar gota a gota NaOH 0.2M, hasta llevar el medio a un pH de 5.7, si el pH es muy básico, agregar gotas HCl 0.2M.
16. Agregar la cantidad adecuada de fitohormonas para cada medio según la siguiente tabla.
17. Pesar 2g de gel rite y agregar al medio.
18. Agitar bien el medio hasta que el gel rite se encuentre lo más disuelto posible, no se disolverá completamente.
19. Colocar tape indicador de autoclave al bote, sacar el frijol magnético y cerrar.
20. Llevar a la autoclave durante 15 minutos.
21. Durante el proceso de autoclave, desinfectar con etanol al 70% y 15 minutos de luz UV la campana de flujo laminar.
22. Introducir las cajas magenta, limpiando cada una con etanol al 70%.
23. Aflojar la tapa de las cajas magenta, con cuidado de no tocar el interior de la misma.
24. Sacar los medios de la autoclave con guantes.
25. Limpiar los botes con medio con etanol al 70% antes de introducirlos a la campana de flujo laminar.
26. Servir los medios hasta la línea marcada en la magenta, aproximadamente 9mL de medio por magenta.
27. Dejar que los medios se solidifiquen sin sus tapaderas para evitar condensación.
28. Una vez solidificado el medio, tapar las magentas y sellar con parafilm.
29. Identificar y guardar en un ambiente limpio.

| Tratamiento             | ANA           |         | 2,4-D         |         | Kin           |             |
|-------------------------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|-------------|
|                         | Concentración | Volumen | Concentración | Volumen | Concentración | Volumen     |
| Tratamiento 1 - control | -             | -       | -             | -       | -             | -           |
| Tratamiento 2           | 0.2mg/L       | 2mL     | -             | -       | 0.5mg/L       | 500 $\mu$ L |
| Tratamiento 3           | -             | -       | 2.0mg/L       | 10mL    | 0.5mg/L       | 500 $\mu$ L |
| Tratamiento 4           | 0.45mg/L      | 7.5mL   | -             | -       | 0.5mg/L       | 500 $\mu$ L |
| Tratamiento 5           | -             | -       | -             | -       | 0.5mg/L       | 500 $\mu$ L |
| Tratamiento 6           | -             | -       | -             | -       | 1.0mg/L       | 1mL         |
| Tratamiento 7           | -             | -       | -             | -       | 1.5mg/L       | 1.5mL       |

Cuadro XII.1: Concentraciones y volúmenes de fitohormonas a utilizar para un (1) litro de medio de cultivo por tratamiento

## 9. Cálculos

Cálculo para determinar la concentración y dilución de fitohormonas.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Concentración / dilución inicial

V<sub>1</sub>: Volumen a determinar

C<sub>2</sub>: Concentración / dilución a la que se quiere llegar

V<sub>2</sub>: Volumen que se quiere utilizar

## 10. Control de calidad

Para confirmar que el medio se encuentra completamente estéril, se debe realizar al menos tres días previo al uso, para observar si hay algún tipo de crecimiento por contaminación. De igual manera revisar siempre los medios antes de utilizarlos por cualquier contaminación que pueda haber en los mismos.

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar el volumen realizado, la fecha que se realizó y el pH final del medio.

# B. Anexo II

## 1. POE II: Desinfección, siembra y cuidado de semilla de chile mirasol

### 1. Propósito

Cultivar las semillas *in vitro* para observar como se desarrolla la planta en un medio de cultivo Murishage y Skoog, observando principalmente el tiempo de germinación y forma de raíces.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Código del POE                | II  |
| Área                          | Cultivo de tejidos  |
| Versión                       | Primera   |
| Idioma                        | Español   |
| Título                        | Desinfección, siembra y cuidado de semilla de chile mirasol |
| Escrito por<br>Fecha y firma  | Adriana Gil<br>30 de julio del 2023                         |
| Revisado por<br>Fecha y firma |   |
| Revisado por<br>Fecha y firma |   |

## 2. Aplicación

Observar las fases y tiempo de la germinación del chile mirasol en ambiente estéril de laboratorio.

## 3. Referencias

Beltrán-Burboa, J. N., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., y Cruz-Huerta, N. (2019). Germinación *in vitro* de chile chiltepin (*capsicum annuum l. var. glabriusculum*) y regeneración por organogénesis. *Agrociencia*, 54(2), 195–208. Descargado de <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1901>

## 4. Terminología y abreviaciones

- Medio Ms: Medio Murashige y Skoog
- *C. annuum*: *Capsicum annuum*
- NaClO: Hipoclorito de sodio
- EtOH: Etanol

## 5. Principio

La siembra en medio de cultivo estéril va a poder proveer a la semilla con las condiciones ideales de germinación, y la descontaminación de la semilla antes de sembrar asegurará que no hay microorganismos que puedan interferir con el crecimiento de la misma al infectar a la semilla o al medio.

## 6. Seguridad

Uso de guantes y bata de laboratorio en todo momento.

## 7. Equipos materiales y reactivos

**Equipo y materiales**

- Bolsas de oganza
- Beaker
- Agitador magnético
- Frijol magnético
- Pinza grande estéril
- Pinza mediana estéril
- Mechero
- Campana de flujo laminar
- Caja Petri estéril
- Mayordomo estéril
- Parafilm
- Masking tape

### **Reactivos**

- Hipoclorito de sodio al 0.4 % (diluido al 10 % a partir del producto comercial que se encuentra al 4 %)
- Etanol al 70 %
- Etanol al 95 % en tubo de ensayo
- Agua desmineralizada estéril
- Cajas magenta con medio de cultivo MS

### **8. Procedimiento**

1. Colocar dos semillas de *C. annuum* por bolsa de oganza.
2. Con cuidado introducir las bolsas de oganza al beaker de forma que las cintas queden afuera. Pegar las cintas con masking tape al beaker.
3. Agregar la solución de NaClO % al beaker. Colocar el frijol magnético y poner en agitación durante 1 minuto.
4. Descartar el cloro con cuidado de que no se salgan las semillas.
5. Agregar la solución de EtOH al 70 % al beaker. Poner en agitación durante 1 minuto.
6. Mientras se encuentre con etanol, ingresar a la campana previamente desinfectada.
7. Dentro de la campana, lavar tres veces con agua desmineralizada estéril.
8. Colocar una tapa de la caja petri, en donde la parte de adentro quede viendo hacia arriba.
9. Con una pinza estéril tomar un pedazo de mayordomo estéril y colocarlo sobre la caja petri.
10. Con la ayuda de las pinzas, sacar la semilla de la bolsa de oganza y colocar en el mayordomo. Secar la semilla.

11. Con las pinzas, colocar la semilla dentro de la magenta, de forma que la mitad de la semilla se encuentre dentro del medio de cultivo y la otra mitad se encuentre afuera del mismo.
12. Esterilizar la pinza utilizada con ayuda del EtOH al 95 % y el mechero. Esterilizar la pinza entre cada semilla a sembrar.
13. Repetir del paso 9 al paso 12 hasta terminar de sembrar todas las semillas.
14. Sembrar un máximo de 5 semillas por caja, procurando que haya espacio suficiente entre ellas.
15. Colocar las cajas con semillas sembradas en un ambiente oscuro durante 14 días o hasta que las semillas germinen.
16. Una vez germinadas las semillas colocar a la luz con intervalos de 12 horas.

## 9. Cálculos

Cálculo para determinar la dilución de los reactivos

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Concentración / dilución inicial

V<sub>1</sub>: Volumen a determinar

C<sub>2</sub>: Concentración / dilución a la que se quiere llegar

V<sub>2</sub>: Volumen que se quiere utilizar

## 10. Control de calidad

La desinfección se dio de manera exitosa si el medio de cultivo no se contamina. En caso alguna semilla se contamine con bacteria, desinfectar en la campana de flujo laminar sacando a la semilla de la caja, pasarla por EtOH al 70 %, lavar con agua estéril, luego secar con papel mayordomo estéril y colocar en una nueva caja con medio de cultivo. En caso se contamine con hongo, y se encuentre al inicio de la infección, se pueden salvar el resto de las semillas que se encuentran en esa misma caja con el procedimiento descrito para desinfección para infección por bacteria. La semilla de donde provenga la infección con hongo debe descartarse junto con el medio contaminado.

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados

Anotar la cantidad de semillas sembradas por caja y colocar a cada caja un nombre o código para su identificación. Anotar el día de germinación y el avance en el crecimiento de la planta.

# C. Anexo III

## 1. POE III: Desinfección y siembra de explantes de hojas de chile mirasol

### 1. Propósito

Sembrar explantes de chile mirasol en distintos tratamientos de fitohormonas para observar inducir la producción de callos, así como observar de manera cualitativa y cuantitativa que tratamiento fitohormonal produce callos en manera más corta y/o de mayor tamaño.

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Código del POE                | III   |
| Área                          | Cultivo de tejidos  |
| Versión                       | Primera   |
| Idioma                        | Español   |
| Título                        | Desinfección y siembra de explantes de hojas de chile mirasol |
| Escrito por<br>Fecha y firma  | Adriana Gil<br>30 de julio del 2023                           |
| Revisado por<br>Fecha y firma |   |
| Revisado por<br>Fecha y firma |   |

## 2. Aplicación

Poder cultivar y propagar el chile mirasol sin necesidad de una semilla.

## 3. Referencias

Beltrán-Burboa, J. N., López-Peralta, M. C. G., Hernández-Meneses, E., y Cruz-Huerta, N. (2019). Germinación in vitro de chile chiltepin (*capsicum annuum* l. var. *glabriusculum*) y regeneración por organogénesis. *Agrociencia*, 54(2), 195–208. Descargado de <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1901>

García Lozano, D. L., Ocampo Guerrero, M. L., y Mesa López, N. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *aspidosperma polyneuron*. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 17(2), 76–84. Descargado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/54277> doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.54277

Park, S.-i., Kim, H.-B., Jeon, H.-J., y Kim, H. (2021). *Agrobacterium*-mediated *capsicum annuum* gene editing in two cultivars, hot pepper CM334 and bell pepper dempsey. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3921. Descargado de <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/8/3921> (Number: 8 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute) doi: 10.3390/ijms22083921

Umamaheswa, A., y Lalitha, V. (2007). In vitro effect of various growth hormones in *capsicum annuum* l. on the callus induction and production of capsaicin. *J. of Plant Sciences*, 2(5), 545551. Descargado de <https://www.scialert.net/abstract/?doi=jps.2007.545.551> doi: 10.3923/jps.2007.545.551

## 4. Terminología y abreviaciones

- T1: Tratamiento 1 o control, medio MS sin fitohormonas.
- T2: Tratamiento 2, medio MS con 0.2mg/L ANA y 0.5mg/L Kin.
- T3: Tratamiento 3, medio MS con 2.0mg/L 2,4-D y 0.5mg/L Kin.
- T4: Tratamiento 4, medio MS con 0.75mg/L ANA y 0.5mg/L Kin.
- T5: Tratamiento 5, medio MS con 0.5mg/L Kin.
- T6: Tratamiento 6, medio MS con 1.0mg/L Kin.
- T7: Tratamiento 7, medio MS con 1.5mg/L Kin.

- EtOH: Etanol

## 5. Principio

Las fitohormonas a distintas concentraciones y en distintas combinaciones puede inducir el crecimiento de las plantas, así como la formación de callos de células madre.

## 6. Seguridad

Uso de guantes y bata de laboratorio en todo momento.

## 7. Equipos materiales y reactivos

### Equipo y materiales

- Medios de cultivo (T1, T2, T3, T4, T5 y T6)
- Tijeras estériles
- Bolsa ziploc
- Agitador magnético
- Frijol magnético
- Bolsas de oganza estériles
- Beaker de 600mL
- Pinzas grandes estériles
- Pinzas medianas estériles
- Bisturí estéril
- Cuchilla estéril
- Mayordomo estéril
- Caja petri estéril
- Mechero
- cuadros 1\*1 estériles
- Maskin tape
- Campana de flujo laminar

### Reactivos

- EtOH al 70 %
- Cloro al 1 %
- Tween 20 (®)
- Banrot (®)(0.5g/L)
- Agua desmineralizada estéril

## 8. Procedimiento

1. Cortar hojas de la planta de chile mirasol, preferiblemente hojas jóvenes.
2. Lavar cada hoja con cuidado bajo el chorro, procurando quitarle cualquier resto de tierra o suciedad.
3. Colocar cada hoja en una bolsa de oganza y ponerlas de manera ordenada en un beaker. Todas las cintas deben quedar afuera, pegándolas en el beaker con maskin tape. Esto para mantener las bolsas y las hojas todo el tiempo en su lugar.
4. Llenar el beaker con agua desmineralizada, colocar de 1 a 2 gotas de Tween® por cada 100mL y poner en agitación durante 10 minutos.
5. Lavar tres veces con agua desmineralizada.
6. Agregar cloro al 1% y colocar en agitación durante 10 minutos.
7. Lavar tres veces con agua desmineralizada.
8. Agregar Banrot ®(0.5g/L) y colocar en agitación durante 10 minutos.
9. Lavar una vez con agua desmineralizada.
10. Agregar etanol al 70% durante un minuto e ingresar con el etanol a la campana de flujo laminar.
11. Lavar tres veces con agua estéril.
12. En una caja petri estéril colocar mayordomo estéril.
13. Con ayuda de las pinzas estériles, sacar la hoja de la bolsa de oganza, y colocarla en el mayordomo.
14. Secar la hoja con ayuda del mayordomo.
15. Colocar cuadrados estériles 1\*1 sobre la hoja y utilizarlos como guía para cortar cuadrados con el bisturí en la hoja.
16. Colocar cada cuadrado en el agar, poniendo cuatro cuadrados por caja magenta.
17. Cerrar las cajas y sellar con parafilm, colocar cuatro cuadros por caja.
18. Colocar las cajas debidamente rotuladas bajo la luz.

## 9. Cálculos

Cálculo para determinar la dilución de los reactivos

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Concentración / dilución inicial

V<sub>1</sub>: Volumen a determinar

C<sub>2</sub>: Concentración / dilución a la que se quiere llegar

V<sub>2</sub>: Volumen que se quiere utilizar



## 10. Control de calidad

La desinfección se dio de manera exitosa si el medio de cultivo no se contamina. En caso algún explante se contamine con bacteria, desinfectar en la campana de flujo laminar sacando cada explante de la caja, pasarlos por EtOH al 70 %, lavar con agua estéril, luego secar con papel mayordomo estéril y colocar en una nueva caja con medio de cultivo. En caso se contamine con hongo, y se encuentre al inicio de la infección, se pueden salvar el resto de los explantes que se encuentran en esa misma caja con el procedimiento descrito para desinfección para infección por bacteria. El explante de donde provenga la infección con hongo debe descartarse junto con el medio contaminado.

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados

Colocar en un cuaderno de laboratorio anotaciones, en donde se indique si hay contaminación, cambio de color y crecimiento de callo.

## D. Anexo IV

### 1. POE IV: Medición y enraizamiento de callos

|                               |                                     |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| Código del POE                | IV                                  |
| Área                          | Cultivo de tejidos                  |
| Versión                       | Primera                             |
| Idioma                        | Español                             |
| Título                        | Medición y enraizamiento de callos  |
| Escrito por<br>Fecha y firma  | Adriana Gil<br>30 de julio del 2023 |
| Revisado por<br>Fecha y firma |                                     |
| Revisado por<br>Fecha y firma |                                     |

#### 1. Propósito

Que los callos previamente formados puedan formar raíz y convertirse así en una planta.

#### 2. Aplicación

Culminar el proceso de propagación de chile mirasol por cultivo de tejido al tener raíces y crecimiento vegetal como resultado.

#### 3. Referencias

Deng, X., Xiong, Y., Li, J., Yang, D., Liu, J., Sun, H., . . . Yang, M. (2020). The establishment of an efficient callus induction system for lotus (*Nelumbo nucifera*). *Plants*, 9 (11), 1436. Descargado de <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/11/1436> (Number: 11 Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute) doi: 10.3390/plants9111436

#### 4. Terminología y abreviaciones

Medio ME: Medio de enraizamiento

ANA: ácido 1-naftalenacético

EtOH: Etanol

#### 5. Principio

El trasplante de los callos a un medio de enraizamiento con ANA va a inducir la producción de raíz y crecimiento de la planta a partir del callo.

#### 6. Seguridad

Uso de bata y guantes durante todo el trabajo en el laboratorio.

#### 7. Equipos materiales y reactivos

##### Equipo y materiales

- Bote para medio de cultivo
- Probeta de 10, 100 y 1000mL
- Beaker de 250mL
- Micropipeta de 1000 $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 1000 $\mu$ L
- Agitador magnético
- Frijol magnético
- Balanza analítica
- Barco de pesaje
- Autoclave
- Cajas magenta estériles
- pHímetro
- Pizeta
- Kimwipe®
- Tape indicador de autoclave
- Campana de flujo laminar
- Parafilm
- Bisturí estéril

- Pinzas medianas estériles
- Pinzas grandes estériles
- Vernier
- Caja petri estéril
- Mayordomo estéril
- Beaker estéril
- Cajas magenta con callos crecidos en tratamientos previos

### Reactivos

- Solución stock de macronutrientes estéril ( 16.5g/L  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 19.0 g/L  $\text{KNO}_3$ , 3.7g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 1.7g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 4.40g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )
- Solución stock de micronutrientes estéril (6.2g/L  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , 16.9g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 8.6g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.25g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.025g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.025g/L  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  y 0.83g/L KI)
- Solución stock de vitaminas estéril (2.50g/L tiamina\*HCl, 0.25g/L ácido nicotínico, 0.25g/L Piridoxina\*HCl y 25.00g/L Myo-inositol)
- Solución stock de calcio estéril (0.33g/10mL Ca)
- Solución stock estéril de Hierro (Disolver 0.373g/100mL  $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  con agua desmineralizada y un poco de calor, agregar 0.278g/100mL  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , solución final debe ser amarilla. Cubrir con aluminio para evitar oxidación.)
- Agua desmineralizada
- Agua desmineralizada estéril
- Sacarosa
- Solución de ácido 1-naftalenacético stock (1mg/10mL ANA)
- Gel rite
- Luna®Experience 40SC
- HCl 0.2M
- NaOH 0.2M
- EtOH al 70 %

## 8. Procedimiento

### Preparación de medio de cultivo

1. Para realizar un litro de medio, tomar un bote para medio de cultivo y colocar en un agitador con un frijol magnético.
2. Pesar 30g de sacarosa y agregar al bote.
3. Medir 100mL de solución de macronutrientes y agregar.

4. Medir 1mL de solución de micronutrientes y agregar.
5. Medir 2mL de solución de vitaminas y agregar.
6. Medir 10mL de solución de calcio y agregar.
7. Medir 10mL de solución de hierro y agregar.
8. Llevar a un (1) litro con agua desmineralizada.
9. Agregar 900 $\mu$ L de Luna<sup>®</sup>Experience 40SC.
10. Agitar hasta que todos los componentes estén completamente disueltos.
11. Mientras se encuentre en agitación medir el pH.
12. Tomar con cuidado el pHímetro y lavar el bulbo con agua desmineralizada, secar con pequeños toques con una kimwipe<sup>®</sup>.
13. Colocar el pHímetro dentro del medio y medir.
14. Mientras se encuentra en agitación, agregar gota a gota NaOH 0.2M, hasta llevar el medio a un pH de 5.7, si el pH es muy básico, agregar gotas HCl 0.2M.
15. Agregar 5mL de ANA a partir del stock para tener una concentración de 0.5mg/L de la hormona en el medio.
16. Pesar 2g de gel rite y agregar al medio.
17. Agitar bien el medio hasta que el gel rite se encuentre lo más disuelto posible, no se disolverá completamente.
18. Colocar tape indicador de autoclave al bote, sacar el frijol magnético y cerrar.
19. Llevar a la autoclave durante 15 minutos.
20. Durante el proceso de autoclave, desinfectar con EtOH al 70 % y 15 minutos de luz UV la campana de flujo laminar.
21. Introducir las cajas magenta, limpiando cada una con EtOH al 70 %.
22. Aflojar la tapa de las cajas magenta, con cuidado de no tocar el interior de la misma.
23. Sacar los medios de la autoclave con guantes.
24. Limpiar los botes con medio con EtOH al 70 % antes de introducirlos a la campana de flujo laminar.
25. Servir los medios hasta la línea marcada en la magenta, aproximadamente 9mL de medio por magenta.
26. Dejar que los medios se solidifiquen sin sus tapaderas para evitar condensación.
27. Una vez solidificado el medio, tapar las magentas y sellar con parafilm.
28. Identificar y guardar en un ambiente limpio.

### **Trasplante de callos**

1. En una campana de flujo laminar ingresar las cajas con callos formados por parte de tratamientos, y las cajas con ME.

2. Sacar con pinzas estériles un callo y sumergirlo en agua destilada estéril agitándolo ligeramente para quitar el medio que esté pegado.
3. Colocar el callo sobre una caja petri con mayordomo estéril y con ayuda de una pinza terminar de retirar cualquier pedazo de medio de cultivo.
4. Medir con un vernier el alto, ancho y profundidad de cada callo.
5. Con un bisturí cortar los callos, si los callos son grandes se pueden cortar en forma de cruz obteniendo así cuatro pedazos, si son más pequeños se pueden cortar en tres, dos o un pedazo a criterio de quien lo esté cortando.
6. Colocar cada pedazo de callo en medio de enraizamiento, sellar con parafilm e incubar.

## 9. Cálculos

Cálculo para determinar la dilución de los reactivos

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$ : Concentración / dilución inicial

$V_1$ : Volumen a determinar

$C_2$ : Concentración / dilución a la que se quiere llegar

$V_2$ : Volumen que se quiere utilizar

## 10. Control de calidad

El medio de cultivo no debe presentar ninguna contaminación a la hora de sembrar los callos. Los callos a sembrar no deben presentar ninguna contaminación y deben tener callo formado, en caso no haya callo y solo se encuentre la hoja en el medio, no trasplantar y determinar si se le dará más tiempo o si se descarta.

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados

Colocar en el cuaderno de laboratorio todas las medidas obtenidas, así como en cuantos pedazos se dividió el callo y las observaciones pertinentes al caso.

# E. Anexo V

## 1. POE V: Extracción de ADN y realización de PCR

### 1. Propósito

Determinar de manera exploratoria si los primers que amplifican para el gen donde se puede dar la mutación provocando el fenotipo tn-1 y para el gen de CaCKI1 en el chile ornamental Yume-Matsuri (*C. annuum*), amplificarán en el chile mirasol (*C. annuum*).

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Código del POE                  | V   |
| Área                            | Cultivo de tejidos  |
| Versión                         | Primera   |
| Idioma                          | Español   |
| Título                          | Extracción de ADN y realización de PCR                    |
| Escrito por<br>Fecha y firma    | Laboratorio de protección vegetal<br>30 de julio del 2023 |
| Modificado por<br>Fecha y firma | Adriana Gil<br>23 de agosto del 2023                      |
| Revisado por<br>Fecha y firma   |   |

## 2. Aplicación

El PCR va a permitir determinar si los genes que se ha observado están asociados a los chile sin semilla se encuentran en el chile mirasol.

## 3. Referencias

Laboratorio de protección vegetal. (s.f.). Extracción de ADN a partir de tejido vegetal y cultivos fúngicos. Universidad del valle de Guatemala.

Maki, T., Kusaka, H., Matsumoto, Y. et al. The mutation of *CaCKI1* causes seedless fruits in chili pepper (*Capsicum annuum*). *Theor Appl Genet* 136, 85 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04342-w>

Tanaka, Y., Mitani, A., Shimizu, N., Goto, T., Yoshida, Y., y Yasuba, K.-i. (2021). Characterization and bulk segregant analysis of a novel seedless mutant tn-1 of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Scientia Horticulturae*, 276, 109729. Descargado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423820305574> doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109729>

## 4. Terminología y abreviaciones

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- CAPS: Secuencia polimórfica amplificada por escisión
- EtOH: Etanol
- tn-1: Región del genoma de *C. annuum* que al ser mutada el fruto no produce semilla.
- CaCKII: Región del genoma de *C. annuum* que al ser mutada el fruto no produce semilla.

## 5. Principio

El PCR se basa en que múltiples ciclos de temperatura que permiten la síntesis y amplificación de un fragmento específico de ADN con la ayuda de oligonucleótidos.

## 6. Seguridad

Utilizar bata y guantes durante todo el trabajo en el laboratorio.

## 7. Equipos materiales y reactivos

### Equipo y materiales

- Papel absorbente
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- Puntas de 10 $\mu$ L
- Puntas de 200 $\mu$ L
- Puntas de 1000 $\mu$ L
- Micro pipeta de 10 $\mu$ L
- Micro pipeta de 200 $\mu$ L
- Micro pipeta de 1000 $\mu$ L
- Gradilla para tubos de 1.5mL
- Marcador indeleble de punta fina
- Horno
- Centrífuga
- Congelador
- Vórtex
- Macerador mecánico
- Pistilos de plástico azules
- Recipiente para descarte de puntas nuevas
- Recipiente de descarte de reactivos
- Frasco de descarte de reactivos para ECOTERMO
- Guantes de látex
- Nanodrop <sup>®</sup>
- Termociclador
- Tubos Eppendorf 0.2mL
- Cámara de electroforésis
- Transiluminador

### Reactivos

- Cloro al 10 %
- EtOH al 70 %
- Buffer de extracción CTAB
- Cloroformo isoamílico (24:1)
- Acetato de amonio 7.5M
- Isopropanol
- Buffer TE
- Loading dye
- Gel red
- Escalera para electroforesis de ADN
- Agarosa
- Agua libre de nucleasas
- Oligonucleótidos
- FCAPS: AGGTGTAGACATCACCTACCC
- RCAPS: TGGGAACAAAGGACCTTAAAAA
- FCaCK1: TGAAGCAACCAAACGCATTA
- RCaCK1: TCGGTTTCTTCCTTTTCTGTATG

## 8. Procedimiento

### Extracción de ADN

1. Colocar de 3 a 5 hojas entre el tubo abierto y la tapadera, luego cerrar para dejar discos de las hojas dentro del tubo.
2. Comenzar la extracción con el tubo Eppendorf con el tejido.
3. Desinfectar el área de trabajo pasando una toalla de papel absorbente con cloro al 10 % y luego una con etanol al 70 %.
4. Precalear el buffer de extracción CTAB a 65°C.
5. Incubar el tejido colectado durante la toma de muestra a -20°C mínimo 20 minutos.
6. Agregar al tejido 600µL de buffer de extracción CTAB precalentado a 65°C.
7. Macerar con el macerador mecánico durante 30 - 60 segundos.
8. Incubar a 65°C durante 15 - 30 min.
9. Durante la incubación, dejar en el congelador a -20°C una gradilla que va a ser utilizada a continuación.
10. Dejar enfriar las muestras por 5 min en la gradilla fría y esperar a que las muestras alcancen temperatura ambiente.



11. Agregar 500 $\mu$ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y vortexear la mezcla por 10 segundos, o hasta que se observe una solución lechosa homogénea.
12. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min. Si no se observa una buena separación de las fases, centrifugar por más tiempo.
13. Transferir el sobrenadante (aprox. 500 $\mu$ L), sin tocar la interfase, al tubo nuevo rotulado con el código de la muestra.
14. Agregar al sobrenadante 1 volumen de isopropanol frío y 1/10 volumen de acetato de amonio 7.5M.
15. Mezclar por inversión e incubar a -20°C mínimo 20 minutos.
16. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
17. Descartar el sobrenadante por inversión del tubo.
18. Lavar el pellet con 150 $\mu$ L de EtOH 70% frío y centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min.
19. Descartar el sobrenadante y secar el precipitado al aire por 45 min o en el horno a 30°C por 10 - 20 min.
20. Resuspender el pellet en 50 $\mu$ L de buffer TE precalentado a 65°C. El volumen de resuspensión depende del tamaño del pellet.
21. Almacenar el ADN resuspendido a 4°C en caso se use al día siguiente o en el transcurso de la semana, o a -20°C si el tiempo excede la semana.
22. Cuantificar el ADN utilizando un Nanodrop <sup>®</sup>

### Reacción de PCR

| Reactivo         | Concentración final | Volumen para 1 reacción ( $\mu$ L) |
|------------------|---------------------|------------------------------------|
| Master Mix       | 1X                  | 5 $\mu$ L                          |
| Taq pol          | 0.008 $\mu$ M       | 0.2 $\mu$ L                        |
| H <sub>2</sub> O | -                   | 15.8 $\mu$ L                       |
| dNTPS            | 0.2mM               | 1 $\mu$ L                          |
| Primer F         | 0.4 $\mu$ M         | 1 $\mu$ L                          |
| Primer R         | 0.4 $\mu$ M         | 1 $\mu$ L                          |
| ADN              | 100 ng/ $\mu$ L     | 2 $\mu$ L                          |

Cuadro XII.2: Master mix para PCR para 25  $\mu$ L por reacción

1. Preparar en hielo el master mix en un tubo de 1.5mL, preparando suficiente para el número de reacciones deseados.
2. En tubos de 0.2 mL, agregar 23  $\mu$ L de master mix y 2  $\mu$ L de ADN.
3. Como control negativo dejar un tubo solamente con el master mix, sin ADN de muestra.
4. Colocar los tubos con las muestras y máster mix en el termociclador y correr el programa para la PCR
5. Para ambos grupos de primer el ciclo en el termociclador es el siguiente: Un ciclo de 2 min. a 96°C, 35 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 68°C, con una extensión final de 5 min. a 68°C.

6. Preparar gel de agarosa al 1.5 % con buffer TBE 1X y colorante de ADN gel red. Colocar en la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X
7. Cargar 3  $\mu\text{L}$  de escalera para electroforesis de ADN en el gel.
8. Mezclar 5  $\mu\text{L}$  de cada producto de PCR con 1  $\mu\text{L}$  de loading dye y cargar en el gel.
9. Correr la electroforesis a 100 V por 30 minutos.

## 9. Cálculos

Cálculo para determinar el volumen de reactivos según el número de reacciones

$$\text{Volumen de reacción} * x = \text{Volumen total para } x \text{ reacciones}$$

Donde:

x = número de reacciones requeridas

## 10. Control de calidad

- Se esperan productos de amplificación para tn-1 de 300 pb y productos de 96pb para CaCKI1
- No se debe observar un producto de amplificación en el control negativo

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados

- Escribir todos los datos y orden utilizado para el gel en el cuaderno de laboratorio.
- Toma de fotografía al gel de agarosa luego de que este haya corrido.

## F. Anexo VI

### 1. POE VI: Electroforesis en geles de poliacrilamida de 10cm

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Código del POE                  | VI   |
| Área                            | Biología molecular y virología                     |
| Versión                         | Primera  |
| Idioma                          | Español  |
| Título                          | Electroforesis en geles de poliacrilamida de 10 cm |
| Escrito por<br>Fecha y firma    | Laboratorio de protección vegetal                  |
| Modificado por<br>Fecha y firma | Adriana Gil<br>10 de diciembre del 2023            |
| Revisado por<br>Fecha y firma   |  |

## 1. Propósito

Describir el procedimiento para la preparación de geles de poliacrilamida de 10 cm para la visualización de ADN.

## 2. Aplicación

Este procedimiento aplica para todo análisis que requiera la preparación de geles de poliacrilamida de 10 cm de alto.

## 3. Referencias

Avalos, D. N. (2018). *Identificación de variedades de cacao (Theobroma cacao L.) presentes en la finca "La Cruz", Cuyotenango, Suchitepéquez, Guatemala, mediante el análisis de ADN basado en marcadores microsatélites*. (Tesis de pregrado). Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.

Thermo Fisher (2012). General recommendations of DNA Electrophoresis. Disponible en: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN\\_0012614\\_Gen\\_Recommend\\_DNA\\_Electrophoresis\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN_0012614_Gen_Recommend_DNA_Electrophoresis_UG.pdf). (Con acceso: 30/07/2019)

## 4. Terminología y abreviaciones

- **Buffer SB:** Buffer compuesto por borato de sodio.
- **PAGE:** Polyacrylamide gel electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida).
- **TEMED:** Tetrametiletilendiamina.
- **APS:** Peroxisulfato de amonio.
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.
- **NaOH:** Hidróxido de sodio.

## 5. Principio

Se usa un gel para mover las moléculas de forma eléctrica a través de una matriz, en este caso un gel de poliacrilamida. Esta matriz al tener poros, permite que las moléculas más pequeñas avancen más rápido que las moléculas más grandes.

## 6. Seguridad

Bata de laboratorio y guantes durante todo el proceso.

## 7. Equipos materiales y reactivos

### Equipo y materiales

- Balanza semianalítica

- fuente de poder
- Micropipeta (p10)
- Micropipeta (p20)
- Micropipeta (p1000)
- Espátula
- Vidrio espaciador (Spacer Plates)
- Vidrio bajo (Short Plates)
- Mini-PROTEAN tetra Cell Casting Module
- Mini-PROTEAN Tetra Electrode Assembly
- Mini-PROTEAN Tetra Companion Running Module
- Buffer tank
- Espaciadores
- Peines
- Papel filtro
- Papel acetato

### **Reactivos**

- Buffer SB: Hidróxido de sodio, ácido bórico 20X, pH 8.0
- Bis:Acrilamida 40 % (37.5:1)
- Ácido acético glacial
- Nitrato de plata
- Formaldehido 37 %
- Carbonato de sodio
- Tiosulfato de sodio
- APS
- Etanol al 95 %
- Formamida desionizada
- EDTA
- Xilen-cianol
- Azul de bromofenol
- TEMED
- Agua destilada
- Escalera molecular

## 8. Procedimiento

### Preparación de geles de poliacrilamida de 10cm:

1. Lavar las placas de vidrio de la cámara con detergente Nolon® al 1 % y una esponja suave. Enjuagar con agua y posteriormente con agua desmineralizada y etanol al 95 %. Dejar de escurrir hasta que estén secas por completo.
2. Armar la cámara de polimerización: Alinear el vidrio espaciador con el vidrio corto, de tal forma que quede un espacio de 0.75mm entre los dos vidrios. Colocar los dos vidrios alineados con el vidrio corto hacia el frente dentro de una abrazadera verde, luego cerrar la abrazadera con los dos extremos para dejar los geles pensados. Colocar la abrazadera en el soporte de fundición.
3. Preparar solución de poliacrilamida al 10 % (o cambiar la concentración definida según el rango de tamaño esperado), mezclando 6.6mL de agua destilada, 2.4mL de Buffer SB 5X, 3mL de acrilamida, 20 $\mu$ L de TEMED y 20 $\mu$ L de APS. Esta solución rinde para dos geles de 10 cm.
4. Agitar la solución e inmediatamente verterla entre el vidrio espaciador y el vidrio corto, evitar la formación de burbujas de aire. Si se forman burbujas de aire sacarlas con leves golpes a la parte del vidrio con burbujas.
5. Agregar 3 $\mu$ L de TEMED en cada extremo de los vidrios e introducir los peines evitando la formación de burbujas de aire.
6. Dejar polimerizar 30 minutos. Si se observa pérdida de solución por los extremos de los vidrios, rellenar con más solución con ayuda de una pipeta de 1000 $\mu$ L.
7. Armar la cámara de electroforesis, agregar buffer de corrida (SB 1X). El Buffer SB 1X de corrida puede reutilizarse hasta un máximo de 5 corridas.
8. Remover los peines.
9. Colocar 1 $\mu$ L de StopMix por cada muestra en parafilm.
10. Mezclar 4 $\mu$ L de la muestra con 1 $\mu$ L de StopMix y cargar en el gel.
11. Cargar 2 $\mu$ L de escalera molecular en un pozo vacío.
12. Cerrar la cámara por completo, verificando que el ánodo y el cátodo se encuentren en la posición adecuada.
13. Conectar a una fuente de poder, verificar la polaridad de los cables
14. Realizar la corrida del gel a 160v por 1 hora o según el tiempo adecuado al tamaño del producto.
15. Al terminar la electroforesis, apagar la fuente de poder, desconectar las terminaciones eléctricas, remover la tapa y sacar el sistema armado.
16. Separar los vidrios y despegar el gel utilizando los espaciadores.

### Tinción de geles de poliacrilamida de 10cm

1. Colocar el gel en un recipiente que contiene 150mL de solución de fijación y agitar por 20 minutos.
2. Recuperar la solución de fijación en un Erlenmeyer.
3. Realizar tres lavados con agua desmineralizada por dos minutos cada uno.

4. Agregar aproximadamente 150mL de solución de tinción y agitar con 20 minutos.
5. Recuperar la solución de tinción en el recipiente de almacenamiento de la solución.
6. Lavar con agua desmineralizada por 10 segundos.
7. Agregar 150mL de solución de revelado a 4°C y agitar hasta que presentan bandas.
8. Al observar bandas con la intensidad deseada, verter la solución de fijación utilizada al inicio de la tinción para detener la reacción. Agitar hasta que se neutralice.
9. Sumergir el papel filtro dentro de la solución para colectar el gel. Después de un minuto colocar papel acetato sobre el gel. Escanear los geles, guardarlos, envueltos en papel, en bolsas herméticas para su posterior análisis.
10. Escanear los geles, guardarlos, envueltos en bolsas herméticas para su posterior análisis.

## 9. Cálculos

Cálculo para determinar la dilución de los reactivos

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$ : Concentración / dilución inicial

$V_1$ : Volumen a determinar

$C_2$ : Concentración / dilución a la que se quiere llegar

$V_2$ : Volumen que se quiere utilizar

## 10. Control de calidad

- La escalera debe haber corrido en el gel de manera que se puedan ver las distintas bandas.
- Las muestras no se ven corridas o desplazadas, se puede observar en las muestras en qué punto están y calcular cuanto pesan, así como la separación de bandas.

## 11. Reporte de datos y documentos utilizados

- Escribir todos los datos y orden de las muestras utilizadas en el cuadernito de laboratorio.
- Escanear el gel luego de el procedimiento para tener todos los datos, así como para poder verlos de nuevo y analizarlos.

## G. Anexo VII

### 1. Datos brutos

#### 1. Resultado de PCR *in silico*

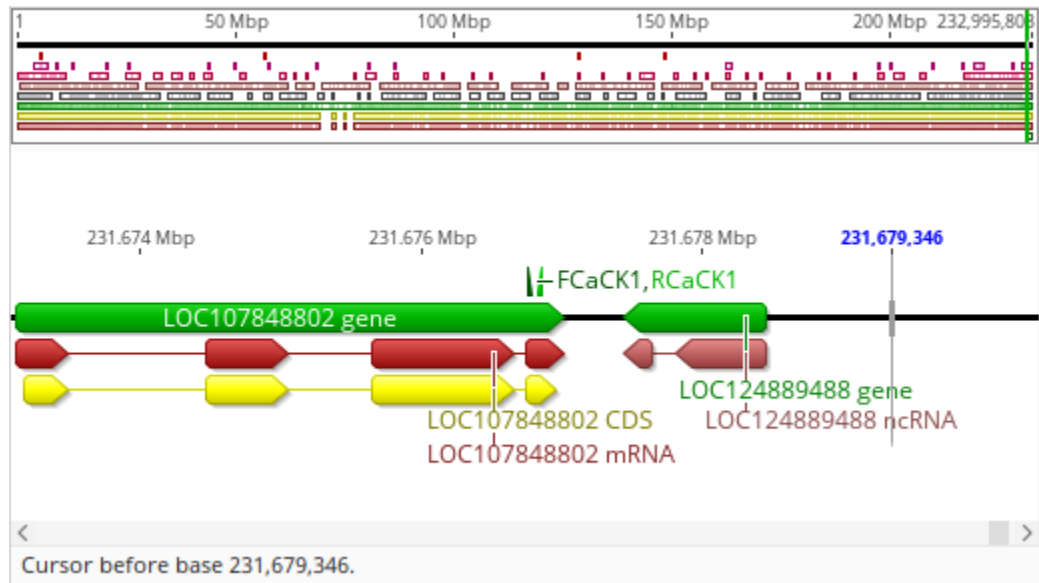


Figura XII.1: Amplificación *in silico* del gen *CaCK1I*  
(Dotmatics, 2023)

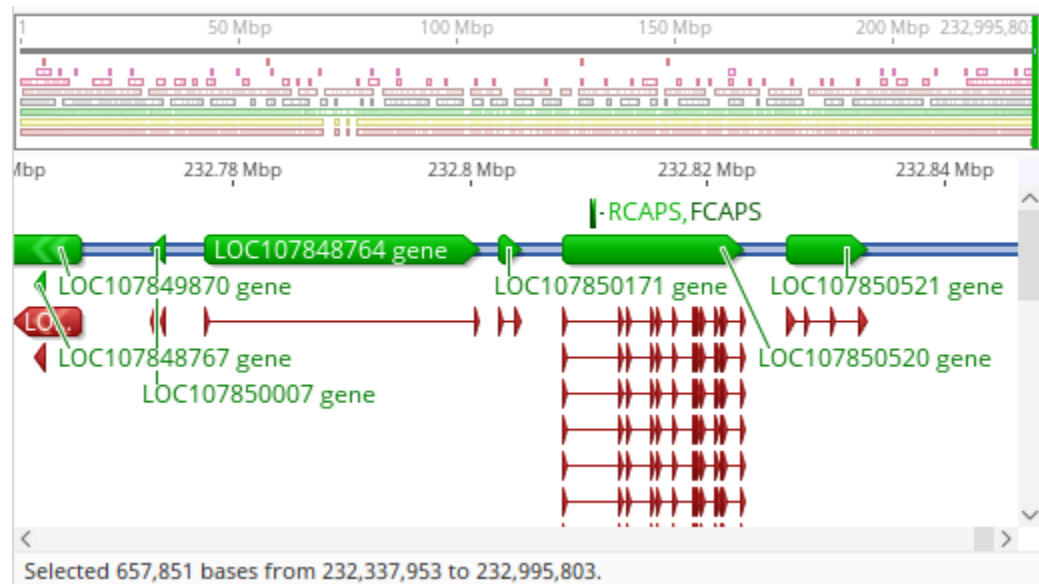


Figura XII.2: Amplificación *in silico* del gen *tn-1*  
(Dotmatics, 2023)

## 2. Datos para el análisis estadístico

| Batch | Tratamiento | CAJA | Contaminada | Sobrevivieron | Promedio callo |
|-------|-------------|------|-------------|---------------|----------------|
| 1     | T1          | T1A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T1          | T1B  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T1          | T1C  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T1          | T1D  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T2          | T2A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T2          | T2B  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T2          | T2C  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T2          | TD2  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T3          | T3A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T3          | T3B  | SÍ          | SÍ            | 0.5            |
| 1     | T4          | T4A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T4          | T4B  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T4          | T4C  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T5          | T5A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T5          | T5B  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T5          | T5C  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T5          | T5D  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T6          | T6A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T6          | T6B  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T6          | T6C  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T6          | T6D  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T7          | T7A  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T7          | T7B  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T7          | T7C  | SÍ          | NO            | 0              |
| 1     | T7          | T7D  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T1          | T1E  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T2          | T2E  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T2          | T2F  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T3          | T3C  | NO          | SÍ            | 1              |
| 2     | T3          | T3D  | NO          | SÍ            | 1              |
| 2     | T4          | T4D  | NO          | SÍ            | 1              |
| 2     | T4          | T4E  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T6          | T6E  | NO          | SÍ            | 0.75           |
| 2     | T6          | T6F  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T7          | T7E  | SÍ          | NO            | 0              |
| 2     | T7          | T7F  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T1          | T1F  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T1          | T1G  | NO          | SÍ            | 0              |
| 3     | T1          | T1H  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T1          | T1I  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T2          | T2G  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T2          | T2H  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T2          | T2I  | SÍ          | NO            | 0              |

Cuadro XII.3: Datos sin analizar sobre inducción de callo en el medio

Donde el batch son todas las cajas que se realizaron al mismo tiempo, en la misma fecha y el mismo set de hojas colectadas. El tratamiento es el tipo de tratamiento utilizado para esa muestra, la caja como codificador para cada caja utilizada. Contaminada indicando si la caja se contaminó durante el experimento, sobrevivieron como indicador de si llegaron hasta el final del experimento y por último promedio de callo, en donde 0 indica la ausencia de callo en los 4 explantes, 0.25 la presencia de callo en un explante, 0.50 la presencia de callo en dos explantes 0.75 la presencia de callo en tres explantes y 1 la presencia de callo en los cuatro explantes presentes en la caja.



| Batch | Tratamiento | CAJA | Contaminada | Sobrevivieron | Promedio callo |
|-------|-------------|------|-------------|---------------|----------------|
| 3     | T3          | T3E  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T3          | T3F  | NO          | SÍ            | 1              |
| 3     | T5          | T5E  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T6          | T6G  | NO          | SÍ            | 1              |
| 3     | T6          | T6H  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T7          | T7G  | SÍ          | NO            | 0              |
| 3     | T7          | T7H  | NO          | SÍ            | 1              |
| 4     | T1          | T1AA | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T1          | T1AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T1          | T1AC | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T1          | T1AD | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 4     | T1          | T1AE | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T2          | T2AA | SÍ          | SÍ            | 1              |
| 4     | T2          | T2AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T2          | T2AC | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T2          | T2AD | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T2          | T2AE | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T3          | T3AA | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T3          | T3AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T3          | T3AC | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T3          | T3AD | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T3          | T3AE | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T4          | T4AA | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T4          | T4AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T4          | T4AC | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T4          | T4AD | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T4          | T4AE | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T5          | T5AA | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T5          | T5AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T5          | T5AC | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T5          | T5AD | NO          | SÍ            | 1              |
| 4     | T5          | T5AE | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T6          | T6AA | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T6          | T6AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T6          | T6AC | SÍ          | SÍ            | 0.25           |
| 4     | T6          | T6AD | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T6          | T6AE | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T7          | T7AA | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T7          | T7AB | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T7          | T7AC | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T7          | T7AD | SÍ          | NO            | 0              |
| 4     | T7          | T7AE | SÍ          | NO            | 0              |

Cuadro XII.4: Datos sin analizar sobre inducción de callo en el medio segunda parte  
Continuación de el Cuadro XII.3

| Batch | Tratamiento | CAJA | Contaminada | Sobrevivieron | Promedio callo |
|-------|-------------|------|-------------|---------------|----------------|
| 5     | T1          | T1BA | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 5     | T1          | T1BB | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T1          | T1BC | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 5     | T1          | T1BD | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 5     | T2          | T2BA | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T2          | T2BB | NO          | SÍ            | 0              |
| 5     | T2          | T2BC | NO          | SÍ            | 0.25           |
| 5     | T2          | T2BD | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 5     | T3          | T3BA | NO          | SÍ            | 1              |
| 5     | T3          | T3BB | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T3          | T3BC | NO          | SÍ            | 0.25           |
| 5     | T3          | T3BD | NO          | SÍ            | 1              |
| 5     | T4          | T4BA | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T4          | T4BB | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T4          | T4BC | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T4          | T4BD | NO          | SÍ            | 0.75           |
| 5     | T5          | T5BA | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 5     | T5          | T5BB | SÍ          | SÍ            | 0.25           |
| 5     | T5          | T5BC | NO          | SÍ            | 0              |
| 5     | T5          | T5BD | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T6          | T6BA | NO          | SÍ            | 0              |
| 5     | T6          | T6BB | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 5     | T6          | T6BC | SÍ          | NO            | 0              |
| 5     | T6          | T6BD | NO          | SÍ            | 1              |
| 5     | T7          | T7BA | SÍ          | SÍ            | 0.25           |
| 5     | T7          | T7BB | NO          | SÍ            | 0.25           |
| 5     | T7          | T7BC | NO          | SÍ            | 0.75           |
| 5     | T7          | T7BD | SÍ          | SÍ            | 0.25           |
| 6     | T1          | T1CA | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 6     | T2          | T2CA | NO          | SÍ            | 0              |
| 6     | T4          | T4CA | SÍ          | SÍ            | 0              |
| 6     | T4          | T4CB | SÍ          | NO            | 0              |
| 6     | T4          | T4CC | SÍ          | NO            | 0              |

Cuadro XII.5: Datos sin analizar sobre inducción de callo en el medio tercera parte  
Continuación de el Cuadro XII.3