DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Transformación genética de *Capsicum chinense* (Jacq.) mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias

Presenta:

M. C. Laura Yesenia Solís Ramos

"Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Gobierno de México a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la S.R.E."

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2009







CONTENIDO

Reconocimientos	Página
Agradecimientos	
Dedicatorias	III V
Lista de figuras	vii
Lista de cuadros	xiii
Lista de abreviaturas	Yili
Lista de anexos	xvi
Resumen	xvii
Abstract	VII
	~~~
I. Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	3
1.1 GENERALIDADES DE Capsicum chinense Jacq.	3
1.1.1 Clasificación taxonómica	3
1.1.2 Descripción botánica de C. chinense	3
1.1.3 Origen de la especie	4
1.1.4 Usos e importancia económica	4
1.1.5 Principales plagas	5
1.1.6 Enfermedades	6
1.1.7 Situación actual del cultivo de C. chinense	6
1.2 METODOS DE MEJORAMIENTO EN Capsicum	6
1.3 MEJORAMIENTO CON METODOS BIOTECNOLOGICOS	7
1.3.1 Cultivo de tejidos y clonación	7
1.3.2 Ingeniería genética y transformación	7
1.3.3 Métodos de transferencia directa de ADN	8
1.4 AVANCES EN EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA Cansicum son	8
1.5 ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS PARA ELIMINAR A. tumefaciens	; 11
1.6 GEN REPORTERO uida	12
1.7 AGENTES SELECTIVOS	12
1.8 WUSCHEL	13
1.9 JUSTIFICACIÓN	17
1.10 HIPÓTESIS	17
1.11 OBJETIVO GENERAL	17
1.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
1.14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
Capitulo 2. The mechanism infection of Agrobacterium tumefaciens	25

2.1 ABSTRACT	25
2.2 KEYWORDS	25
2.3 INTRODUCTION	25
2.4 REGULATORY SYSTEMS OF Agrobacterium TO RECOGNISE	25
SUSCEPTIBLE CELLS FOR INFECTION	
2.5 PROCESSING THE T-DNA COMPLEX	27
2.6 AGROBACTERIUM PROTEINS INVOLVED IN THE TRANSPORT OF	29
THE T-DNA COMPLEX	
2.6.1 Component of transport channel	29
2.6.2 T PILUS	29
2.7 TRANSPORT OF THE COMPLEX TO THE HOST NUCLEUS	31
2.7.1 VID2	31
2.7.2 VIIEZ 2.7.2 VIIEZ	20
	32
	34
2.10 DISCUSSION	35
2 11 CONCLUSIONS	40
2 12 ACKNOWLEDGMENTS	40
2 13 REFERENCES	40
Capítulo 3. Materiales y métodos	47
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	47
3.1.1 Asepsia de frutos de Capsicum chinense	47
3.2 INDUCCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	47
INDIRECTA A PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO	
3.2.1 Material vegetal y medio de cultivo	47
3.2.2 Análisis histológico	47
3.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE C. chinense	48
3.3.1 Cocultivo de embrión cigótico maduro	48
3.3.2 Eliminación de A. tumefaciens después del cocultivo	48
3.3.3 Efecto de los antibióticos en la eliminación de la	49
bacteria	
3.4 EVALUACION DE LA KANAMICINA COMO AGENTE SELECTIVO	50
3.4.1 Efecto de la kanamicina en el cultivo in vitro de los segmentos de	50
embrion cigotico	50
3.5 TRANSFORMACION GENETICA DE Capsicum chinense CON EL	50
3 5 1 Cons v plásmido	50
3.5.2 Efecto del pH en la actividad endógena tipo GUS en teijdos de C	51
chinense	51
3.5.2.1 Material vegetal	51
3.5.2.2 Evaluación por tinción histoquímica de la actividad 8-	52
glucuronidasa (GUS)	
3.5.2.3 Transformación genética de <i>C. chinense</i> con la cepa	52
-	

LBA4404 pCAMBIA2301	
3.6 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN HETERÓLOGO WUSCHEL DE Arabidopsis thaliana	52
3.6.1 Cepas v plásmidos binarios	52
3.6.2 Activación de cepas bacterianas	54
3.6.3 Cocultivo de embrión cigótico maduro	55
3.6.4 Eliminación de la bacteria y cultivo in vitro después del cocultivo	55
3.6.5 Activación de WUSCHEL en explantes transformados	55
3.6.5.1 Explantes con inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo	55
3.6.5.2 Explantes tratados por inmersión con el inductor (17 β- estradiol)	56
3.6.5.3 Tejido foliar de plantas transformadas	56
3.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
Capítulo 4. Resultados	63
4.1 INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA A PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO	63
4.1.1 Análisis histológico de tejidos de C. chinense cultivados in vitro durante la inducción de embriogénesis somática	67
4.2 ELIMINACIÓN DE A. tumefaciens DESPUÉS DEL COCULTIVO	70
4.2.1 Reincidencia bacteriana	70
4.2.2 Efecto de los antibióticos en la regeneración in vitro de los segmentos de embrión cigótico	71
4.3 EMPLEO DE LA KANAMICINA COMO AGENTE SELECTIVO EN EXPLANTES DE C. chinense	73
4.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN REPORTERO GUS	75
4.4.1 Caracterización histoquímica de la actividad tipo β-	75
4.4.2 Efecto del cocultivo en la formación de tejido calloso de C. chinense	77
4.4.3 Efecto del pH en la actividad endógena tipo β-glucuronidasa en tejidos de C. chinense	78
4.4.4 Transformación genética de C. chinense con LBA4404 pCAMBIA2301	81
4.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN HETERÓLOGO WUSCHEL DE Arabidopsis thaliana	82
4.5.1 Verificación por PCR del plásmido pER10W-35SRed en los cultivos de <i>A. tumefaciens</i> empleados para el cocultivo	82
4.5.2 Presencia del gen heterólogo WUSCHEL por PCR	83
4.5.3 Activación de WUSCHEL en explantes transformados	84
4.5.3.1 Explantes con el inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo	84

4.5.3.2 Explantes tratados por inmersión con el inductor (17 β- estradiol)	87
4.5.3.3 Tejido foliar de plántulas transformadas	90
Capítulo 5. Overexpression of WUSCHEL in Capsicum	103
chinense causes ectopic morpogenesis	
5.1 ABSTRACT	103
5.2 KEYWORDS	103
5.3 ABBREVIATIONS	103
5.4 INTRODUCTION	103
5.5 MATERIALS AND METHODS	104
5.5.1 In vitro regeneration	104
5.5.2 The binary vector for transformation	105
5.5.3 Activation of strains	105
5.5.4 Transformation by co-cultivation of mature zygotic embryo	106
5.5.5 Lissue culture after co-cultivation	106
5.5.6 Confirmation of the transgene	106
5.5.7 Overexpression of WUSCHEL in transformed explants	107
5.5.8 Histological analysis of transformed stems induced	107
5.5.9 RNA extraction of induced explants	107
5.5.10 Reverse transcription-polymerase chain reaction	107
5.5.11 Northern reverse	108
5.0 RESULTS	108
5.6.1 Genetic transformation of Capsicum chinense with WUSCHEL	100
5.6.2 Overexpression of WOSCHEL in transformed stems of C.	109
Chinerise 5.6.2 Histological applysis of transformed stoms induced	110
	112
	114
5.0 ACKNOWLEDGMENTS	110
J.9 REFERENCES	110
Capítulo 6. Discusión	121
6.1 INDUCCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA A	121
PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO	121
6 1 2 Análisis histológico de tejidos de C. chinense cultivados in vitro	123
durante la inducción de embriogénesis somática	.20
6.2 ELIMINACIÓN DE A. tumefaciens DESPUÉS DEL COCULTIVO	125

6.3 EMPLEO DE LA KANAMICINA COMO AGENTE SELECTIVO EN	126
6.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL	127
6.4.1 Efecto del pH en la actividad endógena tipo β-glucuronidasa en tejidos de <i>C. chinense</i>	127
6.4.2 Transformación genética de <i>C. chinense</i> con LBA4404 pCAMBIA2301	128
6.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN HETERÓLOGO WUSCHEL DE Arabidopsis thaliana	128
6.5.1 Activación de WUSCHEL en explantes transformados	128
6.6. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN PARA Capsicum chinense	131
6.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132
Capítulo 7. Conclusiones	137
Capítulo 8. Perspectivas	139

•

# RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna y del Dr. Tomás González Estrada.

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Gobierno de México, a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores.

# AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de México, a través del Instituto Mexicano de Cooperación Internacional (IMEXCI) de la Secretaría de Relaciones Exteriores, por la beca otorgada para realizar los estudios de Doctorado en el Centro de Investigación Científico de Yucatán (CICY), Yucatán, México.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por brindarme las facilidades para desarrollar mi proyecto de tesis. A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP). A la Unidad de Biotecnología por facilitarme algunos equipos para realizar este trabajo.

Al Dr. Enrique Castaño de la Serna por incorporarme a su grupo de trabajo, así como por la asesoría, apoyo en el desarrollo y evaluación de la investigación.

Al Dr. Tomás González Estrada por su asesoría en el trabajo de tesis, por todos los comentarios y sugerencias.

A los miembros de mi comité tutoral y de revisión de tesis, por todas las sugerencias, observaciones y apoyo durante mi estancia en el Centro de Investigación: Dr. Enrique Castaño de la Serna, Dr. Tomás González Estrada, Dr. Gregorio Godoy Hernández, Dr. Felipe Sánchez Teller, Dr. Luis Alfonso Saénz Carbonell, Dra. Aileen O'Connor. Igualmente a la Dra. Sara Nahuat Dzib (ITM), Dr. Neftalí Ochoa Alejo (CINVESTAV, Irapuato).

Además al Dr. Gregorio Godoy por facilitarme la cepa LBA4404 pCAMBIA 2301, para llevar a cabo los experimentos de transformación con el gen reportero GUS.

Al M.C. Antonio Andrade Torres por sus valiosas sugerencias en la planificación y desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Felipe Vázquez Flota, por todo el apoyo durante los trámites de solicitud de la beca para hacer estos estudios, así como durante mi estancia en el CICY.

A la Biól. Elidé Avilés Berzunza por la capacitación en el proceso de transformación genética, en la facilitación de reactivos y equipo de trabajo.

A la Q.B. Ligia Brito Argaez por las asesorías técnicas en biología molecular además de su amistad y apoyo.

A la Dra. Rosa María Escobedo por sus sugerencias y entrenamiento para utilizar el equipo de microscopía de luz transmitida y de fluorescencia.

Al Biól. Felipe Barredo Pool, Unidad de Biotecnología, por el entrenamiento y sugerencias para realizar los estudios histológicos.

Al M. C. Bartolome Chi Manzanero, Unidad de Biotecnología, por la colaboración en la parte de biología molecular.

Al Dr. Ignacio Islas Flores, Dr. Fernando Feder Moguel, y a todos los compañeros de su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Ronald, Luis Carlos, Franciso V., Angela, Julia, Rocio, Pamela, y Mauricio.

# DEDICATORIAS

Le doy gracias a Dios por permitirme concluir satisfactoriamente esta etapa de mi vida, que estuvo llena de altibajos que me motivaron a seguir adelante y luchar por ser mejor persona y profesional cada día.

A mi familia:

A mi mamá Emilce Ramos Araya, que es un gran ejemplo para mí de dedicación y esfuerzo. Quien siempre me ha demostrado que se debe trabajar para lograr lo que se desea sin limitaciones.

A mis hermanos Eduardo y Ricardo Solís Ramos, que me han brindado su cariño y ánimo para salir adelante.

A mi sobrinito Esteban Ricardo Solís Campos, que es la ilusión de la vida que inicia y sobre todo la fortaleza para vivir intensamente.

A mi papá Carlos Solís Solís, porque gracias a él he tratado de salir siempre adelante.

A Antonio Andrade Torres, que me impulsó a seguir adelante con mis estudios y siempre estuvo a mi lado brindándome su apoyo. Quien siempre me tuvo paciencia y me motivó para seguir adelante en los momentos difíciles. Por que este logro no hubiera podido obtenerse sin su amor y fortaleza.

A todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo.

# LISTA DE FIGURAS

Pag.

4

#### Figura

- 1.1 Frutos de Capsicum chinense (Fotos: A y B : González-Estrada, T.).
- 1.2 (a): Organización del meristemo apical del tallo. Los tejidos del tallo 14 de la planta se derivan de 3 capas del meristemo del tallo, L1-L3 (flechas). Cada capa contiene 1-3 células (sc) dentro de la parte apical de la zona central (CZ). Los primordios (p) se inician en la zona periférica (pz). Debajo de la CZ está la zona transitoria que forma la médula del eje del tallo. (b): la expresión de WUSCHEL se limita a un grupo pequeño de células (rayas) debajo de la CZ, cerca de las células madres de L1-L3 (sc) y sobre RZ. I: hoja, p: primordios foliares y PZ: zona periférica (Mayer et al., 1998).
- 1.3 Raíces de Arabidopsis thaliana transformadas con el gen inducible 15 con estradiol XVE-WUS. (a): en medio sin inductor a los 20 días, de la b a la d: en presencia del inductor, (b) a los 10 días; (c): a los 20 días y (d): a los 30 días. (e): embrión cigótico aislado del explante mostrado en (d). (f): germinación de plántulas derivadas de embriones creciendo en medio MS a los 45 días. Barra= 100 μm (a y e); 1 mm (b-d, f) (Zuo et al., 2002).
- 1.4 Diagrama de flujo para la transformación genética de segmentos de 18 embrión cigótico de *Capsicum chinense* mediante *A. tumefaciens.*
- 2.1 Regulatory system of Agrobacterium for the recognition of 26 susceptible host cells. A : Proteins that are encoded by a set of bacterial chromosomal genes and for host receptors which are involved in Agrobacterium binding to the host cell surface. B : Signal molecules released from the wounded host cell (phenolic compound, monosaccharides and acidic pH) which are sensed by virA gene. C : Autophosphorylation of the VirA conserved histidine. D: activation of VirG and all of the vir genes through the phosphorylation of conserved aspartate.
- 2.2 Processing of T complex. A : Ti plasmid with T-DNA flanked by the 28 two repeats of 25 bp termed as left and right borders and virulence region. B: VirD2 and VirD1 introduces a nick at the border sequences surrounding the T-DNA and VirD1. C : VirD1 is released, whereas VirD2 remains covalently attached to the 5' end of the T strand. D : Formation of T complex VirD2-VirE2-VirE1. LB: left border, RB : right border.
- 2.3 Proteins of Agrobacterium involved in the transport of T-DNA 30 complex through the type IV secretion system. A : Entrance of transport channel, conformed by VirB1, VirB4, VirB8, VirB10, VirB11 and VirD4. B : Transport channel integrated by the VirB6, VirB7 and

VirB9 proteins. C : Formation of T pilus, whose main component is VirB2, and the VirB1, VirB5 and VirB7 proteins, which interact with host receptors. C: cytoplasm, OM : bacterial outer membrane, PP : bacterial periplasm, IM : bacterial inner membrane.

- 2.4 Import of the T complex from the host cytoplasm to the host cell 33 nucleus. A : The Agrobacterium VirE2, VirE3 and VirD2 proteins as well as the cyclophilins, karyopherin α, VIP1 and VIP2 host proteins are involved in the transport of T-DNA. B: VIP or VirE3 associates with the T-complex acting as a molecular link with H2A histone in the host chromatin. C : Formation of SCF-VirF (Skp1-Cullin-F-box protein/VirF) complex. D : Degradation of proteins of T-complex by proteolysis machinery of the host cell through SCF-VirF complex. E: T-strand released from proteins that facilitated their transport.
- 2.5 Possible mechanism of the T-DNA integration process into host 35 DNA.: A: Homologous recombination (HR) that requires as a substrate T-DNA single-stranded. B: Mechanism of single-stranded gap repair cadena sencilla (SSGR) and integration of T-DNA into host genome. C: Illegitimate or non-homologous recombination (NHR). D: Generally requires double-stranded T-DNA as a substrate. E: DSB repair by the non-homologous end-joining (NHEJ) enzymes. F: T-DNA integration into host genome.
- 3.1 Representación esquemática de la región entre el borde derecho e 51 izquierdo del ADN-T del plásmido pCAMBIA2301. En verde se muestra el promotor 35S el cual controla la expresión del gen *uidA*, y en rojo se muestra el gen *nptll* el cual confiere resistencia a kanamicina, de color rojo con rayas azules el gen GUS A (*uidA*) y de color celeste el terminador NOS.
- 3.2 Representación esquemática de la región entre el borde derecho e 53 izquierdo del ADN-T del plásmido pER10W-35SRed. En verde se muestra el promotor inducible por 17-β-estradiol el cual controla la expresión del gen WUSCHEL y en rojo se muestra el gen npt/l el cual confiere resistencia a kanamicina y de color verde-amarillo la proteína roja fluorescente que esta bajo el promotor constitutivo 35S.
- 3.3 Mapa de restricción del plásmido pLH60-RFP. El promotor es de 54 ubiquitina, con el terminador NOS, el agente selectivo para células vegetales es *hpt*, que le confiere resistencia a la higromicina y el gen reportero es el RFP (proteína roja fluorescente)(*Dsred*).
- 4.1.1 Respuestas obtenidas en los segmentos de C. chinense cultivados 63

en medio MS solo o adicionado con 2 mg/L de ANA, AIA y BAP, a los 30 días de culivo *in vitro*. A: germinación cotiledonar, B: germinación radicular, C: formación de tejido calloso y D: explantes sin respuesta.

- 4.1.2 Número promedio de explantes ± error estándar, por tratamiento con germinación cotiledonar, radicular o formación de callo, a los 30 días de cultivo en medio MS con 2 mg/L ANA, AIA y BAP y en medio MS sin reguladores. n=50
- 4.1.3 Número promedio de explantes ± error estándar por tratamiento con 65 respuesta: cotiledonar, radicular, formación de callo, plantas y posibles embriones a los 60 días de cultivo en MS con 2 mg/L ANA, AIA y BAP y en MS sin reguladores. n= 50.
- 4.1.4 Estadios morfológicos de la embriogénesis somática indirecta en C. 66 chinense. (A y B): segmentos de embrión cigótico maduro en medio MS con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM y de la D en adelante en medio MS. A: Tipo de callo a partir del cual se generan las estructuras (30 d), (B): callo embrionario (40 d), C: callo con estructuras embrionarias (50 d), D: estructuras embrionarias (60-70 días), E: estadio de torpedo a los 100 días. F-G: estructuras mantenidas en el callo. F: Embrión germinado (120 d), G: plántulas (150 d). H-I: estructuras separadas del explante. H: embrión germinado (120 días), I: plántula (150 d). La barra horizontal equivale para A-E: 0.1 cm, F: 0.3 cm, G: 0.4 cm, H: 0.2 cm, I: 0.3 cm.
- 4.1.5 Plántulas de *C. chinense* regeneradas a partir de embriogénesis 67 somática indirecta después de 160 días de cultivo. A: Plántula obtenida a partir del embrión somático mantenido en el explante que le dio origen. B: Plántula desarrollada a partir del embrión que fue desprendido del tejido calloso. C: Plántula de 160 días. La barra horizontal equivale para A: 0.3 cm, B: 0.3 cm y C: 0.5 cm.
- 4.1.6 Secciones histológicas longitudinales de los embriones somáticos a partir de tejido calloso de *C. chinense*, cultivado en medio MS complementado con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM. A-B: células embriogénicas, C: centros meristemáticos, D-E: proembrión, F: embrión somático en estadio globular temprano. Todos los cortes son teñidos con la reacción de PAS. N: núcleo, S: estructura como suspensor, P: protodermis. Barras horizontales A-C 50 μm, y D-F: 100 μm.
- 4.1.7 Cortes histológicos longitudinales de los estadios de desarrollo de los 70 embriones somáticos a partir de tejido calloso de *C. chinense*. A)
  - ix

Globular; B) oblogo; C) acorazonado, D) torpedo, E) cotiledonar. Todos los cortes son teñidos con la reacción de PAS. P: protodermis, ZV: zona vascular, MA: meristemo apical, PF: primordios foliares, C: cotiledón. Barras horizontales (A-E): 200 μm.

- 4.2.1 Número de explantes cocultivados sin reincidencia de A. 71 tumefaciens, después de 70 días de cultivo con diferentes antibióticos. n= 25
- 4.2.2 Número de plántulas obtenidas a partir de los explantes cocultivados 72 con C58 pER10W-35SRed y sin cocultivar, en el medio cultivo (MS+3R) con los tratamientos que eliminaron la bacteria (60 a 80%).
   n=25
- 4.3.1 Efecto de la kanamicina en la regeneración de los explantes sin 74 cocultivar de *C. chinense*, a la primera, segunda y tercera semana de cultivo *in vitro* en medio MS adicionado con 2 mg/L de ANA, AIA y BAP respectivamente. Cada barra representa el número promedio de explantes con: (A) desarrollo radicular y (B) con formación de callo. n= 25.
- 4.4.1.1 Evaluación de la actividad GUS en los explantes cocultivados con 76 LBA4404 pCAMBIA2301 y del tipo GUS en explantes no cocultivados. Las barras indican el No. total de explantes teñidos de color azul en la prueba histoquímica. n=14
- 4.4.1.2 Evaluación de los explantes de *C. chinense* por tinción histoquímica. 77
  A, C y E: sin cocultivar. B, D y F; cocultivados. A y B: tejido calloso con brotes, de la C a la F: tejido calloso, G: hoja de tabaco no cocultivada (testigo positivo) y H: hoja de tabaco cocultivada (testigo positivo). La barra horizontal equivale para A hasta F = 0.1 cm y en G H = 0.5 cm.
- 4.4.2.1 Explantes cocultivados con LBA4404 pCAMBIA2301 y sin cocultivar, 78 a los 70 días de cultivo con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA, 8.9 μM BAP más antibióticos. Barras % explantes.
- 4.4.3 Evaluación de la actividad endógena tipo GUS en tejidos de C. 79 chinense al aplicar el buffer fosfato con diferentes valores de pH (6 a 8). A: embrión cigótico, B: placenta, C: pericarpio, D: Séptum, E: flor, F: callo de 60 d, G: raíces de 90 d, H: tallos de 90 d, I: hojas de 90 d.
- 4.4.4 Transformación de *C. chinense* y *Nicotiana tabacum* con el gen 82 reportero GUS, evaluados mediante tinción histoquímica con el buffer fosfatos a pH 8. A y B: explantes de *C. chinense*. A: sin

cocultivar, B: transfromados con LBA4404 pCAMBIA2301. C-D: Explantes de *Nicotiana tabacum*. C: Sin cocultivar, D: explantes transformados con LBA4404 pCAMBIA2301.

- PCR de ADN de C58 pER10-w. Carril 1: marcador de 1 kb, carril 2: 83
   PCR ADN pER10W-35SRed (A. tumefaciens), carril 3 y 4: PCR ADN pER10-W (E. coli). carril 4: mezcla.
- 4.5.2 Evaluación por PCR de las plántulas de *C. chinense* posiblemente 84 transformadas con C58 pER10W-35SRed. (A): Amplificación de un fragmento de 862 pb del tamaño esperado para *WUSCHEL*. (B): Ausencia del fragmento de virE en los tejidos posiblemente transformados. (C) Control de carga ADN. Carril 1: marcador de tamaño molecular de ADN de 1 Kb, carril 2: PCR de ADN plasmídico pER10W-35SRed, carril 3: mezcla, desde el carril 4 hasta el 8: PCR de ADN de plantas de *C. chinense* cocultivadas con A. tumefaciens (C58C1 pER10W-35SRed), carril 9: PCR de ADN de planta de *C. chinense* no cocultivada. Geles de agarosa al 0.8%, 90 V, 40 minutos.
- 4.5.3.1 Explantes de *C. chinense* cocultivados con *A. tumefaciens* pER10W-35SRed en presencia del inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo. A: Número promedio ± error estándar de segmentos con desarrollo de callo en los diferentes tratamientos a la tercera semana de evaluación. B: Número promedio ± error estándar de explantes con desarrollo de callo 15 días después de cambiar los tratamientos (quinta semana). n=30, AE= antes en estradiol, ADMSO= antes en DMSO y 3R medio 2 mg/L ANA, AIA y BAP. C= testigo.
- 4.5.3.2 Explantes de C. chinense cocultivados con A. tumefaciens pER10W-35SRed tratados por inmersión con el inductor (17 β-estradiol). A: Número promedio de segmentos ± error estándar con desarrollo de callo en los diferentes tratamientos a la tercera semana de evaluación. B: Número promedio de explantes con desarrollo de callo en la quinta semana. C= testigo. n=25
- 4.5.3.3 Fluorescencia presentada por el tejido calloso de *C. chinense* 89 transformado con pER10W-35S. A: con filtro RFP, B: a luz visible. Barra horizontal 0.1 cm.
- 4.5.3.4 Fluorescencia presentada por el tejido calloso de *C. chinense* 89 transformado con pLH60. A: con filtro RFP, B: a luz visible. Barra horizontal 0.1 cm.
- 4.5.3.5 Número promedio ± error estándar de tejido calloso de C. chinense 90

transformado (*Dsred*), que presentó mayor fluorescencia con respecto a los callos no transformados.

- 5.6.1 Evaluation of different tissues of C. chinense transformed with C58 109 pER10W-35SRed. (A): Amplification of the corresponding fragment of 862 bp expected for WUSCHEL. Line 1: DNA ladder (1 Kb). 2: pER10W-35SRed, 3: transformed stem, 4: transformed apical meristem, 5: transformed root, 6: transformed leaf, 7: no load, 8: stem, 9: apical meristem, 10: root, 11: leaf, and 12: mix PCR. (B): Absense of virE fragment in transformed tissues, 1: DNA ladder (1 Kb), 2: Agrobacterium, 3: mix PCR, 4: transformed stem, 5: transformed apical meristem, 6: transformed root, 7: transformed leaf, 8-9: no load, 10: stem, 11: apical meristem, 12: root and 13: leaf. (C) Internal control a-tubulin. Line 1: transformed stem, 2: transformed apical meristem, 3: transformed root, 4: transformed leaf, 5: no load, 6: stem, 7: apical meristem, 8: root, 9: leaf. (D and E) seedlings obtained in vitro 4 months old; (D) non transformed and (E) transformed with pER10W-35SRed. Scale bars: D-E. 2 cm.
- 5.6.2 Induced expression of *WUSCHEL* in transformed explants of *C*. 111 chinense with C58 pER10W-35SRed in MS medium. (A-C): After 15 days of treatment, A: without immersion, (B): with immersion only with DMSO, (C): with immersion in 17  $\beta$ -estradiol (10  $\mu$ M) and (D): after 30 days immersion in 110  $\mu$ M in 17  $\beta$ -estradiol. (E): Northern reverse to detect *WUSCHEL* expression in stems: 1: *WUSCHEL* positive control PCR product; 2: water; 3: non transformed and non induced stem; 4: non transformed and induced stem; 5: pER10W-35SRED induced transformed stem. Scale bars: A-B, 0.4 cm; C-D, 0.2 cm.
- 5.6.3 Induced expression of *WUSCHEL* in transformed explants of *C*. 112 *chinense* with C58 pER10W-35SRed in medium MS, after 45 days of applied the immersion treatments. A-D: not transformed explants. A: without immersion, B: immersion only with DMSO, C: 10  $\mu$ M immersion with 17  $\beta$ -estradiol. D: immersion with 110  $\mu$ M 17  $\beta$ estradiol. E-H: transformed explants. E: without immersion. F: immersion only with DMSO. G and H: immersion with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ estradiol. Scale bars: A, 1 cm; B-F: 0.4 cm; G-H: 0.3 cm.
- 5.6.4 Histological sections of segments stems of *C. chinense in vitro* 113 culture MS. A-C: not transformed stems without immersion. D-I: transformed stems with immersion in 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol. A-C: Sections of stems showing the absence of meristematic nodules and of somatic embyos. D-G: Sections of stems showing presence of

meristematic cells (MC). H: Section of stem with an embryogenic callus (CL) showing meristematic nodules (MN). I: Section of stem with an embryogenic callus (CL) showing proembryos (PE) and a globular somatic embryo (GSE). Abbreviations: EP, epidermis; SP, subepidermis; VZ, vascular zones; VA, vascular bundles; PQ, parenchyma. Scale bars: A, 8 mm, B, 6 mm; C, 3 mm; D, 3 mm; E, 4 mm; F, 3 mm; G, 8 mm; H; 250 µm; I, 200 µm.

6.1 Representación esquemática del sistema de transformación 131 genética de C. chinense mediante Agrobacterium tumefaciens.

## LISTA DE CUADROS

# CuadroPag.1.1Trabajos realizados en el género Capsicum en regeneración vía<br/>organogénesis y embriogénesis somática.91.2Trabajos realizados sobre transformación genética mediante<br/>infección con A. tumefaciens en el género Capsicum spp.103.1Tratamientos de lavado y antibióticos presentes en el medio de<br/>cultivo para eliminar Agrobacterium después del cocultivo.49

4.4.3 Actividad tipo GUS a diferentes valores de pH en tejidos de C. 80 chinense (las cruces miden relativamente la actividad de tinción).

# LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
aa	Aminoácidos
A-T	Adenina-timina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-T	ADN de transferencia
AIA	Ácido indolacético
APH	Aminoglucósido fosfotransferasas
ANA	Ácido naftalenacético
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN transferencia
ARNr	ARN ribosomal
AS	Acetosiringona
BAP	6-Bencil amino purina
BA	6-Bencil adenina
bp	Pares de bases
C	Citoplasma
cDNA	Ácido desoxi-ribonucleico complementario

cm ²	Centímetros cuadrados
cm	Centímetro
CMV-CP	Proteína de la cubierta del virus del mosaico del
	pepino
CL	Callo embriogénico
CLV	CLAVATA
CyPs	Ciclofilinas
D	Días
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
DSB	ADN de doble cadena
dsred	Gen que codifica la proteína roja fluorescente
DsRed	Proteína roja fluorescente
EDTA	Etilen diamino tetraacético
EP	Epidermis
g	Gramos
GUS	β-glucuronidasa
GMO	Organismos genéticamente modificados
g/L	Gramos por litro
GSE	Embrión somático globular
h	Horas
HCL	Ácido clohídrico
H3	Histona 3
H2A	Histona 2A
Higro	Higromicina
HR	Recombinación homóloga
1	Hojas
IM	Membrana bacterial interna
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodaltones
LIG4	Ligasa 4
LB	Luria-Bertani
LB	Borde izquierdo
L1-L3	Capas L1-L3
M	Molar
m	Metros
MC	Células meristemáticas
mg/L	Miligramos por litro
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
mm	Milimetros
mM	Milimolar
MN	Nodulos meristematicos
mi	Millitros
MS	Murasnige y Skoog

N ₂	Nitrógeno
N	Normal
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
nptll	Gen neomicina phosphotransferasa II
nm	Nanómetros
NSL	Secuencias de localización nuclear
NaCIO	Cloralex
NHR	Recombinación no homóloga o ilegítima
NHEJ	Enzimas de unión de terminación no homólogas
ng/µl	Nanogramos por microlitro
NOS	Nopalina sintasa
OM	Membrana bacterial externa
PP	Periplasma bacterial
P	Fosforilación
D	Probabilidad
P	Primordios foliares
pb	Pares de bases
PAS	Tinción Ácido pervódico-Schiff
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PBPs	Proteínas de unión a la penicilina
PE	Proembriones
pH	Potencial de hidrógeno
PMMV	Virus del moteado del chile
PMI	Fosfomanosa isomerasa
PQ	Parénguima
p/v	Peso/volúmen
PZ	Zona periférica
RB	Borde derecho
RFP	Proteína roja fluorescente
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Retro transcripción-Reacción en Cadena de la
	Polimerasa
RZ	Zona radical
S	Segundos
SAM	Meristemo Apical de brotes
SCF	Complejo Skp1/cullin/F-box
SC	Células madre
SDS	Dodecil sulfato sódico
sgfp	Gen que codifica la proteína verde fluorescente
spp	Especies
SP	Subepidermis
STM	SHOOT MERISTEMLESS
TDZ	Tidiazuron
T-DNA	ADN de transferencia

TMV-CP	Cubierta del virus del mosaico del tomate
Tsi1	Gen 1 inducido por estrés en tabaco
T4SS	Sistema de secreción IV
uidA	Gen β-glucuronidasa
UV	Ultravioleta
μl	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros
μ <b>moi</b>	Micromoles
VIGS	Silenciamiento de gen inducido por virus
voi	Volumen
V	Voltios
VA	Haces vasculares
VZ	Zona vazcular
w/v	Peso/volúmen
XVE	Sistema inducible con estradiol
X-GLUC	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-glucurónido
ZC	Zona Central
ZEA	Zeatina
ZP	Zona Periférica
°C	Grados Celsius
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
16S	Subunidad ribosomal 16S
30S	Subunidad ribosomal 30S
3R	8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM BAP

# LISTA DE ANEXOS

## Pag.

Anexo 1. Detalle de protocolos utilizados	59
A-1.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO	59
A-1.2 SISTEMA PURIFICACIÓN ADN MINIPREP	59
A-1.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTA	60
A-1.4 ANÁLISIS SOUTHERN BLOT (Amersham Biosciences, 2002)	60
Anexo 2. Experimentos realizados para regenerar <i>C. chinense</i> vía organogénesis o embriogénesis somática	
Anexo 3. Análisis Southern blot (Amersham Biosciences, 2002)	98

## RESUMEN

C. chinense es una especie recalcitrante a la morfogénesis in vitro; sin embargo, hasta la fecha no hay un sistema eficiente y reproducible de transformación genética y de regeneración vía embriogénesis somática. Se llevaron a cabo experimentos para obtener in vitro plantas transformadas de C. chinense, mediante el cocultivo con Agrobacterium tumefaciens utilizando el gen heterólogo WUSCHEL de Arabidopsis thaliana. WUSCHEL promueve la transición del estado vegetativo al estado embrionario. La hipótesis evaluada fue que la transformación genética de C. chinense y la sobreexpresión del gen heterólogo WUSCHEL podía promover una respuesta embriogénica en esta especie. Se realizó el cocultivo de segmentos de embrión cigótico con la cepa C58C1 + pER10W-35Red de A. tumefaciens, la cual incluye el gen WUSCHEL regulado por el promotor inducible GAL4-ER con 17 β-estradiol. Se obtuvieron in vitro, plantas transformadas de C. chinense con el gen heterólogo WUSCHEL, identificadas por PCR. Los segmentos de tallos transformados fueron tratados por inmersión con el inductor (17 β-estradiol) en concentraciones de 10 µM y 110 µM y se colocaron en cultivos en fotoperiodo. Después de 15 días de cultivo, se observaron estructuras globulares en tallos tratados con el inductor a 10 µM y después de 30 días los explantes tratados con 110 μM 17 β-estradiol mostraron estructuras, dichas estructuras estuvieron ausentes en los explantes no inducidos. Esto sugiere que WUSCHEL promueve el desarrollo de tejido desdiferenciado en esta especie, lo cual puede ser una alternativa para resolver la recalcitrancia de esta especie de planta.

### ABSTRACT

C. chinense is a recalcitrant species for in vitro morphogenesis; however up to date there is no efficient, reproducible system for genetic transformation and regeneration of this species via somatic embryogenesis. Here we carried experiments to obtain in vitro transformed plants of C chinense via Agrobacterium tumefaciens cocultivation utilizing the heterologous gene WUSCHEL from Arabidopsis thaliana. WUSCHEL has been shown to promote the transition from vegetative to embryogenic state. The hypothesis tested is that the genetic transformation of C. chinense and overexpression of heterologous gene WUSCHEL will promotes an embryogenic response in this species. We performed cocultivation of zygotic embryo segments with A. tumefaciens strain C58C1 + pER10W-35Red, which include the gene WUSCHEL regulated by GAL4-ER inducible promoter with 17 β-estradiol. We obtained in vitro transformed plants of C. chinense with heterologous gene WUSCHEL as shown by PCR. Segments of transformed stems were treated by immersion with the inducer 17  $\beta$ -estradiol in concentrations of 10  $\mu$ M and 110  $\mu$ M and placed in photoperiod culture. After 15 days of cultivation we observed globular structures in the stems treated with the inductor to 10 µM and after 30 days the explants treated with 110 μM 17 β-estradiol showed additional structures absent in the explants that were not induced. In addition, this suggests that WUSCHEL encourages the development of undifferentiated tissue in this species, which may help as an alternative to solve the recalcitrance from this plant species.

# Introducción

Diferentes métodos de transformación genética han sido desarrollados para introducir genes en plantas, el más exitoso y utilizado es la transferencia de ADN mediante Agrobacterium tumefaciens (Herrera-Estrella et al., 2004). A pesar de que desde 1853 se tenía conocimiento de la enfermedad de la agalla de la corona (Fabre y Dunal, 1853), y en 1897 se identificó a la agrobacteria como agente causal (Agrobacterium vitis) (Cavara, 1897) (citados por Escobar y Dandekar, 2003), no fue hasta 1983 que se reportó la primera planta transformada utilizando la capacidad que tiene Agrobacterium tumefaciens de transferir parte de su ADN-T al genoma de su hospedero (Herrera-Estrella et al., 1983; Zambryski et al., 1983).

A partir de 1990 se tienen reportes de transformación genética vía Agrobacterium tumefaciens para Capsicum spp, siendo la mayoría para Capsicum annuum; sin embargo, ninguno ha mostrado ser eficiente ni reproducible, y a la fecha no se ha reportado ningún protocolo para C. chinense (Liu et al., 1990; Yu-Xian et al., 1996; Manoharan et al., 1998; Mihalka et al., 2000; Romero-Pozueta et al., 2001; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001; Venkataiah et al., 2001; Shin et al., 2002; Shivegowda et al., 2002; Li et al., 2003, Cai et al., 2003; Mihalka et al., 2003; Dabauza y Peña, 2003; Lee et al., 2004).

El principal problema es que es un género recalcitrante, lo que dificulta la regeneración y la transformación genética *in vitro* (Mihalka *et al.*, 2000). La generación de plantas transgénicas ha dependido principalmente de dos factores: el desarrollo de métodos transformación de plantas y el conocimiento de nuevos genes y su función (Herrera-Estrella *et al.*, 2004).

La capacidad de transformar genomas de plantas usando A. tumefaciens, ha hecho posible incrementar la resistencia a virus de plantas de Capsicum spp. por la incorporación de genes de la proteína de la cubierta del virus del mosaico del pepino (CMV-CP) (Yu-Xian et al., 1996; Zhu et al., 1996; Shin et al., 2002; Cai et al., 2002 y 2003), al igual que utilizando el gen de la cubierta del virus del mosaico del tomate (TMV-CP) (Cai et al., 2003), genes antisentido ARN, o genes satélites dentro del genoma nuclear del hospedero (Kim et al., 1997). La presencia de ARNs satélite causa la atenuación de síntomas pero en algunos casos, puede inducir más severidad y diferentes sintomas (Kim et al., 1997). En el estudio de Kim et al. (1997), la progenie de plantas transformadas con ARN satélite CMV, redujo los síntomas de Capsicum annuum cv. Golden Tower infectadas con CMVY o CMV-Korea baio condiciones de invernadero. También se han obtenido plantas de chile expresando el gen Tsi1 (gen 1 inducido por estrés en tabaco), con resistencia al virus del moteado del chile (PMMV), virus del mosaico del pepino (CMV), la bacteria Xanthomonas campestris pv. vesicatoria, y además el comiceto Phytophthora capsici (Shin et al., 2002).

En el presente trabajo se llevaron a cabo estudios para obtener plantas transformadas *in vitro* de *C. chinense* mediante *A. tumefaciens*, ya que es indispensable contar con un método de transformación genética no solo para el mejoramiento genético de la especie sino para el estudio y entendimiento de genes particulares.

Además, *C. chinense* es una especie recalcitrante a la morfogénesis (Santana-Buzzy *et al.*, 2005; López-Puc *et al.*, 2006) y hasta la fecha no se cuenta con un sistema de regeneración eficiente y reproducible vía embriogénesis somática. Por lo tanto, se decidió utilizar el gen heterólogo *WUSCHEL*, el cual en *Arabidopsis thaliana* tiene un rol clave durante la embriogénesis, promoviendo la transición del estado vegetativo al embriogénico y/o en el mantenimiento de la identidad de las células madre del meristemo apical del brote, floral y embriogénico (Mayer *et al.*, 1998; Zuo *et al.*, 2002). Por lo tanto, la transformación genética de *C. chinense* y la sobreexpresión del gen heterólogo *WUSCHEL* podría favorecer la respuesta embriogénica en esta especie.

# Capítulo 1

## Antecedentes

#### 1.1. GENERALIDADES DE Capsicum chinense Jacq.

#### 1.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del género Capsicum es la siguiente (Andrews, 1995):

Reino: Plantae División: Angiospermae Clase: Dycotyledoneae Subclase: Metachlamydeae Orden: Tubiflorae Familia: Solanaceae Género: Capsicum Especie: Capsicum chinense

#### 1.1.2 Descripción botánica de C. chinense

C. chinense es una planta de ciclo anual, pudiendo alcanzar hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico (Tun, 2001). Tiene raíz pivotante, la cual se profundiza de 0.40-1.20 m, con raíces secundarias extendidas en el suelo. Su tallo es grueso, erecto, glabro, robusto y generalmente tiene tendencia a formar tres tallos en la primera ramificación, la que ocurre entre la décima y duodécima hoja, para después continuar bifurcándose, con un crecimiento semi-indeterminado; después de la primera trifurcación muy raramente las tres ramas alcanzan el mismo desarrollo (Tun, 2001). El tallo tiene una altura variable de 0.3 a 1.2 m.

Las hojas son de color verde oscuro brillante, de forma oval y en ocasiones pueden alcanzar hasta 15 cm de largo por 10 cm de ancho; normalmente son de margen ondulado, lo cual es una característica distintiva de *C. chinense* (Andrews, 1995).

Generalmente tiene de 3 a 5 flores por nudo. Los pedicelos son curvados, raramente erectos, el cáliz no es dentado y tiene una depresión marcada en la base, la corola es de color blanco verdoso o amarillento, raramente de color blanco claro, de 0.5 a 1 cm de longitud, con lóbulos no extendidos algunas veces soldados. Las anteras son de color azul a morado.

Sus frutos miden de uno a 12 cm de longitud y su forma varía desde esférica a alargada. Pueden ser lisos o arrugados, de color verde cuando tiernos y al madurar anaranjado, amarillo, salmón, rojo o café. Los bordes de la semilla son generalmente arrugados y de color amarillo (Corona, 2000).

Las semillas son lisas, ovaladas, y pequeñas (2.5 a 3.5 mm); tienen testa de color café claro a café oscuro y su período de germinación varía entre ocho y 15 días (Tun, 2001).



Figura 1.1. Frutos de Capsicum chinense (Fotos: A y B : González-Estrada, T.).

#### 1.1.3 Origen de la especie

El Estado de Yucatán cuenta con la mayor diversificación de chiles criollos en el país; entre los que se encuentra el habanero (*Capsicum chinense*); cuyo origen se desconoce aunque se cree que es originario de América del Sur de donde fue introducido a Cuba y de ahí a la Península de Yucatán. Esta hipótesis se refuerza al comprobar que el chile habanero, es el único chile de Yucatán que no tiene nombre maya (Soria, 1988).

*C. chinense* es la especie cultivada más importante en la región oriental de Los Andes en América del Sur. En esa región se puede encontrar la mayor diversidad de tipos, tamaños, formas, colores, sabores y pungencia. Una de las principales características de los frutos de esta especie es que son considerados como extremadamente picantes. Uno de los tipos colectados de *C. chinense* (Red Savina Habanero) es conocido actualmente como el chile más picante del mundo (Torres y Franco, 2005).

#### 1.1.4 Usos e importancia económica

El Capsicum chinense Jacq., es un cultivo de gran importancia económica, actualmente se cultiva todo el año en Yucatán y se siembran según estadísticas de la secretaría de agricultura y desarrollo rural, alrededor de 300 hectáreas anualmente y se obtiene una producción de 3,600 toneladas del producto que se consumer en el estado, se envían a diversas partes de la república mexicana y al extranjero (<u>http://amsda.com.mx/PREstatales/Estatales</u> /YUCATAN/PREchile.pdf).

Los estados de Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas fueron los mayores productores de chile (50% de la producción nacional). Yucatán produjo el 0.22%

(2,826 tm). Los otros estados productores de chile habanero fueron: Quintana Roo, Campeche y Tabasco (Santana *et al.*, 2003).

El consumo de este volumen de producto es de un 65% fresco y en un 35% industrializado en salsas picantes. La mayor cantidad de la producción se vende en la Ciudad de Mérida para ser trasladada a los diferentes destinos.

Hasta hace 3 años, la producción se comercializaba para los mercados siguientes: 10% nacional, 30% regional y 60% local <u>http://amsda.com.mx/</u> <u>PREstatales/Estatales/YUCATAN/PREchile.pdf</u>.

Los usos de los frutos ya sea en fresco o procesados son múltiples. Aparte del consumo fresco, cocido o como condimento o "especia" en comidas típicas de diversos países, existe una gran gama de productos industriales que se usan en la alimentación humana; congelados, deshidratados, encurtidos, enlatados, pastas y salsas (Rengifo, 2003).

La capsaicina, es demandada por diferentes sectores productivos. Se usa como saborizante en la preparación de ciertas carnes frías, en la fabricación de cigarrillos, como repelente en la agricultura, contra mamíferos depredadores en la ganadería menor, como sustancia activa de las pinturas marinas para rechazar los caracolillos y como estimulante en la industria farmacéutica. Es también componente básico del llamado "pepper gas", utilizado en el campo militar y de los atomizadores contra asaltantes (CCI, 2003).

#### 1.1.5 Principales plagas

Las principales plagas que afectan a las plantaciones de chile son:

Mosquita blanca (Bemisia tabaci Genn). Este insecto pertenece al orden homóptera y familia Aleyrodidae. En México se reportan solo 5 géneros de importancia agrícola: Dialeurodes, Bemisia, Aurothrixus, Trialeurodes y Alerocanthus. Las ninfas y los adultos se alimentan en el envés de las hojas succionando los nutrientes de la planta por lo cual se produce el amarillamiento de la misma, acaparamiento y disminución en el rendimiento (Ruiz y Trejo, 2005). El mayor peligro se encuentra en la transmisión de enfermedades virales, las cuales pueden causar pérdidas hasta de un 100% en la producción.

Pulga saltona (*Epitrix cucumeris* Harris). Este insecto que mastica las hojas de las plantas es considerado también transmisor de enfermedades al llevar microorganismos patógenos de una planta a otra (Sosa, 1985).

Pulgón verde (Aphis gossypii Glover). Este insecto chupador pertenece al orden homóptera, de la familia Aphididae, es un transmisor de enfermedades que ocasiona grandes pérdidas en la producción de chile habanero. Este insecto es un vector de enfermedades virales como el mosaico, ya que después de alimentarse de una planta sana, le transmite la enfermedad.

#### 1.1.6 Enfermedades

*C. chinense* es una especie altamente susceptible a patógenos virales y hongos (Delis *et al.*, 2005), que ocasionan importantes pérdidas del cultivo.

Enchinamiento o Mulix: conocida regionalmente bajo este nombre, se manifiesta en las hojas que cambian su color oscuro a claro, e incluso en ocasiones hasta amarillo, se desarrollan poco y se arrugan. Esta enfermedad es transmitida por los insectos chupadores de plantas silvestres o cultivadas (Sosa, 1985).

*Phytophtora capsici:* causa la marchitéz o la secadera del chile, enfermedad que año tras año, genera grandes pérdidas en la producción y calidad del chile a nivel regional.

## 1.1.7 Situación actual del cultivo de C. chinense

El Capsicum chinense Jacq., es un cultivo de gran importancia económica para los productores del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo de tomate. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye en más del 90% del volumen de producción estatal, que en su mayor parte se comercializa y se consume en fresco y sólo una pequeña parte se utiliza en la industria como materia prima para la elaboración de salsa picante (Tun, 2001).

La reconocida tradición yucateca en el cultivo y consumo de *C. chinense* ha permitido que este producto se ofrezca en otros mercados tanto nacionales como extranjeros. Esto ha generado un gran interés y demanda en otras regiones, que oscila ente las 6 a 10 toneladas de fruto verde semanalmente. Ante esta oportunidad los productores, comercializadores e industrializadores empiezan a enfrentar situaciones y problemas no previstos, tanto en el terreno de la producción (manejo fitosanitario), su comercializados (pastas y extractos) (Trujillo, 2005). En Yucatán se están desarrollando estrategias para mejorar la producción de este cultivo así como las vías de comercialización en el Estado para ampliar su mercado a nivel Nacional e Internacional.

## **1.2 MÉTODOS DE MEJORAMIENTO EN Capsicum**

Existen diferentes métodos de mejoramiento que se podrían utilizar para producir nuevas variedades de *C. chinense*. Actualmente, el mejoramiento genético de las plantas se puede llevar a cabo mediante dos grandes vertientes metodológicas: mediante técnicas convencionales o tradicionales, que implica los cruzamientos y selección clásicos o mediante técnicas biotecnológicas, las cuales involucran la utilización de métodos de biología molecular y cultivo de tejidos *in vitro* (Polci *et al.*, 2005).

Entre los primeros destacan la selección masiva, el pedigree, las retrocruzas, la selección recurrente, las mutaciones y la hibridación. Entre los segundos se pueden mencionar, la selección asistida por marcadores moleculares, el cultivo de tejidos, con diferentes variantes como la clonación, la embriogénesis somática, la variación somaclonal y las más recientes de todas la transformación y la ingeniería genética. A pesar de todas estas posibilidades, desafortunadamente se ha hecho muy poco uso de estas herramientas metodológicas.

## **1.3 MEJORAMIENTO CON MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS**

#### 1.3.1 Cultivo de tejidos y clonación

El cultivo de tejidos implica la utilización de técnicas de cultivo in vitro que en términos generales consisten en mantener en un medio nutritivo estéril un conjunto de células, tejidos o plántulas las cuales crecen y se multiplican vegetativamente. El tejido inicial se esteriliza para evitar la contaminación de microorganismos y el medio de cultivo deberá proporcionar los nutrientes, carbohidratos, reguladores de crecimiento y aminoácidos necesarios para la división, multiplicación y diferenciación celular.

El cultivo de tejidos de C. chinense se puede subdividir en diferentes áreas de investigación como son: el cultivo de anteras, el cultivo de protoplastos, el rescate de embriones, la embriogénesis somática y la organogénesis.

Por otra parte, se ha reportado la clonación exitosa de C. chinense mediante esquejes enraizados *in vivo* sin recurrir a la utilización de un laboratorio de cultivo de tejidos (Cerón, 2004).

#### 1.3.2 Ingeniería genética y transformación

Entre las metodologías de mejoramiento genético, la ingeniería genética y la transformación constituyen las técnicas más recientes y sofisticadas para introducir una característica específica al genoma de un cultivo. La ingeniería genética permite manipular, específicamente aislar, cortar y pegar el ADN que codifica para un gen responsable de alguna característica productiva de interés.

La transformación genética permite mediante un medio biológico o uno físico transferir el ADN de interés al núcleo de la célula que se desea modificar. Eventualmente dicho ADN se incorpora establemente en algún cromosoma y se expresa para dar lugar a la nueva característica genética. La célula transformada se tiene que multiplicar y diferenciar para dar lugar a una nueva planta.

#### 1.3.3 Métodos de transferencia directa de ADN

Los métodos de transferencia directa se han desarrollado para poder introducir al ADN directamente al interior de la célula vegetal, atravesando la barrera de la pared y la membrana de la célula vegetal, sin la ayuda de los vectores biológicos (plásmidos, bacteriófagos o cósmidos) (Canto, 2003). Dentro de este grupo, se encuentran los métodos para la obtención de plantas. transgénicas como el bombardeo de micropartículas, fibras de carburo de silicio, microinyección y electroporación (Herrera-Estrella *et al.*, 2004).

En el capítulo II se menciona en detalle la transferencia de ADN empleando vectores biológicos, caso particular de *Agrobacterium tumefaciens*.

## 1.4 AVANCES EN EL DESARROLLO DE SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA PARA *Capsicum* spp.

En los últimos años se han descrito varios protocolos de transformación y regeneración para varias especies de *Capsicum* (Cuadros 1.1 y 1.2); en su mayoría han sido para *C. annuum* L. (Mihalka *et al.*, 2000; Shivegowda *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005) y Venkataiah *et al.* (2001) emplearon explantes de *C. baccatum, C. frutescens* y *C. praetermissum.* Sin embargo, éstos reportan una baja eficiencia de transformación y reproducibilidad (Mihalka *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005).

Los dos prerrequisitos más importantes para el éxito del método de transformación genética son la disponibilidad de un sistema de regeneración de los explantes y un método para la transformación, los cuales no están disponibles para *Capsicum* (Manoharan *et al.*, 1998; Venkataiah *et al.*, 2001; Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Dabauza y Peña, 2003; Delis *et al.*, 2005).

A continuación se presentan los Cuadros 1.1 y 1.2 que resumen algunos de los trabajos que se han realizado en el género *Capsicum* sobre regeneración y transformación genética.
Regeneración	Especie	Regulador de crecimiento	Explante	Respuesta
López-Puc et al., 2006	C. chinense Jacq.	9.05 μM 2,4-D	Hipocótilos	175 emb/exp
Khan et al., 2006	C. annuum L.	0.5 µM TDZ	Hipocótilos	85%
Kumar <i>et al.</i> , 2005	C. annuum L.	26.63 μM BA+2.28 μM AIA+ 10 μM Ag NO ₃	Meristemo apical y cotiledones invertidos	19/24 br/expl
Santana-Buzzy et al., 2005	C. chinense Jacq.	MS+TDZ (3.4 μM)	Nudos (15-21 d)	75% (7-8 br/ exp)
Zapata-Castillo et al., 2007	C. chinense Jacq.	9.05 μM 2,4-D	Hipocótilos	20-30% germinados
Steinitz et al., 2003	C. annuum L.	0.40-0.45 mM 1.15-1.30 mM 2,4-D y centrofenoxina	Embrión cigótico	95% (6 emb/ exp)
Kintzios et al., 2001	C. annuum L.	9.05 μM 2,4-D+ 12.9 μM BA	Hojas cotiledonarias	70.2 %
Kintzios et al., 2000	C. annuum L.	9.05 μM 2,4-D+ 12.9 μM BA	Hojas cotiledonarias	1.1 /100 emb
Binzel <i>et al</i> ., 1996a	C. annuum L.	ZEA 10 μM	1/2 embrión cigótico (hipocótilos o cotiledón)	85% (6-8 br/expl)
Binzel <i>et al</i> ., 1996b	C. annuum L.	MS+2,4-D (9 μM)+agua de coco (10%) y sacarosa 8%	Embrión cigótico inmaduro	+ 70%
Buyukalaca y Mavituna, 1996	C. annuum var Ace	MS+2,4-D (9.0μM) y sacarosa 3%	Embrión cigótico inmaduro	97%
Harini y Sita, 1993	C. annuum L.	MS+2,4-D o ANA (1-5 mg/L) 2-10% sacarosa	Embrión cigótico irimaduro	6-19 emb/emb cigótico
Valera-Montero y Ochoa -Alejo, 1992	C. annuum L.	5 mg/L BA+ 0.3 mg/L AIA	Hipocótilos enraizados	46.7 a 100%

Cuadro 1.1 Trabajos realizados en el género Capsicum en regeneración vía organogénesis y embriogénesis somática.

La principal limitación es que *Capsicum* es recalcitrante, dificultando la regeneración y transformación genética *in vitro* (Mihalka *et al.*, 2000). La regeneración en la mayoría de los cultivares de este género se han reportado vía organogénesis por inducción de brotes, empleando cotiledones (Mihalka *et al.*, 2000; Shivegowda *et al.*, 2002; Mihalka *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004),

hipocótilos (Lee et al., 2004; Delis et al., 2005), o nudos (Santana-Buzzy et al., 2005).

Transformación	Cepas bacterianas	Vector	Antibiótico para eliminar bacteria	Gen reportero y/o interés	Antib. cél. vegetal
Delis <i>et al.</i> , 2005	LBA4404	pBI121	Timentina (300 mg/L)	GUS	Kan (50 mg/L)
Lee et al., 2004	EHA105 LBA4404	pCAMBIA 2300	Cefotaxima (300 mg/L)	TMV-CP	Kan (100 mg/L)
Li <i>et al.</i> , 2003	LBA4404	pBI121	Carbenicillina (500 mg/L)	GUS	Kan (50 mg/L)
Dabauza y Peña, 2003	C58, EHA105 1102,42CN BP Ach5, A281	pMP90/pBin pBin19	Cefotaxima (500 mg/L)	sgfp	Kan (25 mg/L)
Cai <i>et al.,</i> 2002	LBA4404	pBTC	Carbenicillina (300 mg/L)	CMV-CP TMP-CP	Kan (75 mg/L)
Shin <i>et al</i> ., 2002	LBA4404	pMBP2	-	CMV-CP TMV-CP	Kan (100 mg/L)
Shivegowda et al., 2002	C58	pGV1040	Cefotaxima (500 mg/L)	GUS	Kan (100 mg/L)
Venkataiah et al., 2001	MVR 240299	pCAMBIA 1304	Cefotaxima (500 mg/L)	GUS	Higro (25 mg/L)
Mihalka <i>et al.,</i> 2000	C58C1Rif LBA4404 EHA101 A281	pRGG	Cefotaxima (500 mg/L) Augmentina (400 mg/L)	GUS	Geneticina (25 mg/L)
Manoharan et al.,1998	EHA 105	pBI121	Cefotaxima (400 mg/L)	GUS	Kan (50 mg/L)
Yu-Xian <i>et al.</i> , 1996	GV3111-SE	pTi653SE pHCM40 CMV-CP	Carbenicillina (500mg/L)	CM-CP	Kan (50 mg/L)
Liu <i>et al</i> ., 1990	A281 C58	GV3850 (p3-1-GUS)	Mefoxin (500 µg/ml)	GUS	Kan (150 mg/L)

**Cuadro 1.2** Trabajos realizados sobre transformación genética mediante infección con *A. tumefacies* en el género *Capsicum* spp.

## 1.5 ANTIBIÓTICOS β-LACTÁMICOS PARA ELIMINAR A. tumefaciens DESPUÉS DEL COCULTIVO

En la transformación mediada por *Agrobacterium*, la eliminación de la agrobacteria es necesaria para minimizar el riesgo de interferencia en el crecimiento y regeneración de los tejidos de plantas potencialmente transformados, y para reducir el riesgo de liberar la agrobacteria al ambiente (Ogawa y Mii, 2005).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos han sido utilizados para eliminar Agrobacterium (Ogawa y Mii, 2007). Estos antibióticos se unen a proteínas de unión a la penicilina (PBPs) e interfieren con la biosíntesis de los componentes peptidoglucanos de la pared celular bacteriana, provocando la lisis y muerte bacteriana (Ogawa y Mii, 2005). Debido a que los peptidoglucanos son componentes específicos de la pared celular de los procariotas, los  $\beta$ lactámicos tienen menores efectos en la pared celular de los eucariotas comparado con los inhibidores de ácidos nucleicos o síntesis de proteínas, como aminoglucósidos, cloramfenicol, macrolidos y tetraciclinas (Ogawa y Mii, 2004; Ogawa y Mii, 2005).

La presencia de un anillo betalactámico define químicamente a esta familia de antibióticos, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, oxacefemos, monobactamos y carbapenemos, y actualmente están siendo desarrollados la actividad antibacteriana para aumentar y expandir (Ogawa y Mii, 2005). La susceptibilidad de la bacteria gram negativa a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos es principalmente determinada por propiedades transmitidas por el cromosoma; por ejemplo, la afinidad de las PBPs a la droga, la producción de las  $\beta$ -lactamasas, y la permeabilidad externa de la membrana de las drogas vía poros de los canales (Ogawa y Mii, 2004).

Típicamente, las penicilinas semisintéticas estructuralmente relacionadas, como la carbenicillina, ticarcillina o el antibiótico cefalosporina (por ejemplo, cefotaxima) se usan para eliminar *Agrobacterium* después del cocultivo (Cai *et al.*, 2003; Ogawa y Mii, 2004, Ogawa y Mii, 2005). Sin embargo, los tejidos necesitan subcultivarse en medio con antibiótico al menos 2 o 3 veces para evitar la reincidencia bacteriana (Cheng *et al.*, 1998).

Estos antibióticos son generalmente considerados como inertes y no tóxicos en el cultivo celular de plantas, pero en diferentes casos se ha encontrado que el proceso de regeneración puede ser influido significativamente por los antibióticos (Mihalka *et al.*, 2000). El tipo y concentración del antibiótico puede ser crítico cuando se requiere un bajo nivel y un balance estrecho de reguladores de crecimiento.

Uno de los requerimientos más importantes para la transformación mediada por *Agrobacterium* es la selección de un adecuado antibiótico que no inhiba el crecimiento por organogénesis o embriogénesis de los tejidos de la planta en concentraciones efectivas para el control de la agrobacteria (Ogawa y Mii, 2004 y 2005). Sin embargo, se reporta que estos antibióticos tienen efectos

como el de los reguladores de crecimiento en cultivo de tejidos de plantas y podrían afectar la embriogénesis somática en muchas especies (Tsong-Ann *et al.*, 2001).

En experimentos de transformación genética de *Capsicum* han empleado cefotaxima para eliminar *A. tumefacies* a concentraciones de 300 mg/L (Romero-Pozueta *et al.*, 2001), 400 mg/L (Manoharan *et al.*, 1998) y 500 mg/L (Liu *et al.*, 1990; Mihalka *et al.*, 2000; Venkataiah *et al.*, 2001; Mihalka *et al.*, 2003; Dabauza y Peña, 2003). Adicionalmente, se reporta el uso de carbenicillina a concentraciones de 300 mg/L (Cai *et al.*, 2002) y 500 mg/L (Yu-Xian *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2003).

#### 1.6 GEN REPORTERO uidA

El gen GUS (formalmente *uidA*) que codifica a la  $\beta$ -glucuronidasa, es ampliamente utilizado como gen reportero en plantas y en otros organismos. Este fue originalmente aislado de *Escherichia coli* (Gallagher, 1992).

La expresión de la fusión del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa puede ser medido por fluorometría, espectrofometría, o ensayo histoquímico. GUS se encuentra activo en un amplio rango de pH. Sin embargo, los ensayos de la enzima de *E. coli* son generalmente realizados entre pH 7 y 8 para evitar la actividad GUS presente en muchos tejidos de plantas y animales (Naleway, 1992).

A pesar de que el ensayo histoquímico para la actividad de GUS tiene muchas ventajas, el color azul conferido es muy difícil de detectar cuando el nivel de expresión de GUS es bajo y/o cuando la densidad óptica de los tejidos de las plantas es alto. Para esto se utiliza un tratamiento para aclarar los tejidos y reducir la densidad óptica de las muestras de plantas. En tejidos de color verde, la clorofila es eliminada con etanol para permitir la visualización de la tinción azul (Rech *et al.*, 2003).

## **1.7 AGENTES SELECTIVOS**

En la transformación genética, además de incorporar genes que le confieren características deseables a las plantas, se requiere la inclusión de genes marcadores capaces de seleccionar células y tejidos de plantas transformadas.

Los marcadores selectivos se basan en genes dominantes que confieren la capacidad de crecer en presencia de agentes selectivos como antibióticos o herbicidas, que son tóxicos a las células o que inhiben el crecimiento de las plantas (Scutt *et al.*, 2002). En este caso son llamados "estrategias de selección negativas".

Recientemente han surgido nuevas estrategias como los sistemas de selección positiva; donde el agente selectivo es convertido en un componente

metabolizable; uno de esos sistemas utiliza la fosfomanosa isomerasa (PMI), derivado de *Escherichia coli* para convertir la manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. Únicamente las células transformadas son capaces de utilizar la manosa como fuente de carbono (Sonntag *et al.*, 2004).

Un factor importante de la aparición de resistencia a antibióticos es la existencia de enzimas que químicamente modifican los antibióticos. Una clase de enzimas es la familia de las aminoglucósido fosfotransferasas (APH), la cual usa el ATP mediado por la transferencia de fosfato para modificar químicamente e inactivar los antibióticos aminoglucósidos como la estreptomicina y kanamicina (Nurizzo *et al.*, 2003).

Los aminoglucósidos actúan primero interrumpiendo la expresión de proteínas e interfiriendo con la traducción en el nivel de reconocimiento apropiado de aminoacil ARNt en el sitio ribosomal A; seguido por una serie de efectos secundarios, incluyendo el daño membranal, provocando la inhibición del crecimiento y muerte celular (Boehr *et al.*, 2001). El receptor ribosomal para la mayoría de los antibióticos aminoglucósidos incluyendo la gentamicina C, kanamicina y neomicina es la 16S ARNr de la subunidad 30S (Boehr *et al.*, 2001).

El marcador de resistencia a antibióticos más utilizado en la selección de células de plantas transformadas es el gen *nptil*, también llamado *aph* (3')-*ll*, el cual confiere resistencia a los antibióticos neomicina y kanamicina (EFB, 2001). En la mayoría de los reportes de transformación genética para *Capsicum*, se ha utilizado la kanamicina como agente selectivo en concentraciones desde 25 mg/L hasta 250 mg/L (Liu *et al.*, 1990; Manoharan *et al.*, 1998; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002a; Shivegowda *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002b; Cai *et al.*, 2002; Dabauza y Peña, 2003; Mihalka *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005). Sin embargo, la kanamicina no es un marcador de selección óptimo para la transformación genética de *Capsicum* spp., debido a que estas especies son altamente tolerantes a este antibiótico de selección en concentraciones de hasta 200 mg/L (Mihalka *et al.*, 2000, Shin *et al.*, 2002b). Esto ocasiona escapes de plantas tolerantes a la kanamicina en los experimentos de transformación genética de plantas (Mihalka *et al.*, 2000).

#### 1.8 WUSCHEL

En Arabidopsis se identificó que las mutaciones en el gen WUSCHEL causan defectos en el ápice del tallo, provocando la ausencia del meristemo del ápice del tallo y de órganos centrales en las flores (Laux *et al.*, 1996; Mayer *et al.*, 1998).

Este gen codifica para una proteína de 291 aminoácidos y la comparación de secuencias reveló que posee dos dominios: una región entre los residuos 33-98 que es similar a homeodominios y un dominio acídico entre los residuos 234-241. Análisis computacionales determinaron que el dominio

acídico es similar a los dominios de transactivación presentes en reguladores transcripcionales (Mayer et al., 1998).

WUSCHEL es una proteína homeodominio y funciona como un activador transcripcional del meristemo apical del tallo y del meristemo floral para mantener íntegra la función y estructura de estos tejidos (Mayer *et al.*, 1998). Además, tiene un rol durante el desarrollo del meristemo embriogénico y postembriogénico (Mayer *et al.*, 1998).

La expresión de WUSCHEL inicia en el embrión conformado por 16 células y gradualmente se limita a un pequeño grupo de células debajo de las células madre en la capa L3 (Figura 1.2), durante las etapas de embriogénesis y postembriogénesis (Mayer et al., 1998).



Figura 1.2 (a): Organización del meristemo apical del tallo. Los tejidos del tallo de la planta se derivan de 3 capas del meristemo del tallo, L1-L3 (flechas). Cada capa contiene 1-3 células (sc) dentro de la parte apical de la zona central (CZ). Los primordios (p) se inician en la zona periférica (PZ). Debajo de la CZ está la zona transitoria que forma la médula del eje del tallo. (b): la expresión de *WUSCHEL* se limita a un grupo pequeño de células (rayas) debajo de la CZ, cerca de las células madres de L1-L3 (sc) y sobre RZ. I: hoja, p: primordios foliares y PZ: zona periférica (Mayer *et al.*, 1998).

En estudios con Arabidopsis thaliana se determinó que WUSCHEL promueve la transición del estado vegetativo a embriogénico, ya que tiene un rol clave en el mantenimiento y/o inducción del potencial embriogénico (Zuo *et al.*, 2002). Se observó que las raíces transformadas con el gen inducible con estradiol XVE WUSCHEL, en medio de cultivo con el inductor formaron callo embriogénico del cual se desarrollaron embriones somáticos. Dichos embriones fueron capaces de germinar y formar plantas adultas fértiles, las cuales fueron morfológicamente indistinguibles de las de plantas silvestres (Figura 1.3).



Figura 1.3 Raíces de Arabidopsis thaliana transformadas con el gen inducible con estradiol XVE-WUS. (a): en medio sin inductor a los 20 días, de la b a la d: en presencia del inductor, (b) a los 10 días; (c): a los 20 días y (d): a los 30 días. (e): embrión cigótico aislado del explante mostrado en (d). (f): germinación de plántulas derivadas de embriones creciendo en medio MS a los 45 días. Barra= 100 μm (a y e); 1 mm (b-d, f) (Zuo et al., 2002).

# 1.9 JUSTIFICACIÓN

C. chinense carece de un sistema que permita su manipulación genética, debido a la recalcitrancia a la morfogénesis *in vitro* y a falta de un protocolo de transformación genética.

En el presente trabajo se realizaron los primeros experimentos para obtener plantas transformadas *in vitro* de *C. chinense* mediante infección con *A. tumefaciens*, ya que es indispensable contar con un método de transformación genética no solo para el mejoramiento genético de la especie sino para el estudio y entendimiento de genes particulares.

# 1.10 HIPÓTESIS

Agrobacterium tumefaciens será capaz de transferir su ADN-T a células de C. chinense cultivadas in vitro, y las células transformadas serán capaces de regenerar plantas con el transgen.

WUSCHEL actúa como activador de la embriogénesis en algunos tejidos vegetativos de Arabidopsis thaliana; por lo que en C. chinense se esperaría que la sobreexpresión de este gen heterólogo incremente la respuesta embriogénica.

## 1.11 OBJETIVO GENERAL

• Transformar genéticamente células de Capsicum chinense Jacq y obtener plantas con los genes reporteros (GUS, dsRed) y/o el gen WUSCHEL.

# **1.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Seleccionar un sistema de regeneración en C. chinense con el fin de transformar genéticamente.
- Evaluar los segmentos de C. chinense cocultivados con LBA4404 pCAMBIA2301, C58 pER10W-35SRed y C58 pLH60.
- Caracterizar mediante tinción histoquímica la actividad tipo βglucuronidasa en diversos tejidos de C. chinense.
- Evaluar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) plantas o células transgénicas.
- Evaluar la proteína roja fluorescente en explantes transformados.
- Determinar el efecto del gen WUSCHEL sobre la regeneración de plantas de C. chinense transformadas con pER10W-35SRed e inducidas con el 17 β-estradiol.
- Verificar por RT-PCR la expresión del gen *WUSCHEL* en explantes de *C. chinense* posiblemente transformados.

# **1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

La estrategia experimental desarrollada en este trabajo se ilustra en la Figura 1.4.



Figura 1.4 Diagrama de flujo para la transformación genética de segmentos de embrión cigótico de *Capsicum chinense* mediante *A. tumefaciens*.

# **1.14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1. Andrews, J (1995). Peppers: the domesticated *Capsicums*. University of Texas Press. Austin, Texas. pp: 132.
- Binzel, M., Sankhla, N., Joshi, S., and Sankhla, D (1996a). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports. 15: 536-540.
- Binzel, M., Sankhla, N., Joshi, S., and Sankhla, D (1996b). In vitro regeneration in chile pepper (*Capsicum annuum* L.) from half-seed explants. Plant Growth Regulation. 20: 287-293.
- Boehr, D., Thompson, P., and Wright, G (2001) Molecular mechanism of aminoglycoside antibiotic kinase APH(3')-Illa. The Journal of Biological Chemistry. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. 276 (26): 23929-23936.
- Buyakalaca, S., Mavituna, F (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 46: 227-235.
- Cai, W., Rong-Xiang, F., Feng-Li, Z., Jiu-Chun, Z., Xiaoying, CH., Guiling, W., K-Qiang, M., Hong-Sheng, S., Xu, W., and Yue-Ren, L (2002) Virus-resistant Chili pepper produced by *Agrobacterium* speciesmediated transformation. In Khachatourians, G., Mc.Hughen, Scorza, R., Nip, W.K., Hui, Y.H. Transgenic plants and Crops. Marcel Dekker, Inc. N.Y. 563-577.
- Cai, W-Q., Fang, X., Shang, H.S., Wang, X. and Mang, K.Q (2003). Development of CMV and TMV resistant transgenic chilli pepper: field performance and biosafety assessment. Molecular Breeding. (11): 25-35.
- Canto, J.C (2003). Optimización del protocolo de transformación genética de microtomate (*Lycopersicon esculetum* Mill) vía *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Mérida, Yucatán, México. 52 p.
- Cerón, V.H (2004). Optimización de condiciones para enraizar esquejes de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de licenciatura. ITA # 2. Conkal, Yucatán, México. 50 p.
- CCI. Comerciailzación regional del ajl. (En red). Consultado: 09-01-06. http://www.cci.org.co/informacion/sipsa/semanal/Boletin/2002/bolmay17. pdf.
- 11. Cheng Z-M., Schnurr, J.A., and Kapaun J.A (1998). Timentin as an alternative antibiotic for supression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. Plant Cell Reports. 17: 646-649.
- Corona, T (2000). Diversidad morfológica, isoenzimática y de contenido de ADN nuclear en chile (*Capsicum annum* L. y *C. chinense* Jacq.) de México. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo. México. pp: 118.

- Dabauza, M and Peña, L (2003). Response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens* as a means of selecting proper vectors for genetic transformation. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78: 65-72.
- Delis, M.; Garbaczewska, G.; Niemirowicz-Szczyy, K (2005). Differentiation of adventitious Buds from *Capsicum annuum* L. Hypocotyls after co-culture with *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica. 47(1):193-198.
- Dzul, J. de la C (2001). Chile Habanero. Características y tecnología de producción. SAGARPA. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Sureste. Mocochá, Yucatán, México.Fundación Yucatán Produce A. C. pp: 73.
- 16. Escobar M.A., Dandekar A.M (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. Trends in Plant Science. 8(8): 380-386.
- Gallagher, S (1992). The GUS reporter gene system. In: Gallagher, S. 1992. GUS Protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc. California: 1-20.
- Harini, I., and Sita, L (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). Plant Science. 89:107-112.
- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., and Martínez-Trujillo, M (2004). Transgenic Plants. An historical perspective. In: Peña, L. Transgenic Plants. Methods and Protocols. Humana Press. 286: 3-31.
- Herrera-Estrella, L., De Block, M., Messens, E., Hernalsteens, J-P., van Montagu, M., and Schell, J (1983). Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. The Embo Journal. 2 (6): 987-995.
- Khan, H., Siddique, I. and Anis, M (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. Brief communication. Biologia Plantarum, 50 (4): 789-792.
- Kim, S.J., Lee., S.J., Kim. B.D., Aek, K.H (1997). Satellite RNA mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). Plant Cell Reports. 16: 825-830.
- Kintzios, S., Drossopoulos, J.B., Shortsianitis, E., and Peppes, D (2000). Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). effect of leaf position, illumination and explant pre-treatment with high cytokinin concentrations. Short communication. Scientia Horticulturae, 85: 137-144.
- 24. Kitzious, S., Drossopoulos, J. and Lymperopoulos, CH (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 55-62.

- Kumar, V., Gururaj, H.B. and Narasimha, B.C (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of (*Capscium annuum* L.) Scientia Horticulturae, 106: 237-246.
- Laux, T., Mayer, K., Jurgens, G., and Berger, J (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development, 122: 87-96.
- Lee, H.Y.; Kim, H.S; Kim, J.Y; Jung, M.; Park, Y.S.; Lee, J.S.; Choi, S.H.; Her, N.H.; Lee, J.H.; Hyung, N.I.; Lee, C.H.; Yang, S.G.; Harn, C.H (2004). A new selection method for pepper transformation: callusmediated shoot formation. Genetic Transformation and Hibridization. Plant Cell Rep, 23: 50-58.
- Li, D., Zhao, K., Xie, B., Zhang, B., Luo, K (2003). Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep, 21:785-788.
- Liu, W., Parrot, W.A, Hildebrand, D.F., Collins, G.B. and Williams, E.G (1990). Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum* annuum L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Rep, 9: 360-364.
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barrerdo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Peniche-Montalvo, M., Barahona-Pérez, F., Iglesias-Andreu, L., and Santana-Buzzy (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience, 41(7): 1645-650.
- Manoharan, M.; Sree, C.S., and Lakshmi, S (1998). Agrobacterium mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var *Pusa jwala*). Plant Science, 131: 77-83.
- Mayer, K.F., Schoof., H, Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., and Laux., T (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in Arabidopsis shoot meristem. Cell, 95: 805-815.
- 33. Mihalka, V., Balazs, E., Nagy, I (2003). Binary transformation systems based on "shooter" mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. A simple, efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. Plant Cell Rep, 21: 778-784.
- Mihalka, V; Fari, M.; Szasz, A.; Balazs, E.; Nagy, I (2000). Optimized protocols for efficient plant regeneration and gene transfer in pepper (*Capsicum annum* L.). J. Plant Biotechnology, 2 (3): 143-149.
- Naleway, J (1992) Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrates. In: Gallagher, S. GUS Protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc. California. pp:61-75.
- Nurizzo, D., Shewry, S., Perlin, M., Brown, S., Dholakin, J., Fuchs, R., Deva, T., Baker, E., and Smith, C (2003). The Crystal Structure of Aminoglycoside-3'-Phosphotransferase-IIa, an Enzyme Responsible for Antibiotic Resistance. Journal of Molecular Biology, 327(2), 21 March: 491-506.

- 37. Ochoa-Alejo, N. and Ramírez-Malagon, R (2001). Invited Review. *In vitro* chilli pepper biotechnology. *In vitro* Cell. Dev. Biol, 37:701-709.
- Ogawa Y., and Mii M (2007). Meropenem and moxolactam: Novel βlactam antibiotics for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Science, 172: 564-572.
- Ogawa Y., and Mii M (2005). Evaluation of 12 β-lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in planta antibacterial activities and phytotoxicities. Plant Cell Rep, Genetic transformation and hybridization, 23: 736-743.
- 40. Ogawa Y., and Mii M (2004). Screening for highly active β-lactam antibiotics agains *Agrobacterium tumefaciens*. Arch Microbiol. Short communication: 331-336.
- Polci, P., Conti, V.; Miranda, R. 21/06/05: IV Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal. www.argenbio.org/h/biblioteca/ libropre.php
- Rech, P., Grima-Pettenati, J. and Jauneau, A (2003). Fluorescence microscopy: a powerful technique to detect low GUS activity in vascular tissues. Technical advance. The Plant Journal, 33: 205-209.
- Romero-Pozueta, J., Houlne, G., Cañas, L., Schantz, R., Chamarro, J (2001). Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling plants explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 173-180.
- Rengifo, P (2003). El Cultivo del Ají (*Capsicum* spp.) En red. Consultado:09-01-06.
  http://www.asiawa.com.com/blatisio//2007.html

http://www.asiava.com.co/Noticia%20Principal%203.htm.

- Ruíz, E. y Trejo, J.A (2005). Plagas del cultivo de chile. En: Memorias del Seminario de Chile Habanero. Fundación Produce Yucatán, A.C., 61-78.
- Santana-Buzzy, N.; Canto-Flick, A.; Barahona-Pérez, F.; Montalvo-Peniche, M. C; Zapata-Castillo, P.; Solís-Ruíz, A.; Zaldívar-Collí, A.; Gutiérrez-Alonso, O.; and Miranda-Ham, L (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) via organogenesis. HortScience, 40 (6): 1829-1831.
- 47. Scutt, CH., Zubko, E. and Meyer, P (2002). Techniques for removal of markers genes from transgenic plants. Biochimie, 84: 1119-1126.
- Shin, R., Han, J-H., Lee, G.J., and Peak, K.H (2002a). The potential use of viral coat protein genes as transgene screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. Transgenic Reseach, 11: 215-219.
- Shin, R., Park, J., An, J.M. and Paek, K.H (2002b). Ectopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhanced host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. The American Phytopathological Society. MPMI, 15 (10): 983-989.

- Shivegowda, T, Mythili, J. B., Anand, L., Saipradad, G., Ramanjini Gowda, Gowda, T.K (2002). *In vitro* regeneration and transformation in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77 (5): 629-634.
- Sonntag, K., Wang, Y. and Walbraun, M (2004). A transformation method for obtaining marker-free plants based on phosphomannose isomerase. Acta Universitatis Latviensis. Biology, 676: 223-226.
- 52. Soria, F.M (1988). Nuevas técnicas hortícolas y de manejo de suelos para Yucatán. Ed. I.T.A. No. 2.
- 53. Sosa, F.R.C (1985). Principales plagas y enfermedades del chile habanero y su control. Tesina de Licenciatura. I.T.A. No.2, Conkal, Yuc.
- Steinitz, B., Kusek, M., Tabib, Y., Paran, I., and Zelcer, A (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerates obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 39: 296-303.
- 55. Torres, H. y Franco, C. (2005). Seminario de Chile Habanero. Memoria INIFAP.
- Trujillo, J (2005). Diversidad genética del chile habanero (*Capsicum chinense* J.) en Yucatán. En: Memorias del Seminario de Chile Habanero. Fundación Produce Yucatán, A.C., 13-20.
- 57. Tsong-Ann Y, Shyi-dong Y, and Jiu-Sherng Y (2001). Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. Acad. Sin, 42: 281-286.
- Tun Dzul, J. de la C (2001). Chile Habanero. Características y tecnología de producción. SAGARPA. INIFAP. Centro de Investigación Regional del Sureste. Mocochá, Yucatán, México.Fundación Yucatán Produce A. C. pp 73.
- Valera-Montero and Ochoa-Alejo, N (1992). A novel approach for chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. Plant Science, 84: 215-219.
- Venkataiah, P., Christopher, T., and Subhash, K (2001). Plant regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in four Capsicum species. Capsicum and Eggplant Newsletters, 20: 68-71.
- Yu-Xian X., Wen-Jun O-Y., Yi-Feng Z., and Zhang-Liang CH (1996). Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Rep, 16: 71-75.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., van Montagu, M., and Schell, J (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. The Embo Journal, 2(12): 2143-2150.
- Zapata-Castillo, P., Canto-Flick, A., López-Puc., G., Solís-Ruíz, A., Pérez-Barahona., F. Iglesias-Andreu, L. and Santana-Buzzy, N (2007). Somatic embryogenesis in Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions. Hort Science.

 Zhu, Y., Ou-Yang., W.J., Zhang, Y.F., and Chen, Z.L (1996). Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Rep, 16: 71-75.

-

-----

- 65. Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., and Chua, N.H (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 30(3): 349-359.
- 66. Plan rector del sistema producto chile. Prediagnóstico del sistema producto chile. http://amsda.com.mx/PREstatales/Estatales/YUCATAN /PREchile.pdf. Consultado:09-01-06.

# Capítulo 2

# The mechanism infection of Agrobacterium tumefaciens *

*Este capítulo esta en revisión para su publicación.

#### 2.1 ABSTRACT

Here we review the mechanism used by *Agrobacterium* to transfer T-DNA into the host cells. *Agrobacterium* has been used as a tool to generate GMO during the last few decades. However, the process in which the bacteria transforms host cells are not completely understood, here we provide an overview of the process.

**2.2 KEYWORDS:** Agrobacterium tumefaciens, genes vir, T-DNA, genetic transformation.

## 2.3 INTRODUCTION

Agrobacterium tumefaciens is a Gram negative bacterium that is capable of genetic transformation of plants, fungus and human cells.

The wild type *Agrobacterium* carries two types of genes for transformation: oncogenes and those in charge of opinoids biosynthesis that promote the sickness known as crown gall, which consist in a continuos growth due to the lack of control at the cell cycle of the cells.

The process of transformation by *Agrobacterium* requires the presence of several genetic elements: (1) The virulent genes from the chromosome of *Agrobacterium* (*chv*), (2) The T-DNA which is limited by the left and right borders (3) The virulen genes from the Ti (*vir*) plasmid that constitute the T-DNA transfer machinery and (4) Proteins coded by the cells to be infected.

# 2.4 REGULATORY SYSTEMS OF AGROBACTERIUM TO RECOGNISE SUSCEPTIBLE CELLS FOR INFECTION

Agrobacterium tumefaciens binds to the host cell were wounding has occurs. This process takes advantage of some of the receptors from the host cells and proteins like: ChvA, ChvB, PscA, Attl (Figure 2.1 A). With in the host cell receptors find the vitronectin protein, ricadhesin binding protein, cellulose synthase (CSLA9) and other proteins. These proteins interact with VirB2 protein of Agrobacterium (like BTI1, BTI2, BTI3 and a GTPasa associated to the membrane, RAB8) (Citovsky et al., 2007).

The process of infection of *A. tumefaciens* initiates with the activation of the virulent genes (*vir* genes) from the Ti plasmid with the help of molecular

signals obtained from the host cell. Which include phenolic substances (example Acetosiringon AS) sugars and changes in pH (Figure 2.1 A-B).

The signals are then sensed by VirA, VirG and ChvE proteins, the last of which bind to glucose or galactose and interact with VirA (Peng *et al.* 1998). The gene *chvE* works as a channel for specific sugars and starts the transduction signaling from the components VirA-VirG (Figure 2.1 C-D).



Figure 2.1. Regulatory system of Agrobacterium for the recognition of susceptible host cells. A : Proteins that are encoded by a set of bacterial chromosomal genes and for host receptors which are involved in Agrobacterium binding to the host cell surface. B: Signal molecules released from the wounded host cell (phenolic compound, monosaccharides and acidic pH) which are sensed by virA gene. C: Autophosphorylation of the VirA conserved histidine. D: activation of VirG and all of the vir genes through the phosphorylation of conserved aspartate.

The induction signals are detected by protein VirA the which contains a periplasmic domain at the N-terminus and three cytoplasmic domains which includes a linker ligand, a kinase and a phophoryl receptor (Chang and Winans,

1992). The periplasmic domain is required to sense sugars and the ligand domain is needed to detect phenolic and acidic compounds. The phosphoryl receptor of VirA plays an important role in the signal transduction for the infection process. The C-terminal portion of the protein is not required for the tumor formation while the periplasmic domain is essential (Chang and Winans, 1992). VirA is a transmembranal kinase that gets autophosphorylated affecting the function of VirG at position 52 (Figure 2.1 C) (Jin *et al.*, 1990-1-).

The C-terminal portion of VirG binds to DNA and interacts with the sequence known as *vir* box that contains 12 base pairs and is found in the promoter region of all *vir* genes (Figure 2.1 D)(Jin *et al.*, 1990-2-). While the N-terminal portion of VirG interacts with other transcription factors (Jin *et al.*, 1990-3-).

#### 2.5 PROCESSING THE T-DNA COMPLEX

The processing and transfer of T-DNA involves several steps. First, the recognition of the complex which is carried out from the 25 bp sequence found at the ends of the DNA-T in the Ti plasmid (Figure 2.2 A). Second, VirD2 (49.6 kDa) generates a cut in the 5' single stranded DNA as seen in figure 2.2 A-B. For this reaction to take place a covalent bond is formed between the phosphodiester of tyrosine 29 and the last base of the T-DNA the addition of VirD1 (16.1 kDa) as an accessory protein is also required for specific double stranded DNA cut (Figure 2.2 B) (Scheiffele et al. 1995). VirD1 and VirD2 remove the T chain after which VirD2 keeps bound to the DNA (Figure 2.2 C). VirD2 also has a nuclear localization signal or region  $\omega$  required for virulence (Mysore *et al.*, 1998).

VirE2 is the most abundant protein being produced alter the induction of the vir genes, from which 6 functions have been defined (Dumas *et al.*, 2001, Ward and Zambryski, 2001): 1) covers the T-DNA and protects it from degradation and easy transport (Figure 2.2 D) Associates VirE1 that is needed for the export of the complex. 3) VirE2 leaves *Agrobacterium* by a transport IV system either independent or as a complex with T-DNA. 4) VirE2 forms a pore in the plasmatic membrane of the host cell allowing the complex T-DNA inside. 5) VirD2 and VirE2 interact with chaperons inside the host cell (RocA, Roc4 and CypA). Other factors like (AtKAPa, VIP1) can also direct the complex into the nucleus. 6) VirE2 interacts with nuclear factors (VIP2) that mediate the role with the chromatin allowing integration of the T-DNA into the genomic DNA of the host. VirE2 has a second NLS (2) at the C-terminal portion the which is required for the interaction of the single stranded DNA (Domberk and Ream, 1997).

The protein VirE1 has the characteristics of a chaperone which forms a dimmer, and has been implicated in the efficient regulation for VirE2, maintains stability of VirE2 by preventing aggregates of this protein (Figure 2.2 D). However, VirE1 is not essential for the signal recognition for the transport of VirE2. VirE1 has been shown to prevent premature interaction of VirE2 with T-DNA in the bacterial cell (Vergunst *et al.*, 2003). However, VirE1 is not required

for the specific recognition of the substrate by VirE2 (Vergunst *et al.*, 2003). The C-terminal regions of proteins VirE2 and VirF code for a sequence of amino acids that is important for the secretion type IV. This regions form a common motive of Arg-Pro-Arg, which is a conserver domain recognized by the secretion system of VirB.



Figure 2.2. Processing of T complex. A : Ti plasmid with T-DNA flanked by the two repeats of 25 bp termed as left and right borders and virulence region. B: VirD2 and VirD1 introduces a nick at the border sequences surrounding the T-DNA and VirD1. C : VirD1 is released, whereas VirD2 remains covalently attached to the 5' end of the T strand. D : Formation of T complex VirD2-VirE2-VirE1. LB: left border, RB : right border.

## 2.6 AGROBACTERIUM PROTEINS INVOLVED IN THE TRANSPORT OF THE T- DNA COMPLEX

A. tumefaciens utilizes a secretion type IV system (T4SS) to transfer the T-DNA and virulent proteins to the host cell. The T4SS is formed from a conserver system of the bacterial conjugation system (Christie *et al.*, 2005). The 11 genes of the *virB* operon of *A. tumefaciens* (*virB1-virB11*) with the *virD4* genes are all the necessary components for the T4SS secretion system. T4SS forms a structural channel made by VirB7-10 (Figure 2.3) and an exterior T-pilus made by VirB2 and VirB5 (Figure 2.3 C).

#### 2.6.1 Component of transport channel

The VirB4 protein interacts with itself and 4 other components T4SS, VirB1, VirB8, VirB10 and VirB11 (Figure 2.3 A). In the context of the channel T4SS interactions facilitate the function of VirB4 to form the entrance of the channel and facilitate the strength needed during the secretion process. VirB4 couples itself to the entrance of the channel with VirD4 and VirB11 to transport the substrates like T-DNA into the channel (Figure 2.3) (Middleton *et al.*, 2005).

VirD4 is a protein that acts as a coupling factor with VirD2 for the T-DNA translocation to the host cells (Middleton *et al.*, 2005). VirD4 belongs to the family of translocases that mediate the exchange of intermediary DNA conjugated to the internal membrane (Jakubowski *et al.*, 2003).

The proteins VirB6, VirB7 and VirB9 are involved in the channel configuration from the bacterial membrane (Hwang and Gelvin, 2004) (Figure 2.3 B).

## 2.6.2 T Pilus

The T-pilus is a flexible filament that is essential for the virulence of *Agrobacterium* (Figure 2.3 C). The 11 *virB* genes are essential for the synthesis of T-pilus and the principal transport for its assembly. The *virD* are not required for the biogenesis of T-pilus (Lai *et al.*, 2000).

The following are possible functions of T-pilus: 1) To export different components needed for the virulence including proteins VirE2, VirE3, VirF and the single stranded T-DNA that is directed by VirD2; 2) To act as a physical bridge between the bacteria and the host cell; 3) To act as a sensor to potentiate the union of the signaling molecules of the host cell. The plant cells may have a receptor for the T-pilus or a pore that is used to transfer the T-DNA through the cell wall and membrane (Hwang and Gelvin, 2004).

The protein VirB2 is the principal component of the T-pilus (Figure 2.3 C) (Lai *et al.*, 2000) that has 74 amino acid residues united between the amino and carboxyl terminus to generated a cyclic peptide. The subunit of the T-pilus is transported trough the membrane of the bacterium to form the flexible filament of T-pilus with 10 nm of diameter that extends out of the bacterial cell wall (Lai *et al.*, 2000).

Furthermore, VirB2 interacts with three plant proteins like BTI1, BTI-2 and BTI-3, from which no current function has been assign, however, Rab8 a GTPase which is associated to the membrane appears to be involved. These proteins associated to the membrane and modulate the vesicular traffic between compartments of endocytosis and biosynthesis (Figure 2.3). The proteins BTI and Rab8 are involved in the initial interaction with *Agrobacterium* to the host (Hwang and Gelvin, 2004).

Other proteins that conform the T pilus are the proteins VirB1, VirB2, VirB4 and VirB5 that have ATPase activity and that couple they energy production for the transport of the T-DNA complex (Hwang and Gelvin, 2004) (Figure 2.3). VirB2 and VirB5 probably interact with the receptors of the host cells and VirB1 establishes the contact with the cell wall acting as a lytic transglicolicase to break the wall during the assembly of the transporter (Middleton *et al.*, 2005)(Figure 2.3).



Figure 2.3. Proteins of Agrobacterium involved in the transport of T-DNA complex through the type IV secretion system. A: Entrance of transport channel, conformed by VirB1, VirB4, VirB8, VirB10, VirB11 and VirD4. B: Transport channel integrated by the VirB6, VirB7 and VirB9 proteins. C: Formation of T pilus, whose main component is VirB2, and the VirB1, VirB5 and VirB7 proteins, which interact with host receptors. C: cytoplasm, OM: bacterial outer membrane, PP: bacterial periplasm, IM: bacterial inner membrane.

## 2.7 TRANSPORT OF THE COMPLEX TO THE HOST NUCLEUS

The import of the T-DNA to the nucleus is the central event for genetic transformation by *Agrobacterium* from the host cells. The complex T-DNA VirD2-VirE2 (T complex) is transported by a mechanism of an "active motor" from the cytoplasm to the nucleus of the host cell and through macro molecular Brownian diffusion (Tzfira and Citovsky, 2006).

#### 2.7.1 VirD2

Agrobacterium recluses and uses one or more cyclophylin (CyPs) from the plant during the pathogenesis. VirD2 domain interacts with cyclophylin for pathogenesis and is different from the endonuclease omega and NLS domains (Deng *et al.*, 1998). VirD2 interacts with a group of cyclophilins that include Roc1, Roc2, Roc3, Roc4 and Roc5/CypA (Bakó *et al.*, 2003) (Figure 2.4 A). Roc1-5 act as chaperons to maintain the conformation of VirD2 during its transport through the cytoplasm and inside the nucleus of the host cell (Deng *et al.*, 1998). CyPs has a PPlase activity that may help VirD2 by bending it into different conformations inside the host cell.

CyPs constitute a large class of conserved proteins from bacteria to plants and animals. They exist in multiple isoforms that are localizing in different compartments of the cell. The ubiquitous nature of the CyPs is and advantage used by *Agrobacterium* to transfer its T-DNA to a vast range of host species (Deng *et al.*, 1998).

VirD2 is involved in the majority of the functions needed for the transport of the T-DNA in to the host cell. The NLS has an interaction with kariopherins (Figure 2.4). Furthermore a receptor for VirD2 has been found in *Arabidopsis thaliana* (AtKAP $\alpha$ ), that has a homology sequence to yeast SRP1 as well as a large range of alpha-Karipherins (Ballas and Citovsky, 1997). The protein VirD2 binds to different cyclophylins upstream the NLS (Bakó *et al.*, 2003) (Figure 2.4 A).

The alpha-kariopherin acts as a subunit of the complex that binds the NLS to be transported to the nucleus of the cell and to associate with a second subunit betha-karioperin which is involve in the coupling to the nuclear pore (Seedorf and Silve, 1997).

### 2.7.2 VirE2

VirE2 packaging the T complex so it can be transfer trough the cell and participates in the transferring of the information to the nucleus of the host cell (Citovsky *et al.*, 2007). The packing is needed since the diameter of the T complex is normally 15 nm which exceeds the nuclear pore diameter of 9 nm.

The import of nuclear VirE2 is facilitated by VIP1 that functions as an adaptor between VirE2 and Kariopherin alpha (Loyter *et al.*, 2005) (Figure 2.4 A). VIP1 is a nuclear protein that contains a bZIP domain followed by a leucin zipper typical of many transcription factors (Tzfira *et al.*, 2001).

Moreover a dynein from *Arabidopsis* (DLC3) is a motor protein that interacts with VIP1 and allows recognition of VirE2 to the nuclear pore forming the complex VIP1/VirE2/T-DNA (Citovsky *et al.*, 2007). However, VIP1 is a limiting factor due to its low abundance, although several species of plants show homology to VIP1 it is not certain that they will carry out the same function (Tzfira *et al.*, 2001).

#### 2.7.3 VirE3

VirE3 is similar to VIP1 in its capacity to import complexes to the nucleus, as well as its ability to form a union with VirE2, suggesting a similar role as VIP1 during the infection of *Agrobacterium*, acting as an adaptor between VirE2 and alpha kariopherin (Lacroix *et al.*, 2005) (Figure 2.4).

Besides entering the nucleus the T chain has to be directed for its integration into the chromatin of the host cell. The events that mediate the transport into the chromatin are unknown at this point. It is possible that nuclear actin and nuclear myosin interact with the complex to direct the T-DNA to the chromatin. Nevertheless several factors have been involved like CAK2M which is a protein that binds TBP and VirD2 (Citovsky *et al.*, 2007).

Since VIP1 interacts with VirE2 which is associated to the T complex forming an adaptor to the nucleoseome in particular with histone 2 (Figure 2.4 B) (Loyter *et al.*, 2005). VIP1 probably interacts with the chromatin of the host cell during transcription where the DNA is more expose for integration (Tzfira *et al.*, 2001). However, statistical analysis of integration shows a nonselective pattern for the integration between euchromatin and heterochromatin integrations (Loyter *et al.*, 2005). VIP1 forms homomultimers in the host cells this is required for the interaction with H2A and to facilitate the tumor induction by *Agrobacterium* (Li *et al.*, 2005-1-).

## 2.8 DEGRADATION OF THE PROTEINS FROM THE T COMPLEX

The T-DNA must free it self from the transport proteins, which is carried out using the photolytic machinery of the host cell (Figure 2.4 C); VirF is the first to participate in the process (Figure 2.4 B) (Citovsky *et al.*, 2007). VirF has an F-box domain that interacts with different members of the ASK (ASK1, ASK2 and ASK10) from *Arabidopsis*, which has a yeast homologous Skp1 (Schrammerijer *et al.*, 2001). Skp1 functions as a subunit for ubiquitinase ligase E3 forming a complex SCF (Skp1/cullin/F-box) (Figure 2.4 C). The complex SCF recruits specific proteins for proteolysis via ubiquitin degradation pathway (Tzfira and Citovsky, 2002), where VirE2 represents the target of this route (Tzfira *et al.*, 2004).

VirF employs VIP1 as a specific substrate that is bound to VirE2 (Tzfira and Citovsky, 2002), provoking the degradation of the T complex proteins (Figure 2.4 C). SCF represents the system to free the T-DNA before its integration to the host genome (Figure 2.4 D) (Tzfira *et al.*, 2004).



Figure 2.4. Import of the T complex from the host cytoplasm to the host cell nucleus. A : The *Agrobacterium* VirE2, VirE3 and VirD2 proteins as well as the cyclophilins, karyopherin α, VIP1 and VIP2 host proteins are involved in the transport of T-DNA. B: VIP or VirE3 associates with the T-complex acting as a molecular link with H2A histone in

the host chromatin. C : Formation of SCF-VirF (Skp1-Cullin-F-box protein/VirF) complex. D : Degradation of proteins of T-complex by proteolysis machinery of the host cell through SCF-VirF complex. E: T-strand released from proteins that facilitated their transport.

The C-terminal portion of VIP2 has a conserved sequence to NOT2/NOT3/NOT5 proteins. NOT proteins are an integral component of the transcriptional complex CCR4 that can participate in a positive or negative way to gene expressing in yeast. Up to date NOT genes from plans have no been studied (Anand *et al.*, 2007-1-). Nevertheless, the similarity of the yeast NOT proteins suggest that VIP2 is may function as a transcriptional regulator, that may help the integration process acting together with VIP1 and VirE2 (Anand *et al.*, 2007-1-).

## 2.9 INTEGRATION OF THE T CHAIN IN TO THE HOST DNA

Two possible mechanisms can explain the T-DNA integration process into the host cell. This can be either by homologous recombination (HR) shown in Figure 5A or by non-homologous recombination (NHR) seen Figure 2.5 C (Citovsky *et al.*, 2007).

The HR requires that the T-DNA bee in single stranded form and it involve the repair machinery from a gap found in the DNA (Figure 2.5 A)(Lacroix *et al.*, 2006). In the case of the NHR the T-DNA is a double stranded DNA molecule and its integration involves enzymes like Ku70/Ku80 that bind the ends of DNA and allow insertion into the genomic DNA (Figure 2.5) (Lacroix *et al.*, 2006, Gallego *et al.*, 2003).



Figure 2.5. Possible mechanism of the T-DNA integration process into host DNA.: A: Homologous recombination (HR) that requires as a substrate T-DNA single-stranded. B: Mechanism of single-stranded gap repair cadena sencilla (SSGR) and integration of T-DNA into host genome. C: Illegitimate or non-homologous recombination (NHR). D: Generally requires double-stranded T-DNA as a substrate. E: DSB repair by the non-homologous end-joining (NHEJ) enzymes. F: Integration T-DNA into host genome.

## 2.10 DISCUSSION

The infection process of *A. tumefaciens* requires the proper expression of the virulent genes which are dependent on the molecular signals being sent from the wounded tissue of the plant. The phenolic and acidic compounds relaxed from the plant are essential for this, while sugars can only increase the sensibility for the induction and are not essential for the infection to take place (Wise *et al.*, 2005). This effect is due to the increment in the protein ChvE, as a result from its expression by GbpR (a member of the LysR regulatory protein) and the induction of sugars (Peng *et al.*, 1998). The signal transduction for the activation of the *vir* genes is mediated by a two component VirA/VirG, with ChvE, that is a union protein for galactose-glucose that interact with VirA (Peng *et al.*, 1998).

Furthermore salicilic acid (SA) inhibits the expression of VirA/VirG that controls the expression of the operon repABC controlling *vir* gene expression. SA inhibits the functional domain of the kinase of VirA. Plants that are deficient in SA are more susceptible to the infection by *Agrobacterium*, while plants that over express SA are unlikely to form tumors from this bacterium (Yuan *et al.*, 2007, Annand *et al.*, 2008).

A. tumefaciens causes the sickness known as crown gall in plants due to the transference of the complex of nucleoproteins together with proteins from the secretion system IV (T4SS) code by *virB/D4* inside the host cell. In a study carryout by Cao and Saier (2001), show that the proteins VirB are of many sizes ranging from VirB7 55 aa to VirB4 of 800 aa. VirB4 is one of the largest conserved proteins of the system and its function involves the structural mechanism for transport of the substrate. Draper (2006), proposes a model for the interaction of VirB4 with VirB11, VirD4, VirB8 and Vir10. Where the C-terminal domain of the hexamer VirB4 resides in the periplasm and interacts with the hexamer of VirB11 located in the internal membrane and periplasm with VirB8 and VirB10. Furthermore, it is proposed that the N-terminal portion of the VirB4 protein interacts with VirD4 and VirB10 in the cytoplasm and interacts at the same time with VirB11.

With the aid of immune fluorescence, as well as, electronic microscopy, the shape of the transport channel has been identified (Kumar *et al.*, 2000). The first three components of the channel are VirB8, VirB9 and VirB10 which are localized in the internal membrane and periplasm and VirB10 is localized in the external membrane as shown in Figure 2.3 B. The subcelular localization of VirB9 and VirB10 changes when other VirB proteins are present. VirB8 is a polypeptide of 237 a. a. and is an integral protein of the membrane with a short cytoplasm N-terminal domain. VirB8 is fundamental for the establishing of the complex with VirB9 and VirB10 as well as with it self (Kumar and Das, 2001).

The protein VirB6 is a hydrophobic subunit of the T4SS that crosses the internal membrane Jakubowski *et al.* (2003), evaluated the contribution of VirB6 with the activity of VirB8 which are require for further formation of the complex VirB7 and VirB9 to generate the T pilus and of secretion channel. VirB6 interacts with the lipoprotein VirB7 and the multimer of VirB9 from the external membrane.

Sangulenko *et al.* (2001) demonstrated that VirB11 is regulated in ATP dependent manner during the establishment of the T-pilus, as well as its role for substrate selection and transport inside the cell. VirB11 is a hexameric protein that acts as a chaperon to catalyze the monomer removal from the pilus from the cytoplasm membrane. The chaperon-pilus interaction is dynamic and requires hydrolysis of ATP and control of the monomer polymerization of the pilus.

Yuan et al. (Yuan et al., 2005) proposed to refine the model for T-pilus

assembly where VirB4 is in the internal part of the cytoplasm membrane and its N-terminal domain is exposed to the periplasm. Binding it self to VirB8, which binds to VirB5 and VirB6. It has been shown that the role of VirB4 in the assembly of the pilus is via an interaction of a complex VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 (Yuan *et al.*, 2005). The structure of the surface can initiate the contact with the host cell, however it is not clear the mechanism of transport via VirB/T4SS (Baron *et al.*, 2002). However, Pantoja *et al.* (2002) proposed a model with two steps for the secretion type IV in which the substrates (VirD2, T-DNA, VirF and VirE2) are secreted to the periplasm and form a complex with protein VirJ-VirD4 which is then secreted through the membrane via proteins VirB.

VirB6 and VirB8 can join them selves to the center of proteins T4SS to assemble the complex VirB2, VirB5, VirB7 and VirB3. VirB3 which may form part of the assemble subcomplex of the pilus (Cao and Saier, 2001, Yuan *et al.*, 2005). However, the localization of VirB5 to the T-pilus has no been reported (Cao and Saier, 2001). *Agrobacterium* can use a T pilus to mediate the transfer of T-DNA and Vir proteins from the bacterium to the host cell. The molecular mechanism for the transport is not well understood. Hwang and Gelvin (2004) identified several proteins in the plants BT11, BTI2, BTI3 and AtRAB8 that participate in the initial transfer process of T-DNA. The characterization of this proteins provided information like how the T-DNA transfer into the plant is and how the T pilus makes contact with the surface of the plant.

VirB1 is one of the least studied proteins from the *virB* operon, some reports suggest that it is not required for the DNA transfer, however it has a function for the biogenesis of VirB/T4SS and the N-domain carry a transglycosilaes lyses function. Which provokes a lyses of the peptidoglucan cell wall allowing the insertion of the T4SS into the wall (Zupan *et al.*, 2007).

VirB2 is an essential component for the channel VirB. However the T pilus may no be required for the transfer to the T-DNA and may not be essential to establish the binding between *Agrobacterium* and the host cell (Lai *et al.*, 2002).

According to the revision by Christie (2001) speculates that the chaperons VirC1 and VirC2 are required for the T-DNA transfer and the transport of VirE2. VirE1 is also needed for the transport of VirE2 but not for the T-DNA. VirC1 associated with the cytoplasm membrane and known as an overdrive which locates it self on the right border of the T-DNA.

It has been identified a cytoplasm binding protein to VirD2 (VBP) is involved in the recruitment of the T complex that is needed to energize the components of the T4SS including the VirD4, VirB4 and VirB11. Furthermore VBP is important for the recruitment of an additional plasmid for an independent VirB/D4 pathway. The VBP protein contains a nucleotidiltransferase motif (NT) which is conserved in eukaryotes but it is not required for the recruitment pathway this function may be assign to the HEPN domain found in the Nterminus which is required for nucleotide binding (Guo *et al.*, 2007).

To determine the transport signal from the T4SS of *A. tumefaciens*, Vergunst *et al* (Vergunst *et al.*, 2005) made some alignments and mutations of VirF. From this work it can be concluded that the transport signal for the recruitment of effectors proteins VirB/VirD4 is hydrophilic with a positive consensus motif R-X(7)-R-X-R-X-R-X-X(n)>. Suggesting that VirF probably interacts with a completenergy charge domain of VirD4.

VirD2 is phosphorylated *in vivo* and *in vitro* by the activation of nuclear cycling kinases (CAK2Ms) in *M. sativa* with a close homolog *in A. thalina* CAK2At and in *Oriza* R2Os. CAK2Ms participates in the DNA repair and recruits in vivo TBP through its phosphorylations of the C-terminal domain of the large RNA pol II (Bakó *et al.*, 2003).

A phosphatase 2C (DIG3) has been found to interact with VirD2. DIG3 has a role in the transport of the complex VirD2/T-DNA through the specific interaction of the C-terminal portion for the VirD2. Phosphorylation and dephosphorylation of the N-terminal portion of VirD2 can also have an important role in the tumor formation and to improve the transport of the VirD2/T-DNA (Tao *et al.*, 2004).

Ziemiennowicz et al. (2001) evaluated in vitro the mechanism of nuclear import of the T-DNA to the plant, he and his co-workers demonstrated that VirD2 can transport oligonucleotides of 25-mer to the nucleus of the plant and it is dependent on the NLS C-terminal portion. However, the large single stranded DNA (250-1000 nt) requires also the addition of VirE2. VirE2 is required for the movement of the DNA complex inside the cell of plant, through the nuclear pore and for genome incorporation. The NLS C-terminal of VirD2 is recognizing by the importin  $\alpha$ , and then the T-DNA complex couples it self to NPC via importin  $\beta$ , the 5'end of the T-DNA is then directed to the nuclear pore where the transport is initiated. VirE2 creates the proper structure for the translocation into the nuclear pore. In Arabidopsis thaliana VirE2 interacts with the protein 1 (AtVIP1), Which is associated to the T-complex by the component VirE2 as a binding protein to the complex and the histone 2 from the chromatin of the host cell. The target for this binding is the chromatin for later integration into the genome. This is the model by Loyter et al. (2005) checked that AtVIP1 interacts with plant histone in vitro and in vivo.

According to Lacroix *et al.* (2005), in the plant cytoplasm the protein VirE3 interacts with the kariferins- $\alpha$  through its NLS sequence found in the N-terminal portion. In this work it was demonstrated that *in vitro* VirE3 recognizes the T-Complex. Moreover, Vergunst *et al.* (2003) results showed that the chaperone VirE1 is note essential for the transport.

Two current models have been proposse to explain T-DNA integration, utilizing either the double stranded DNA repair machinery (DSB) or the gap single stranded reparation. Tzfira *et al.* (2003), utilize an *in vivo* genetic system for DSB suggesting it as the main mechanism for T-DNA integration. In a total of 620 transgenic lines 16 contain T-DNA in the induced DSB and the T chain was observed as a double stranded DNA before specific integration into the DSB of the host genome.

The comparison between the response of different cell lines *A. tumefaciens* indicate that the T-DNA and the Vir proteins module the gene

expression of the host cell during the genetic transformation. The expression profile indicate that the infection by *Agrobacterium* induces genes from the plant necessary for the transformation and at the same time represses defense genes of the host cell (Veena *et al.*, 2003).

Several genes in plant have been characterized with the virus-induced gene silencing (VIGS), and it has been speculated that they are involved in the transformation process *A. tumefaciens* (Anand et al. 2007). In *N. benthamiana* it has been shown that histone H3 (H3), NPL and histone H2A (H2A) block later stages of transformation and  $\alpha$ -Expansins ( $\alpha$ -Exp) are involved in earlier stages of transformation but do not participate in the binding of the bacteria to the host cell surface (Anand *et al.*, 2007).

Mutant studies identified DNA repair proteins Ku70, Ku80 and Rad52 being involved in the integration of T-DNA (Gallego *et al.*, 2003, Citovsky *et al.*, 2007, Tzfira and Citovsky, 2006). Using yeast as a host for the T-DNA several proteins where identified for non homologous terminal region (NHEJ) like Yku70, Rad50, Mre11, Xrs2, Lig4 and Sir4, that are required for the integration of T-DNA inside the host genome (Van Attikum *et al.*, 2001). Furthermore, another integration pathway was seen in the telomeric regions where Yku70 can be involved. Those events are associated to the formation of chromosomal arrangement.

In yeast the integration of T-DNA occurs preferably by homologous recombination (HR) and requires proteins Rad51 and Rad52, but not of Rad50, Mre11, Xrs2, Yku70 and Lig4 (Van Attikum *et al.*, 2003). Rad52 and Yku70 besides being involved in recombination the are also regulators for the T-DNA integration by HR. Mutants of Rad52 have shown that the primary integration of T-DNA is by NHR in contrast with mutants of Yku70 that block NHR integration (Van Attikum *et al.*, 2003).

Ku80 is involved in the repair of double stranded DNA (DSBs). Moreover, Li *et al.* (2005) showed evidence of the Ku80 involved in the NHEJ T-DNA integration. However, the homologous genes for (YKU70, RAD50, MRE11, XRS2, LIG4 and SIR4) are yet to be defining their involvement in plant systems (Van Attikum *et al.*, 2001).

AtLIG4 is a single copy gene in the genome of *Arabidopsis* that codes for an ATP ligase dependent that acts strongly with the protein AtXRCC4 via BRCT domain in the C-terminal portion of the protein AtLIG4. It has been shown that AtLIG4 participates in the double stranded DNA repair (DSBs) by NHEJ in *A.thaliana*, similar to yeast and mammalian cell lines (Van Atikum *et al.*, 2003). In contrast with the yeast system in plants DNA ligase IV is no essential for T-DNA integration (Van Atikum *et al.*, 2003). Besides the ligase complex IV±XRCC4, this stage involves a complex with a protein kinase constituted by a heterodimer KU70/KU80/DNA dependent kinase/RAD50/MRE11/NBS1 (Van Attikum and Hooykaas, 2003). Brunaud *et al.* (2002), also showed that a micro homology was require for the integration of the single stranded chain, in particular T-DNA favors regions rich in A-T. The DNA of the plant rich in AT allows recombination with the left border of the T-DNA while the right border of the T-DNA involves at least one guanidine to bind.

## 2.11 CONCLUSIONS

Today biotechnology has improved much during the last few decades. This is due to the use of *Agrobacterium* as a tool for genetic engineering in plants (Citovsky *et al.*, 2007).

The recombination T-DNA from Agrobacterium tumefaciens, with genes of interest replace those of the bacterium provided the must common way of genetic transformation in plants. Furthermore several cell lines of Agrobacterium (C58, LBA4404, EHA's, etc) have been introduced which different in survival and transformation efficiency, after several decades different protocols for transformation continue to be develop for must of the plants, fungi and even human cell lines. The recent characterization of the components of the T4SS like VirB4, VirB11 and VirD4 and the T pilus structure VirB2 have provided an inside in to the mechanism, although there still more to know about the identity of some of the proteins that make the channel (Hwang and Gelvin, 2004). However, further research must be carried out to understand and control the mechanism of T-DNA integration into the host genome. Although there are several proteins that may be involved which mechanisms are still not yet clearly demonstrated and further understanding on the role of histone H2A during integration will be of great interest (Loyter et al., 2005). Further use of specific recombination proteins may also allow sequence specific integration into the host genome, reducing the variability of integration and providing a better tool for molecular genetics.

## 2.12 ACKNOWLEDGMENTS

We like to thank Secretaria de Relaciones Exteriores from Mexico and CONACYT grant.

# 2.13 REFERENCES

- Anand, A., Uppalapati, R.S., Ryu, C.M, *et al.* (2008) Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol, 146: 704-715.
- Anand, A., Krichevsky, A., Schornack, S., et al. (2007-1-) Arabidopsis VIRE2 interacting protein2 is Required for Agrobacterium T-DNA Integration in Plants. The Plant Cell, 19: 1695–1708.
- 3. Anand, A., Vaghchhipawala, Z., Ryu, C-M, Kang, L., et al. (2007-2-) Identification and characterization of plant genes involded in Agrobacterium-mediated plant transformation by virus-induced gene

silencing. MPMI, 20 (1) : 41-52.

- Bakó, L., Umeda, M., Tiburcio, A., Schell, J., Koncz, C (2003) The VirD2 pilot protein *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. PNAS, 100: (17) 10108-10113.
- Ballas, N., Citovsky, V (1997). Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. (94) : 10723–10728.
- Baron, C., O'Callaghan, O., Lanka, E (2002). Bacterial secrets of secretion: EuroConference on the biology of type IV secretion processes. Molecular Microbiology, 43(5): 1359–1365.
- Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., et al. (2002) T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of preinsertion sites. Embo Reports, 3(12): 1152-1157.
- Cao, T.B, Saier, M.H (2001) Conjugal type IV macromolecular transfer systems of Gram-negative bacteria: organismal distribution, structural constraints and evolutionary conclusions. Review article. Microbiology, 147: 3201–3214.
- 9. Chang, C.H, Winans, S (1992) Functional roles assigned to the periplasmic, linker and rceiver domains of *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein. Journal of Bacteriology, 174 (21) : 7033-7039.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski S., Cascales, E (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV Secretion Systems. Annual Review of Microbiology, 59 : 451-485.
- Christie, P.J (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. Microreview. Molecular Microbiology, 40 (2): 294-305.
- Citovsky, V., Kozlovsky, S.V., Lacroix, B., et al. (2007) Biological systems of host cell involved in Agrobacterium infection. Cellular Microbiology, 9 (1): 9-20.
- Deng, W., Chen, I., Wood, D.W., Mecalfe, T., Liang, X., Gordon, M.P (1998) Agrobacterium VirD2 proteins interacts with plant host cyclophilins. Proc. Natl Acad Sci, 95 : 7040-7045.
- Domberk, P., Ream, W (1997). Functional Domains of Agrobacterium tumefaciens Single- Stranded DNA-Binding Protein VirE2. Journal of Bacteriology, 179 (4): 1165-1173.
- Draper, O., Middleton, R., Doucleff, M., Zambryski, P (2006) Topology of the VirB4 C Terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 Type IV Secretion System. The Journal of Biological Chemistry, 281 (49): 37628–37635.
- Dumas, F., Duckely, M., Pelczar, P., van Gelder, P., Hohn, B (2001) An Agrobacterium VirE2 channel for transferred-DNA transport into plant cells. PNAS, 98 (2): 485–490.
- 17. Gallego, M.E., Bleuyard, J.Y, Daudal-Cotterell, S., Jallut, N., White, I

(2003) Ku80 plays a rol in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 35 : 557-565.

- Guo, M., Jin, S., Sun, D., H C.L, Pan, S.Q (2007). Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus. PNAS, 104 (50) : 20019–20024.
- Hwang, H., Gelvin, S (2004). Plant proteins that interact with VirB2, the Agrobacterium tumefaciens pilin protein, mediate plant transformation. The Plan Cell, 16 (31): 3148-3167.
- Jakubowski, S.J., Krishnamoorthy, V., Christie, P.J (2003). *Agrobacterium tumefaciens* VirB6 protein participates in formation of VirB7 and VirB9 complexes required for type IV secretion. Journal of Bacteriology, 185 (9): 2867-2878.
- Jin, S., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G, Gordon, M.P, Nester, E.W (1990-1-). The VirA Protein of Agrobacterium tumefaciens Is Autophosphorylated and Is Essential for vir Gene Regulation. Journal of Bacteriology, 172 (2): 525-530.
- 22. Jin, S., Roitsch, T., Christie, P.J., Nester, E.W (1990-2-). The Regulatory VirG Protein Specifically Binds to a cis-Acting Regulatory Sequence Involved in Transcriptional Activation of Agrobacterium tumefaciens Virulence Genes. Journal of Bacteriology, 172 (2): 531-537.
- Jin, S., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G, Nester, E.W (1990-3). Phosphorylation of the VirG Protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the Autophosphorylated VirA Protein: Essential Role in Biological Activity of VirG. Journal of Bacteriology, 172 (9): 4945-4950.
- Kumar, R., Das, A (2001). Functional Analysis of the Agrobacterium tumefaciens T-DNA Transport Pore Protein VirB8. Journal of Bacteriology, 183 (12): 3636–3641.
- Kumar, R., Xie, Y-H., Das, A (2000). Subcellular localization of the Agrobacterium tumefaciens T-DNA transport pore proteins: VirB8 is essential for the assembly of the transport pore. Molecular Microbiology, 36 (3): 608-617.
- Lacroix, B., Li, J., Tzfira, T., Citovsky, V (2006). Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell. Review/Synthese. Can. J. Physiol. Pharmacol, 84 : 333-335.
- Lacroix, B., Vahadilla, M., Tzfira, T., Citovsky, V (2005). The VirE protein of Agrobacterium mimics a host cell function required for plant genetic transformation. The Embo Journal, 24: 428-437.
- Lai, E.M., Eisenbrand, R., Kalkum, M., Lanka, E., Kado, C (2002). Biogenesis of T Pili in *Agrobacterium tumefaciens* Requires Precise VirB2 Propilin Cleavage and Cyclization. Journal of Bacteriology, 184 (1): 327-330.
- 29. Li, J., Krichevsky, A., Vaidya, M., Tzfira, T., Citovsky, V. (2005-1-) Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient

and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*. PNAS, 102 (16): 5733–5738.

- Li, J., Vaidya, M., White, CH., Vainstein, A., Citovsky, V., Tzfira, T (2005-2-) Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells. PNAS, 102 (52): 19231–19236.
- Loyter, A., Rosenbluh, J., Zakai, N., *et al.* (2005). The plant VirE2 interacting Protein 1. A molecular link between the *Agrobacterium* Tcomplex and the host cell chromatin?. Scientific Correspondence. Plant Physiology, 138 : 1318-1321.
- Middleton, R., Sjolander, K., Krishnamurthy, N., Foley, J., Zambryski, P (2005). Predicted hexameric structure of *Agrobacterium tumefaciens* VirB4 C terminus suggest VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. PNAS, 102 (5): 1685-1690.
- Mysore, K., Bassuner, B., Deg, X. B., et al. (1998). Role of the Agrobacterium tumefaciens VirD2 Protein in T-DNA Transfer and Integration. Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI, 11 (7): 668– 683.
- Pantoja, M., Chen, L., Chen, Y., Nester, E (2002). Agrobacterium type IV secretion is a two-step process in which export substrates associate with the virulence protein VirJ in the periplasm. Molecular Microbiology, 45 (5): 1325–1335.
- 35. Peng, W. T., Lee, Y.W, Nester, E (1998). The phenolic recognition profiles of *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by high level of sugar binding protein ChvE. Journal of Bacteriology, 180 (21): 5632-5638.
- Sagulenko, E., Sagulenko, V., Chen, J., Christie, P.J (2001). Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-Pilus Assembly and Substrate Selection. Journal of Bacteriology, 183 (20): 5813–5825.
- Scheiffele, P., Pansegrau, W., Lanka, E (1995). Initition of Agrobacterium tumefaciens T-DNA processing. Purified proteins VirD1 and VirD2 catalyze site and strand specific cleavage of superhelical Tborde DNA *in vitro*. The Journal of Biological Chemistry, 270 (3): 1269-1276.
- Schrammerijer, B., Risseeuw, E., Pansegrau, W., Regensburg-Tuink, T., Crosby W.L., Hooykaas, P.J (2001). Interaction of virulence protein VirF of *Agrobacterium tumefaciens* with plant homologs of the Skp1 protein. Curr Biol, 11: 258-262.
- Seedorf, M., Silver, P (1997). Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8590–8595.
- 40. Tao, Y., Rao, P.R., Bhattacharjee, S., Gelvin, S.B (2004). Expression of plant protein phosphatase 2C interferes with nuclear import of the *Agrobactenium* T-complex protein VirD2. PNAS, 101 (14): 5164–5169.

- Tzfira, T., Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 17: 147-154.
- Tzifira, T., Vaydya, M., Citovsky, V (2004). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by *Agrobacterium*. Nature, 431:87-92.
- Tzfira, T., Frankmen, L., Vaidya, M., Citovsky, V (2003). Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA via double-stranded intermediates. Plant Physiol, 133 : 1011-1023.
- 44. Tzfira, T., Citovsky, V (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. TRENDS in Cell Biology, 12 (3) : 121-128.
- Tzfira, T., Vaidya, M., Citovsky, V (2001). VIP1, an Arabidopsis protein that interacts with Agrobacterium VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and Agrobacterium infectivity. The Embo Journal, 20 (13) : 3596-3607.
- Van Attikum, H., Bundock, P., Overmeer, R., Lee, L., Gelvin, S.B., Hooykaas, P.J (2003). The *Arabidopsis* AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of *Agrobacterium* T-DNA. Nucleic Acids Research, 31(14): 4247-4255.
- 47. Van Attikum, H., Hooykaas, P.J (2003). Genetic requirements for the targeted integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Research, 31(3): 826-832.
- Van Attikum H., Bundock, P., Hooykaas, P.J (2001). Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. The Embo Journal, 20 (22) : 6550-6558.
- 49. Veena, Jiang H., Doerge, R.W., Gelvin, S (2003). Transfer of T-DNA and Vir proteins to plants cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes envolved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. The Plant Journal, 35 : 219-236.
- Vergunst, A.C, Van Lier C.M., Dulk-Ras, A., Grosse Stuve, T.A., Ouwehand, A., Hooykaas, P.J (2005). Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4 translocated proteins of *Agrobacterium*. PNAS, 102 (3): 832-837.
- Vergunst A.C., Van Lier C.M., Dulk-Ras, A., Hooykaas, P.J (2003). Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. Plant Physiology, 133: 978-988.
- 52. Ward, D.V., Zambryski, P.C (2001). Commentary: The six functions of *Agrobacterium* VirE2. PNAS, 98 (2) : 385–386.
- Wise, A., Voiniov, I., Binns, N (2005). Intersubunit complementation of sugar signal transduction in VirA heterodimers and posttranslational regulation of VirA activity in *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bacteriology, 1:213-223.
- Yuan Z.C., Edlind M.P., Liu, P., et al. (2007). The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quormonequenching genes in Agrobacterium. PNAS 10, 104 (28) : 11790–11795.
- Yuan, Q., Carle, A., Gao, CH., et al. (2005) Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 Pilus Assembly Sequence of Type IV Secretion Systems. The Journal of Biological Chemistry, 280 (28) : 26349–26359.
- Ziemienowicz, A., Merkle, T., Schoumader, F., Hohn, B., Rossi, L. (2001). Import of Agrobacterium T-DNA into plant nuclei : two distinct funtions of VirD2 and VirE2 proteins. The Plant Cell, 13 : 369-383.
- Zupan, J., Hackworth, C.A., Aguilar, J., Ward, D., Zambryski, P (2007). VirB1* Promotes T-Pilus Formation in the *vir*-Type IV Secretion System of *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Bacteriology, 189 (18): 6551– 6563.

# Capítulo 3

# Materiales y Métodos

## 3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1 Asepsia de frutos de Capsicum chinense

Los frutos se lavaron con agua y jabón, luego se sumergieron en alcohol al 70% por 30 segundos en agitación. Se enjuagaron dos veces con agua estéril y se colocaron en una solución de Cloralex al 35% (NaClO) y en agitación por 20 minutos. Transcurrido este tiempo se enjuagaron con agua destilada estéril (4-5 veces). A partir de estos frutos se extrajeron las semillas de *C. chinense* y se cortaron en 4 partes, cada segmento de embrión cigótico maduro, se consideró como un explante y se utilizó inmediatamente.

# 3.2 INDUCCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA A PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO

#### 3.2.1 Material vegetal y medio de cultivo

Cada explante se colocó en medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) adicionado con sacarosa al 3% (w/v), con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA, 8.9  $\mu$ M BAP (3R), 55.49  $\mu$ M de mioinositol, 0.41 mM ácido nicótico, 0.24 mM piridoxol-HCL, glicina y 29.65  $\mu$ M tiamina-HCL. El medio fue solidificado con gelrite al 0.25% (w/v) y el pH se ajustó a 5.8 antes de esterilizarse por autoclave (121°C, 20 min). Los cultivos se incubaron en fotoperíodo con 16 horas luz (40-50  $\mu$ mol m⁻² s⁻¹) a 25 ± 2°C.

La composición de este medio se mantuvo sin modificaciones durante toda la prueba, pero cuando se observaron posibles estructuras embrionarias, los explantes se cambiaron a medio MS sin reguladores de crecimiento, hasta obtener plántulas regeneradas. Se llevaron a cabo los análisis histológicos de las posibles estructuras embrionarias según el protocolo detallado en el Anexo 1. Se consideraron como testigo los explantes cultivados en medio MS sin reguladores.

Se evaluaron los explantes que tuvieron algún tipo de respuesta (germinación cotiledonar, radicular, formación de callo, embriones o plantas) y se analizaron estadísticamente para identificar diferencias significativas. Para el análisis de varianza se utilizó un valor de  $\alpha$ = 0.05 y se procesaron los datos con el programa Sigma Stat.

#### 3.2.2 Análisis histológico

Se realizaron análisis histológicos en los callos con posibles estructuras embrionarias, para lo cual se fijaron en paraformaldehído al 4% (en buffer

fosfatos 0.2 M, pH 7.2) por 24 horas bajo presión negativa. Las muestras fueron deshidratadas en una serie gradual de etanol absoluto: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% y dos veces al 100% durante una hora en cada paso, aplicando vacío por 5 minutos. El procedimiento de impregnación se realizó usando la resina JB-4 (Polyscience). Los tejidos tratados con resina se seccionaron en el microtomo (HM 325, MICROM) realizando cortes de 3 y 5 µm. Las secciones fueron doblemente teñidas con la reacción de Ácido Periódico-Shiff (PAS, por sus siglas en inglés), en combinación con azul-negro naftol (Anexo 1).

# 3.3 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE C. chinense

### 3.3.1 Cocultivo de embrión cigótico maduro

Los segmentos de embrión cigótico (225 segmentos) se infectaron por inmersión con C58C1 pER10W-35SRed (D.O _{600nm} 0.2), durante 40 minutos y otros segmentos no se infectaron (225 testigo). Luego, los explantes se colocaron sobre papel filtro para eliminar el exceso de bacteria y se colocaron en medio semisólido MS más 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP (3R). Se incubaron en la oscuridad a 28°C por 48 horas.

#### 3.3.2 Eliminación de A. tumefaciens después del cocultivo

Después del cocultivo, los segmentos se lavaron con agua estéril (2-3 veces) y luego se les aplicaron los tratamientos de lavado descritos en el Cuadro 3.1, durante 40 minutos.

Los explantes se colocaron en medio MS semisólido más 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP (3R), con los antibióticos según cada tratamiento de cultivo (Cuadro 3.1). Los tratamientos se incubaron a 25°C y a fotoperíodo de 16/8 h luz y oscuridad respectivamente, hasta su evaluación.

Tratamientos de lavado	Tratamientos en medio de cultivo				
1. Cefotaxima 1 g/L (40 min)	Cefotaxima 1 g/L				
2. Cloro (15%) y cefotaxima 1 g/L (40 min)	Cefotaxima 1 g/L				
3. Cefotaxima 1 g/L+ timentina 500 mg/L (40 min)	Cefotaxima 1 g/L+ timentina 500 mg/L				
4. Timentina 500 mg/L (40 min)	Timentina 500 mg/L				
5. Cloro (15%) y timentina 500 mg/L	Timentina 500 mg/L				
6. Cloro (15%) y cefotaxima 1 g/L+ timentina 500 mg/L (40 min)	Cefotaxima 1 g/L+ timentina 500 mg/L				
7. Merrem 5 mg/L	Merrem 5 mg/L				
8. Merrem 5 mg/L+ cefotaxima 500 mg/L (40 min)	Merrem 5 mg/L + cefotaxima 500 mg/L				
9. Sin antibiótico (testigo)	Sin antibiótico (testigo)				

Cuadro 3.1 Tratamientos de lavado y antibióticos presentes en el medio de cultivo para eliminar Agrobacterium después del cocultivo.

#### 3.3.3 Efecto de los antibióticos en la eliminación de la bacteria

Para cada tratamiento se consideraron dos niveles de infección: (1) explantes cocultivados, y (2) explantes sin cocultivar. Con el objetivo de determinar si hay un efecto en la respuesta regenerativa dependiente de la composición del medio de cultivo y de la presencia o ausencia de *A. tumefaciens*. Además, se trabajó con un testigo, donde los explantes fueron infectados con C58 pER10W-35SRed, pero cultivadas en medio sin antibióticos (tratamiento 9, Cuadro 3.1).

Para cada nivel se trabajó con 5 repeticiones con 5 explantes cada uno, por lo que fueron 10 réplicas en total para los tratamientos del medio de cultivo con antibiótico.

- Reincidencia bacteriana: se evaluó semanalmente el número de explantes por tratamiento que no presentaron crecimiento de A. tumefaciens.
- Efecto de los antibióticos en el cultivo in vitro de los segmentos de embrión cigótico

Se determinó el efecto de los antibióticos en la respuesta de regeneración *in vitro* y se evaluó a los 70 días después de cocultivo, el número de plántulas obtenidas. Los datos se analizaron estadísticamente con el programa Sigma Stat, para identificar diferencias significativas, y para el análisis de varianza se utilizó un valor de  $\alpha$ =0.05.

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA KANAMICINA COMO AGENTE SELECTIVO

Se colocaron segmentos de embrión cigótico sin cocultivar en medio MS semisólido con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP (3R). Adicionalmente a este medio se le agregó kanamicina a diferentes concentraciones: 100, 150, 200, 250 y 300 mg/L y un testigo (en ausencia de kanamicina).

Cada tratamiento estuvo conformado por 5 repeticiones con 5 explantes cada uno. Los tratamientos se incubaron a 25°C y a fotoperíodo de 16/8 h luz y oscuridad, respectivamente. El medio de cultivo se renovó cada 15 días, ya que el antibiótico pierde su efecto en ese período (González, comunicación personal).

# 3.4.1 Efecto de la kanamicina en el cultivo *in vitro* de los segmentos de embrión cigótico

Se evaluó semanalmente la respuesta de los explantes en el medio de cultivo en presencia y ausencia de kanamicina. Los datos se analizaron estadísticamente para identificar diferencias significativas. Para el análisis de varianza se utilizó un valor de  $\alpha$ =0.05 y se procesaron los datos con el programa Sigma Stat.

# 3.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN REPORTERO GUS

## 3.5.1 Cepa y plásmido

Se trabajó con segmentos de embrión cigótico los cuales se cocultivaron con la cepa LBA4404 pCAMBIA2301 que contiene en el ADN-T un gen reportero *uidA* que codifica a la  $\beta$ -glucuronidasa con un intrón de catalasa, también el gen de selección denominado *nptII*, el cual confiere resistencia a la kanamicina bajo el control del promotor 35S (Figura 3.1).



Figura 3.1 Representación esquemática de la región entre el borde derecho e izquierdo del ADN-T del plásmido pCAMBIA2301. En verde se muestra el promotor 35S el cual controla la expresión del gen *uidA*, y en rojo se muestra el gen *nptII* el cual confiere resistencia a kanamicina, de color rojo con rayas azules el gen GUS A (*uidA*) y de color celeste el terminador NOS.

# 3.5.2 Efecto del pH en la actividad endógena tipo GUS en tejidos de C. chinense

#### 3.5.2.1 Material vegetal

Se utilizaron estructuras vegetativas y reproductivas de plantas cultivadas ex vitro e in vitro de C. chinense. Cultivadas ex vitro: estambres, pétalos, embriones cigóticos, frutos, pericarpio, segmentos de placenta y séptum, e in vitro tallos, hojas y raíces de 90 días, hipocótilos (30 días) y callos (60 días), los cuales se obtuvieron de cultivos en medio 3R (antes descrito).

## 3.5.2.2 Evaluación por tinción histoquímica de la actividad βglucuronidasa (GUS)

Esta prueba se realizó según el protocolo establecido por Jefferson (1987). Los explantes se sumergieron en una de solución conteniendo buffer fosfato, 100 mM NaH₂P04, 10 mM EDTA, 0.5 mM ferrocianuro de potasio K₃Fe(CN)₆, 0.5 mM ferricianuro de potasio K₄Fe(CN)₆.3H₂O y 0.2% triton X-100. A la mezcla anterior se le adicionó X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indolil-  $\beta$ -D-glucurónido) predisuelto en DMSO a una concentración final de 1 mg/L y se incubó en oscuridad a 37°C durante 24 horas. Además, se determinó el efecto del pH del buffer fosfato en la actividad enzimática tipo GUS, modificándolo en un intervalo de pH de 6 a 8.

Después de la tinción se eliminó la solución de tinción (X-GLUC) y los explantes se colocaron en etanol (70%) para eliminar clorofilas y otros pigmentos propios del tejido por 24 h. La solución de decoloración se eliminó y los explantes fueron conservados en etanol al 70%.

Se evaluó la presencia e intensidad de la coloración tipo GUS, y en los casos en lo que no se observó a simple vista, se analizaron en el estereoscopio. Las fotografías fueron realizadas con una cámara unida al estereoscopio y guardadas digitalmente.

# 3.5.2.3 Transformación genética de *C. chinense* (LBA4404 pCAMBIA2301)

Se llevo a acabo la transformación de segmentos de *C. chinense* con la cepa LBA4404 pCAMBIA2301, a partir de los cuales se obtuvieron plántulas que fueron evaluadas por tinción histoquímica utilizando el buffer fosfato a pH 8. Además se consideró tejido foliar de plántulas de *Nicotiana tabacum* (tabaco), transformadas con LBA4404 pCAMBIA2301, como testigos positivos en la tinción utilizando el pH 8 del buffer fosfato.

# 3.6 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN HETERÓLOGO WUSCHEL DE Arabidopsis thaliana

## 3.6.1 Cepas y plásmidos binarios

## Plásmido binario pER10W-35SRed

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 con el plásmido pER10W-35SRed (Canche-Moo *et al.*, 2006). El testigo consistió únicamente de la cepa C58C1 desarmada. El plásmido pER10W-35SRed contiene en el ADN-T un gen reportero (*dsred*) que codifica para la proteína roja fluorescente (RFP), bajo el promotor constitutivo 35S clonado el fragmento *Smal* y *Sac*I de pCD 35SRed (Gallie *et al.*,1989) dentro del pER10W. Además del gen de selección denominado *nptll* el cual confiere resistencia a kanamicina bajo el control del promotor 35S. Expresa el

factor quimérico que contiene una parte transactivadora del receptor de estrógeno fusionado al dominio de unión al ADN Gal 4. El gen *WUSCHEL* está regulado por el promotor inducible GAL4 con el estrógeno 17  $\beta$ -estradiol (Figura 3.2).



Figura 3.2 Representación esquemática de la región entre el borde derecho e izquierdo del ADN-T del plásmido pER10W-35SRed. En verde se muestra el promotor inducible por 17-β-estradiol el cual controla la expresión del gen WUSCHEL y en rojo se muestra el gen npt/l el cual confiere resistencia a kanamicina y de color verde-amarillo la proteína roja fluorescente que esta bajo el promotor constitutivo 35S.

#### Plásmido binario pLH60-RFP

Se utilizó el plásmido pLH60-RFP contiene dos T-DNA's, uno de los cuales contiene al gen *dsred*, que codifica la proteína fluorescente roja, controlado por el promotor de ubiquitina del maíz (p*Ubi*) (Christensen y Quail, 1996) y el terminador de la nopalina sintasa (NOS); mientras que el otro T-DNA contiene al gen *hpt*, que codifica la higromicina fosfotransferasa, controlado por el promotor del virus del mosaico de la coliflor (35S) y el terminador de la

nopalina sintasa (Figura 3.3). El hecho de contar con dos unidades de transferencia de ADN permite separar el gen selectivo del gen de interés (*dsred*) en la progenie de las líneas transformantes por segregación de caracteres.



Figura 3.3 Mapa de restricción del plásmido pLH60-RFP. El promotor es de ubiquitina, con el terminador NOS, el agente selectivo para células vegetales es *hpt*, que le confiere resistencia a la higromicina y el gen reportero es el RFP (proteína roja fluorescente)(*dsred*).

### 3.6.2 Activación de cepas bacterianas

Se inoculó con un palillo la cepa C58 pER10W-35SRed y C58 pLH60 en 20 ml de medio LB adicionado con los antibióticos respectivos, durante 48 horas a 200 rpm en un orbitador protegidos por la luz.

Se inocularon 200 µl del cultivo crecido durante 48 horas, en 10 ml de medio LB con los antibióticos respectivos, y se incubaron durante 24 horas a 200 rpm en un orbitador protegido de la luz.

Posteriormente se adicionaron 10 ml de medio LB adicionado con los antibióticos más 100 µM de acetosiringona al cultivo de 24 horas y se incubó por 4-5 horas.

Se determinó la densidad óptica del cultivo a 600 nm de absorbancia y se utilizó una densidad de 0.2 para inocular los explantes. Se tomó la cantidad de cultivo bacteriano correspondiente a la densidad a emplear y se agregó medio MS líquido más los reguladores de crecimiento correspondientes, hasta tener un volumen final de 20 ml, al cual se le adicionó acetosiringona a 200 µM.

#### 3.6.3 Cocultivo de embrión cigótico maduro

Los segmentos de embrión cigótico maduro se sumergieron en 20 ml de la suspensión bacteriana durante 40 minutos (tiempo de incubación). Después se colocaron sobre papel filtro y se colocaron en medio MS semisólido, con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA, 8.9  $\mu$ M BAP (3R) y se incubaron en la oscuridad a 28°C durante 48 horas.

En estos experimentos se consideraron tres tratamientos: (1) explantes no sumergidos en la solución bacteriana (testigo), (2) explantes cocultivados con C58 pLH60 (testigo), y 3) explantes cocultivados con C58 pER10W-35SRed.

# 3.6.4 Eliminación de la bacteria y cultivo *in vitro* después del cocultivo

Transcurrido el tiempo de cocultivo los explantes se lavaron con agua estéril (2-3 veces) por 5 minutos o hasta que no presentaron residuos visibles de crecimiento bacteriano. Para eliminar el exceso de bacteria, los explantes se sumergieron en una solución con 1 g/L cefotaxima y 500 mg/L de timentina, durante 40 minutos en constante agitación y luego se escurrieron en papel filtro. Los segmentos de embrión cigótico se colocaron en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA, 8.9  $\mu$ M BAP (3R), más 1 g/L cefotaxima y 500 mg/L de timentina, el cual es el medio de cultivo base. Los tratamientos se incubaron a 25°C y en fotoperíodo de 16/8 h luz y oscuridad respectivamente.

#### 3.6.5 Activación de WUSCHEL en explantes transformados

A los explantes se les aplicaron diferentes tratamientos, los cuales se detallan en los puntos 3.6.5.1 y 3.6.5.2. Estos tratamientos se incubaron en fotoperíodo con 16 horas luz (40-50  $\mu$ mol m⁻² s⁻¹) a 25 ± 2°C, hasta su evaluación.

Los explantes que tuvieron algún tipo de respuesta (germinación cotiledonar, radicular, formación de callo o embriones) fueron evaluados y analizados estadísticamente. Para el análisis de varianza se utilizó un valor de α= 0.05 y se procesaron los datos con el programa Sigma Stat.

### 3.6.5.1 Explantes con inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo

Los siguientes tratamientos fueron aplicados en el medio de cultivo MS semisólido: 1) en presencia del inductor 5  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol, 2) solo en DMSO y 3) sin estradiol ni DMSO. Además de los antibióticos para eliminar la bacteria y

los reguladores de crecimiento antes mencionados.

Después de transcurridos 21 días, todos los explantes fueron cambiados a un medio de cultivo fresco, pero se consideraron algunas modificaciones en los tratamientos. Se trabajo con 6 repeticiones con 5 explantes cada una. La mitad de las repeticiones se mantuvo en el mismo tratamiento y a la otra mitad se le eliminó la presencia del estradiol o del DMSO, según fuera el caso. Esto para determinar si la presencia del inductor o del disolvente tenía un efecto sobre la respuesta.

## 3.6.5.2 Explantes tratados por inmersión con el inductor (17 βestradiol)

En este experimento los explantes fueron sometidos por inmersión a los siguientes tratamientos: 1) en presencia de 5  $\mu$ M de 17  $\beta$ -estradiol, 2) solo con DMSO y 3) sin el estradiol ni el DMSO. El tiempo de inmersión considerado se basó en el mejor tratamiento de un experimento previo, donde se probaron diferentes tiempos de inmersión en el disolvente, aplicando lavados y sin lavados (datos no mostrados). En este caso los segmentos se sumergieron por 40 segundos y posteriormente se lavaron con agua estéril por 5 minutos, luego se escurrieron en papel filtro y se colocaron en medio de cultivo con MS más 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP (3R), y los antibióticos antes descritos para eliminar la bacteria.

#### Microscopía de fluorescencia

Los callos transformados fueron observados en un estereoscopio de fluorescencia LEICA mod. MFZLIII, cuyo módulo de fluorescencia cuenta con los filtros de excitación de HQ 546/10 nm y emisión 600/40 nm (filtros RFP), con el objetivo de monitorear la expresión del gen *dsred* en sus tejidos. Las fotografías se tomaron con cámara digital LEICA instalada en el microscopio con luz visible y fluorescencia.

#### 3.6.5.3 Tejido foliar de plantas transformadas

Se tomaron hojas de las plantas transformadas con C58 pER10W-35SRed y por medio de inmersión se les aplicaron tres tratamientos: 1) en presencia de 5  $\mu$ M de estradiol disuelto en DMSO; 2) solo con DMSO y 3) sin inmersión. Posteriormente los explantes se colocaron sobre papel filtro y finalmente se colocaron en medio de cultivo MS. Estos tratamientos se incubaron en fotoperíodo y se evaluaron.

# 3.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Canche-Moo, R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V., Rodriguez-Zapata, L.C., Castaño, E (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. Plant Cell Tiss. Organ Culture, 84:373-377.
- Christensen, A.H., Quail, P.H (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. Transgenic Res. 5(3): 213-218.
- Gallie, D.R., Lucas, W.J., Walbot, V (1989). Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. Plant Cell, 1:303–311.
- Jefferson, R.A (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant. Mol. Biol. Rep, 5: 387-405.
- Murashige, T., and Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15: 473-497.

# ANEXO 1

# Detalle de protocolos utilizados

# **1.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

#### Ácido periódico-Schiff (APS) + Azul-Negro de Naftol

Los cortes histológicos se hidrolizaron en ácido periódico por 5 minutos, después se lavaron con agua corriente y se dejaron secar. Éstos se tiñeron con el reactivo de Schiff en la oscuridad por 1 minuto, se lavaron con agua hasta que el agua quedó incolora y se secaron.

Finalmente los cortes se tiñeron en una solución de azul de naftol al 1% en ácido acético al 7% (1 minuto), se lavaron con agua y se dejaron secar.

#### Preparación de colorantes

#### **Reactivo de Shiff**

Se pesó 1.0 g de cloruro de pararosalinina (fucscina básica), 3.0 g de metabisulfito de sodio, 0.5 g de carbón activado, y se adicionaron 30.0 ml de HCI (1 N) y 200 ml de agua destilada.

#### Ácido periódico (Sigma 7875)

Se pesó 1.0 g de acido periódico el cual se disolvió en 100 ml de agua.

#### Azul-Negro naftol (Sigma N 3005)

Para contrastar la tinción PAS se utilizó 100 ml de ácido acético al 7 % y 1.0 g de azul-negro naftol.

## **1.2 SISTEMA PURIFICACIÓN ADN MINIPREP**

Se utilizó el paquete de purificación de plásmido bacteriano Wizard PLUS (PROMEGA # catalógo A7500)

### Preparación de lisado

Los cultivos se centrifugaron por 2 minutos a 10, 000 x g, luego se resuspendió la pastilla en la solución de resuspensión (200  $\mu$ l), se agregó la solución de lisis, se invirtió 4 veces para mezclar. Luego se agregó la solución de neutralización y se invirtió 4 veces para mezclar. Seguidamente se centrifugó el lisado por 5 minutos a 10, 000 x g.

#### Purificación del ADN plasmídico

En cada minicolumna se agregó 1 ml de resina y cuidadosamente se transfirió el lisado a la resina de cada dispositivo. Todo el líquido atravesó la columna aplicando vacío.

#### Lavado

En la columna conteniendo el etanol se colocaron 2 ml de la solución de lavado y se aplicó vacio hasta que todo el líquido atravesó la columna; continuó este proceso por 30 segundos. Se removió el cilindro y se transfirió la minicolumna a un tubo y se centrifugó a 10,000 x g por 2 minutos.

#### Elución

Se agregaron 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasa y se mantuvo a 37°C por 1 minuto. Se centrifugó a 10,000 x g por 20 segundos a temperatura ambiente.

La verificación del ADN plasmídico se realizó por electroforesis en un gel de 0.8% de agarosa en amortiguador TAE 1X a 90 V por 40 minutos.

# 1.3 EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTA

Del tejido foliar se tomaron 0.15 g y se maceró con N₂, después se agregó 1 ml del buffer de extracción (SDS), 500  $\mu$ l de fenol y 500  $\mu$ l de cloroformo. El tejido se transfirió a un tubo eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min.

Se recuperó el sobrenadante y se agregó isopropanol 0.8 vol (80%); esta mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. Después se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol frío (500 µl). Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos y se secó la pastilla a temperatura ambiente.

La pastilla se resuspendió en TE-RNAsa y agua a pH 8 (10  $\mu$ l y 20  $\mu$ l, respectivamente).

## 1.4 ANÁLISIS SOUTHERN BLOT (Amersham Biosciences, 2002)

Se extrajo el ADN de tejido foliar de la planta posiblemente transformada y sin transformar (5 a 50 µg) y se digirió con *Hind*III, se separaron en un gel de agarosa y se transfirieron en una membrana de nylon ((Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, England).

#### Elaboración y marcaje de la sonda

El ADN de WUSCHEL fue digerido con Dral y Haelll, con el fin de liberar un fragmento de aproximadamente 300 pb, para utilizarse como sonda (ver Anexo 3). Por medio de UV se identificó el fragmento correspondiente al gen

WUSCHEL, el cual se extrajo de acuerdo al procedimiento señalado en el kit de extracción de GENOMICS (Cat. No. LSKGEL050). La banda de ADN se colocó en el gel nebulizador y se dió un giro por 10 minutos a 5 000 rpm. El ADN se pasó a través de los microporos de la membrana del filtro y se colectó en el vial.

El marcaje de la sonda, se realizó según las indicaciones del kit del sistema de detección y marcaje directo de genes con Alkphos de (Amersham Biosciences, USA). Primeramente se colocaron 50  $\mu$ l (50 ng/ $\mu$ l) de la muestra de ADN extraído y se desnaturalizó en un baño de agua a 94°C por 5 minutos. Inmediatamente el ADN se pasó a hielo por 5 minutos y se dió un giro en la centrífuga para colectar el contenido en forma de una pastilla en el tubo. Al ADN se le agregaron 50  $\mu$ l del buffer de reacción y se mezcló lentamente; posteriormente se colocaron 5  $\mu$ l del reactivo de marcaje. Se tomaron 10  $\mu$ l de la solución de unión y se le adicionaron 40  $\mu$ l de agua destilada, esta dilución se adicionó a la reacción anterior, y se incubó a 37°C por 30 minutos.

#### Hibridación

Se precalentó a 55°C el volumen requerido de la solución de buffer de hibridación directo de Alkfos, que correspondió aproximadamente a 0.25 ml/cm² de la membrana. La membrana se colocó en el buffer de hibridación y se prehibridó por al menos 15 minutos a 55°C en el horno en agitación. Finalmente se adicionó la sonda marcada en el buffer (5 a 10 ng de sonda por ml de buffer) y se hibridó a 55°C en un horno en agitación durante 18 horas.

#### Posthibridación y lavados

Se precalentó el buffer primario a 55°C y se utilizó en exceso en un volumen de 2-5 ml/cm² de la membrana. Cuidadosamente se transfirió la membrana a esta solución y se lavó por 10 minutos a 55°C.

La membrana se pasó a un recipiente nuevo y se agregó el buffer de lavado secundario (5 ml/cm² de la membrana) por 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó en dos ocasiones.

#### Generación de la señal y detección

Se eliminó el buffer secundario de la membrana y se colocó el reactivo de detección (1 ml aproximadamente) (30-40  $\mu$ l/cm²) y se dejó de 2 a 5 minutos. Se eliminó el exceso de reactivo y se colocó en un acetato (sin presencia de burbujas), el cual se colocó en el casete de revelado. Finalmente se expuso por 1 h a temperatura ambiente y se reveló el film.

#### Componentes del kit

El kit para la de extracción de ADN del gel (GENOMICS Cat. No. LSKGEL050) tiene los siguientes componentes:

Dispositivo de montaje para la extracción de ADN del gel: gel nebulizador, filtro y vial para microcentrifuga. Buffer 50x concentrado en 500 ml (2 M Tris-acetato, 5mM Na₂EDTA, pH:8).

## Soluciones adicionales y reactivos requeridos

### Buffer de lavado primario

Urea 120 g/l (2 M) SDS 1 g/l, 0.1% (w/v) 0.5 M fosfato de sodio pH: 7 en100 ml (50 mM) NaCl 8.7 g/l (150 mM) 1.0 M MgCl₂ 1 ml (1 mM) Reactivo bloqueador 2 g/l, 0.2% (p/v)

#### Buffer de lavado secundario (stock 20 x)

Tris base 121 g/l (1 M) NaCl 112 g/l (2 M) Ajustar el pH a 10.0. Preparar 1 litro con agua. Este puede ser mantenido por 4 meses en refrigeración a 2-8°C.

## Buffer de hibridación

A la solución de hibridación se le agregaron 0.5 M de NaCl y reactivo bloqueador a una concentración final de 4% (peso/volúmen) y se mantuvo en agitación por 1 a 2 horas a temperatura ambiente.

#### Buffer de lavado secundario

El buffer de lavado secundario se empleó a 1 X con 1 M de  $MgCl_2$  para dar una concentración final de 2 mM de magnesio en el buffer. Este buffer no debe ser almacenado.

# Capítulo 4

# Resultados

# 4.1 INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA A PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO

Los segmentos de embrión cigótico presentaron varios tipos de respuesta a los 30 días de cultivo en el medio MS semisólido solo, o complementado con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP (3R) (Figura 4.1.1). Los explantes presentaron germinación cotiledonar (inciso A), germinación radicular (inciso B), formación de tejido calloso (inciso C) y explantes sin respuesta (inciso D).





Cabe señalar, que a partir de los segmentos con germinación cotiledonar o radicular se desarrolló el tejido calloso. Sin embargo, en ocasiones los explantes mantuvieron su respuesta, o en el caso de la germinación cotiledonar se formaron brotes, por lo que no presentaron tejido callo calloso. La formación de tejido calloso se favoreció en presencia de los reguladores de crecimiento utilizados, ya que a los 30 días de cultivo los explantes presentaron un incremento en esta respuesta con respecto al testigo (Figura 4.1.2).





En el cultivo con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP, se obtuvieron explantes con posibles estructuras embrionarias las cuales se empezaron a observar a los 60 días de cultivo (Figura 4.1.3). Las posibles estructuras embrionarias se formaron a partir de un tejido calloso de color blanco, casi transparente (Figura 4.1.4 A), el cual se torna de color verdoso para luego necrosarse (Figura 4.1.4 B), y es a partir de ese tejido necrosado que surgen los posibles embriones somáticos.

Sin embargo, en el medio de cultivo con o sin reguladores, también se formaron brotes procedentes de explantes con germinación cotiledonar a los 30 días de cultivo (Figura 4.1.3).





A partir de 60 días de cultivo con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP, el 8% de los explantes (4/50 explantes) mostraron desarrollo de posibles estructuras embrionarias (Figura 4.1.3 y Anexo 2).



Figura 4.1.4 Estadios morfológicos de la embriogénesis somática indirecta en *C. chinense*. (A y B): segmentos de embrión cigótico maduro en medio MS con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM y de la D en adelante en medio MS. A: Tipo de callo a partir del cual se generan las estructuras (30 d), (B): callo embrionario (40 d), C: callo con estructuras embrionarias (50 d), D: estructuras embrionarias (60-70 días), E: estadio de torpedo a los 100 días. F-G: estructuras mantenidas en el callo. F: Embrión germinado (120 d), G: plántulas (150 d). H-I: estructuras separadas del explante. H: embrión germinado (120 días), I: plántula (150 d). La barra horizontal equivale para A-E: 0.1 cm, F: 0.3 cm, G: 0.4 cm, H: 0.2 cm, I: 0.3 cm

En el momento en que se desarrollaron las estructuras cultivadas en el medio de inducción (3R), los explantes se transfirieron a medio MS sin reguladores de crecimiento. Las estructuras embrionarias se observaron en diferentes estadios desde estructuras en estadio globular (Figura 4.1.4 D), de 60 a 90 días de cultivo y en estadio de torpedo a los 100 días de cultivo (Figura 4.1.4 E).

Cuando el embrión en estadio de torpedo permaneció sobre el callo necrosado, después de 120 días de cultivo germinó (Figura 4.1.4 F), y a los 150 días se desarrolló una plántula con sistema radicular (Figura 4.1.4 G). Las plántulas obtenidas a partir de este sistema, presentaban algunas deformidades (inciso G). Pero en el caso, de que el embrión en estadio de torpedo, se desprendió del explante, germinó después de 120 días, y a los 130 días de cultivo se desarrolló una plántula sin deformidades (Figura 4.1.4 H-I). En ambos casos, del 8% de los explantes que mostraron estructuras embrionarias, un 75% logró la conversión a plántula (3 de 4 explantes). Sin embargo transcurridos 160 días de cultivo, las plántulas regeneradas a partir del embrión que se mantuvo en el callo, mostraron necrosis y estancamiento en el desarrollo (Figura 4.1.5 A). En cambio cuando el embrión en estadio de torpedo se desprendió del explante que le dio origen, este logró germinar hasta desarrollar una plántula con sistema radicular bien formado (Figura 4.1.5 B-C).



Figura 4.1.5 Plántulas de C. chinense regeneradas a partir de embriogénesis somática indirecta después de 160 días de cultivo. A: Plántula obtenida a partir del embrión somático mantenido en el explante que le dio origen. B: Plántula desarrollada a partir del embrión que fue desprendido del tejido calloso. C: Plántula de 160 días. La barra horizontal equivale para A: 0,3 cm, B: 0.3 cm y C: 0.5 cm.

# 4.1.1 Análisis histológico de tejidos de *C. chinense* cultivados *in vitro* durante la inducción de embriogénesis somática

A partir de los callos con posibles estructuras embrionarias se realizaron secciones histológicas. Los análisis histológicos del callos embriogénicos mostraron que las primeras etapas de la embriogénesis, inician con células pequeñas e isodiamétricas, con prominentes núcleos y nucleolos, citoplasma denso, pequeñas vacuolas, paredes celulares delgadas (Figura 4.1.6 A); seguidos de una serie de divisiones organizadas (Figura 4.1.6 B). Se presentaron células menistemáticas pequeñas densamente teñidas localizadas

en la periferia de los callos (Figura 4.1.6 C), las cuales empiezan a dividirse dando lugar a la segmentación por proembriones que emergen en la superficie del callo (Figura 4.1.6 D).



Figura 4.1.6 Secciones histológicas longitudinales de los embriones somáticos a partir de tejido calloso de *C. chinense*, cultivado en medio MS complementado con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM BAP. A-B: células embriogénicas, C: centros meristemáticos, D-E: proembrión, F: embrión somático en estadio globular temprano. Todos los cortes son teñidos con la reacción de PAS. N: núcleo, S: estructura como suspensor, P: protodermis. Barras horizontales A-C 50 μm, y D-F: 100 μm.

En los proembriones se observó una estructura similar a un suspensor, lo cual sugiere que son derivados de la división mitótica de células embriogénicas con origen unicelular (Figura 4.1.6 E). El embrión en estadio globular inicia la diferenciación celular y establece la estructura base de la futura planta, además se visualiza el protodermo (Figura 4.1.6 F).

En la Figura 4.1.7, se observan diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos, desarrollados de tejido calloso de *C. chinense*. En las secciones histológicas se observaron embriones somáticos estadio globular (inciso B), oblongo (inciso C), acorazonado (inciso D), torpedo (inciso E) y cotiledonar (inciso F). Se observa el embrión somático en estadio cotiledonar con meristemo apical, hojas cotiledonarias y primordios foliares (Figura 4.1.7 F). Estos resultados sugieren que a partir de segmentos de embrión cigótico maduro de *C. chinense* cultivados *in vitro*, se formó callo embriogénico que

generó embriones somáticos hasta el estadio cotiledonar.

Debido a los resultados mostrados en este apartado, en los siguientes experimentos de este trabajo se utilizaron segmentos de embrión cigótico de *C. chinense*. Estos explantes fueron cultivados en el medio MS semisólido complementado con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP (3R), ya que este medio de cultivo permitió principalmente la formación de tejido calloso del cual se obtuvieron posibles estructuras embrionarias (8%). Y finalmente, los embriones en estadio de torpedo fueron transferidos a medio MS semisólido sin reguladores de crecimiento, hasta obtener plántulas regeneradas con sistema radicular.



Figura 4.1.7. Cortes histológicos longitudinales de los estadios de desarrollo de los embriones somáticos a partir de tejido calloso de *C. chinense*.
A) Globular; B) oblogo; C) acorazonado, D) torpedo, E) cotiledonar. Todos los cortes son teñidos con la reacción de PAS. P: protodermis, ZV: zona vascular, MA: meristemo apical, PF: primordios foliares, C: cotiledón. Barras horizontales (A-E): 200 μm.

## 4.2 ELIMINACIÓN DE A. tumefaciens DESPUÉS DEL COCULTIVO

### 4.2.1 Reincidencia bacteriana

Los segmentos cocultivados se colocaron en medio MS semisólido complementado con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP, y de los antibióticos (Cuadro 3.1), y a los 70 días de cultivo la mayoría de los tratamientos impidieron el crecimiento de *A. tumefaciens* (Figura 4.2.1). En el caso de los tratamientos de lavado y los del medio del cultivo complementados con 500 mg/L de cefotaxima y 5 mg/L de meropenem, al igual que 1 g/L de cefotaxima lavando con cloro (15%), se eliminó la bacteria en el 80% del total de los explantes.

Se eliminó la bacteria en el 60% del total de explantes con los siguientes tratamientos: 1 g/L cefotaxima más 500 mg/L de timentina, con y sin lavado con cloro (15%) y el de 500 mg/L de timentina con el tratamiento de lavado con cloro (15%).



Figura 4.2.1 Número de explantes cocultivados sin reincidencia de A. tumefaciens, después de 70 días de cultivo con diferentes antibióticos. n= 25

Desde la primera semana los explantes cocutivados que no se lavaron ni se cultivaron en presencia de antibióticos, presentaron en su totalidad reincidencia bacteriana (Figura 4.2.1). Por lo tanto, en los explantes cocultivados y tratados con antibióticos se sugiere que la ausencia de crecimiento bacteriano no es debida a la falta de infección por la bacteria en el proceso del cocultivo. Dado lo anterior, la ausencia de *A. tumefaciens* en los segmentos cocultivados podría ser atribuida a la acción de los antibióticos en el medio de cultivo que están impidiendo que crezca la bacteria.

# 4.2.2 Efecto de los antibióticos en la regeneración *in vitr*o de los segmentos de embrión cigótico

Para seleccionar entre los antibióticos que permitieron eliminar la bacteria después del cocultivo, es importante considerar el efecto que tienen estos β-lactámicos en la respuesta de cultivo *in vitro* para *C. chinense*. Por lo

que se evaluó a los 70 días, el número de plántulas con sistema radicular obtenidas en estos tratamientos (Figura 4.2.2).

Algunos antibióticos lograron suprimir el crecimiento bacteriano en los explantes cocultivados, pero también afectaron la respuesta de regeneración *in vitro*. Por ejemplo, el tratamiento de cefotaxima y lavado con cloro (15%) eliminó la bacteria en el 80% del total de los explantes, pero disminuyó la respuesta *in vitro* principalmente de los explantes cocultivados.





Cabe destacar que al emplear 1 g/L de cefotaxima más 500 mg/L de timentina se obtuvo una mayor cantidad de plántulas, a partir de los explantes cocultivados (48% del total de explantes cocultivados). Por lo que este tratamiento no solo eliminó la bacteria en el 60% del total de los explantes, sino que también mostró mayor cantidad de plántulas a partir de los segmentos cocultivados (Figura 4.2.2).

## 4.3 EMPLEO DE LA KANAMICINA COMO AGENTE SELECTIVO EN EXPLANTES DE C. chinense

En la transformación genética el uso de genes que le confieren resistencia a antibióticos para seleccionar células o tejidos transformados es relevante, sin embargo es necesario evaluar la dosis y el efecto que tienen estos aminoglucósidos en los explantes no transformados. Para el *C. chinense* se observó que los segmentos de embrión cigótico no cocultivados y en presencia de diferentes concentraciones de kanamicina mostraron alguna respuesta *in vitro* (Figura 4.3.1). Por lo tanto, no hay evidencia de mortalidad en los segmentos de *C. chinense* no transformados y cultivados con 300 mg/L de kanamicina.

Sin embargo, a partir de la segunda semana los explantes en medio de cultivo sin kanamicina no presentaron desarrollo radicular y los explantes cultivados con kanamicina (100 a 300 mg/L) tuvieron desarrollo radicular (Figura 4.3.1). Entre los tratamientos con kanamicina no hubo una marcada variación en el desarrollo radicular, sin embargo la producción de radícula se incrementa en la primera semana con 100 mg/L de kanamicina.

Es interesante señalar que en los cultivos sin kanamicina, el producto principal es la formación de tejido calloso, tanto en la segunda como en la tercera semana. Y en presencia de kanamicina los explantes sin cocultivar no mostraron formación de tejido calloso. Este resultado nos permite disponer de un sistema selectivo para el tejido calloso de *C. chinense* transformado.

Para la primera semana no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las variables analizadas: radícula (p=0.1012) y formación de callo (p=0.6523). En la segunda semana se presentaron diferencias significativas para desarrollo de radícula (p=0.008) y formación de tejido calloso (p=<0.0001). En la tercera semana hubo diferencias significativas en el desarrollo de radícula (p=0.0007) y formación de callo (p<0.0001).

En la segunda semana se presentaron diferencias significativas en la respuesta radicular entre los siguientes tratamientos: 100-150 mg/L (p=0.0297), 100 mg/L-testigo (p=0.0094), 150-300 mg/L (p=0.0297), 150 mg/L-testigo (p<0.0001), 200 mg/L-testigo (p=0.0004), 250 mg/L-testigo (p=0.0008), 300 mg/L-testigo (p=0.0094). En el caso de la formación de callo hubo diferencias significativas en todos los tratamientos con respecto al control (p<0.0001).



Figura 4.3.1 Efecto de la kanamicina en la regeneración de los explantes sin cocultivar de C. chinense, a la primera, segunda y tercera semana de cultivo in vitro en medio MS adicionado con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM BAP respectivamente. Cada barra representa el número promedio de explantes con: (A) desarrollo radicular y (B) con formación de callo. n= 25.

En la tercera semana para la formación de radícula, se obtuvieron diferencias significativas entre los siguientes tratamientos: 100-200 mg/L (p=0.0452), 100 mg/L-testigo (p=0.0078), 150 mg/L-testigo (p=0.0003), 200

mg/L-testigo (p<0.0001), 250 mg/L-testigo (p=0.0006), 300 mg/L-testigo (p=0.0006). Además en la tercera semana hubo diferencias significativas para la formación de callo en todos los tratamientos con relación al control (p<0.0001).

Estos resultados sugieren que a partir de la segunda semana, el número de explantes con respuesta radicular es diferente entre los tratamientos con kanamicina y los cultivos sin kanamicina. De igual forma en la formación de tejido calloso, los resultados sugieren la existencia de diferencias entre los cultivos tratados con y sin kanamicina.

## 4.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN REPORTERO GUS

Se utilizó el gen reportero *uidA* para evaluar el método de transformación genética en los segmentos de *C. chinense*. Después del cocultivo, los segmentos de embrión cigótico (LBA4404 pCAMBIA2301) se cultivaron por 30 días en medio de cultivo 3R más los antibióticos seleccionados, para obtener tejido calloso principalmente.

## 4.4.1 Caracterización histoquímica de la actividad tipo βglucuronidasa

Siguiendo la metodología propuesta por Jefferson (1987), se evaluaron histoquímicamente los explantes que no presentaron reincidencia bacteriana visible. Se observó que algunos explantes de *C. chinense* no cocultivados mostraron actividad endógena tipo GUS (Figura 4.4.1.1), tal es el caso del tejido calloso y hojas pequeñas (Figura 4.4.1.2). En la evaluación por tinción histoquímica no hubo diferencias significativas entre los explantes cocultivados (p=0.622) y sin cocultivar (p=0.242) que mostraron coloración azul (Figura 4.4.1.1).



Figura 4.4.1.1 Evaluación de la actividad GUS en los explantes cocultivados con LBA4404 pCAMBIA2301 y del tipo GUS en explantes no cocultivados. Las barras indican el No. total de explantes teñidos de color azul en la prueba histoquímica. n=14

Estos resultados muestran la posible existencia de actividad endógena tipo GUS en los tejidos de *C. chinense*. Por lo que los explantes coculivados (LBA4404 pCAMBIA2301) que dieron positivos a la tinción GUS, no permitieron mostrar evidencia de la posible transformación de los mismos con el gen *uidA*.



Figura 4.4.1.2 Evaluación de los explantes de *C. chinense* por tinción histoquímica. A, C y E: sin cocultivar. B, D y F; cocultivados. A y B: tejido calloso con brotes, de la C a la F: tejido calloso, G: hoja de tabaco no cocultivada (testigo positivo) y H: hoja de tabaco cocultivada (testigo positivo). La barra horizontal equivale para A hasta F = 0.1 cm y en G - H = 0.5 cm.

# 4.4.2 Efecto del cocultivo en la formación de tejido calloso de C. chinense

Se demostró que el proceso del cocultivo con *A. tumefaciens*, afecta la respuesta *in vitro* para la formación de tejido calloso a partir de los segmentos de embrión cigótico. En la Figura 4.4.2.1 se muestra como los explantes cocultivados en medio MS semisólido suplementado con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA y 8.9  $\mu$ M BAP más los antibióticos, disminuyen su respuesta a un 29%, con relación a los no cocultivados en el mismo medio de cultivo (65%).

En este experimento no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables: cotiledón (p=1.000), radícula (p=0.516), brotes (p=0.0995) y segmentos que no presentaron algún tipo de respuesta (p=0.120). En el caso de la formación de tejido calloso se presentaron diferencias significativas entre los explantes cocultivados y sin cocultivar (p=0.000131) (Figura 4.4.2.1).



**Figura 4.4.2.1** Explantes cocultivados con LBA4404 pCAMBIA2301 y sin cocultivar, a los 70 días de cultivo con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA, 8.9 μM BAP más antibióticos. Barras % explantes.

## 4.4.3 Efecto del pH en la actividad endógena tipo βglucuronidasa en tejidos de C. chinense

A continuación se presentan los resultados de la evaluación de diferentes tejidos de *C. chinense* con la tinción histoquímica GUS, utilizando el buffer fosfato a pH 7. Cabe señalar que estos tejidos no fueron transformados genéticamente con el gen reportero *uidA*.



Figura 4.4.3 Evaluación de la actividad endógena tipo GUS en tejidos de C. chinense al aplicar el buffer fosfato con diferentes valores de pH (6 a 8). A: embrión cigótico, B: placenta, C: pericarpio, D: Séptum, E: flor, F: callo de 60 d, G: raíces de 90 d, H: tallos de 90 d, I: hojas de 90 d.

Se presentó actividad endógena tipo GUS con mayor intensidad en los siguientes explantes: estambres, hipocótilo (25 días), raíz y tejido calloso desarrollado a partir de segmentos de embrión cigótico. Con menor intensidad en segmentos de embrión cigótico maduro, placenta y pericarpio (parte externa) y no mostraron actividad endógena el séptum, pétalos, hojas maduras y tallos (90 días).

Para inhibir la actividad enzimática tipo GUS identificada en las estructuras de *C. chinense* con el buffer fosfato a pH 7, se modificó el valor del pH en un intervalo de 6 a 8 (Figura 4.4.3).

Se observó actividad endógena tipo GUS en todas las estructuras vegetativas y reproductivas analizadas con pH 6, a excepción de los pétalos (Figura 4.4.3). En el tejido foliar se presentó exclusivamente en tejidos vasculares (inciso I).

La actividad endógena con pH 7.5 fue detectada en estambres, placenta, pericarpio, séptum, la base del embrión cigótico y tejido calloso (Figura 4.4.3). En la placenta y estambres hubo mayor intensidad de tinción que la obtenida con pH 7. Con el pH 7.5 no hubo actividad tipo GUS en pétalos, raíces, tallos y hojas.

En la mayoría de los tejidos de *C. chinense* analizados se redujo o eliminó la actividad endógena tipo  $\beta$ -glucuronidasa con el buffer a pH 8 (Figura 4,4,3 y Cuadro 4.4.3), con excepción de los estambres y placenta.

A continuación se resume la actividad endógena tipo GUS en tejidos de C. chinense a diferentes valores de pH, según la actividad de tinción relativa.

Cuadro	4.4.3	Actividad	tipo	GUS	а	diferentes	valores	de	pH	en	tejidos	de	C.
		chinense	(las d	cruces	n	niden relativ	vamente	la	activ	ida	d de tine	ción	).

Tejido	<u></u>						
		7	7.5	8			
Embrión	+++++	+	+	-			
cigótico							
Placenta	+++++	+	+++	++			
Pericarpio	+++	++	++	-			
Séptum	+++++		+	-			
Estambres	+++++	+++	+++	++			
Pétalos	-	-	-	-			
Callo (60 d)	+++++	+++++	+++	-			
Raíces (90 d)	+++++	+++		-			
Tallos (90 d)	+++++		-	-			
Hojas (90 d)	++++			-			

Es importante resaltar que en tejido calloso formado de segmentos de embrión cigótico (60 días) no se presentó actividad endógena a pH 8. Por lo tanto, los experimentos de transformación genética con este gen reportero y con este tipo de explante, se evaluaron con buffer fosfato a pH 8. Esto permitió identificar los posibles explantes transformados con el gen *uidA*.
# 4.4.4 Transformación genética de C. chinense con LBA4404 pCAMBIA2301

Se llevo a cabo la transformación de segmentos de *C. chinense* con la cepa LBA4404 pCAMBIA2301, cultivadas en el medio de cultivo con los reguladores antes descritos. Se obtuvieron plántulas regeneradas, las cuales fueron evaluadas por tinción histoquímica utilizando el buffer fosfato a pH 7 y pH 8. En la prueba de tinción histoquímica con buffer fosfato a pH 8, se consideraron plántulas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) transformadas con LBA4404 pCAMBIA2301, como testigos positivos.

En la Figura 4.4.4 se muestran los resultados de la tinción histoquímica, utilizando el buffer fosfato a pH 8. En el inciso B, se observa un tallo de la plántula de *C. chinense* con actividad de GUS, caso contrario al tallo de la plántula de *C. chinense* no transformada (inciso A). Como se mencionó en el punto 4.4.3, la actividad endógena tipo GUS, no está presente en los tallos de *C. chinense* evaluados con buffer fosfato a pH 7 ó pH 8. Por lo que este resultado sugiere la posible transformación transitoria de *C. chinense* con el gen reportero *uidA*.

En el tejido foliar de plántulas de *N. tabacum* (tabaco) se observó actividad del gen *uidA* (inciso D) y en el tejido foliar de plántulas no transformadas, no se observó la actividad endógena tipo GUS (inciso C).

Por lo que la evaluación de tinción histoquímica, con el buffer fosfatos a pH 8, sugiere que el gen *uidA* posiblemente introducido en los tejidos de *C. chinense* y *N. tabacum* está activo, ya que se obtuvo coloración azul en el tejido transformado. En el caso del tejido de plantas no transformadas no se presentó dicha actividad (Figura 4.4.4).



Figura 4.4.4 Transformación de *C. chinense* y *Nicotiana tabacum* con el gen reportero GUS, evaluados mediante tinción histoquímica con el buffer fosfatos a pH 8. A y B: explantes de *C. chinense*. A: sin cocultivar, B: transfromados con LBA4404 pCAMBIA2301. C-D: Explantes de *N. tabacum*. C: Sin cocultivar, D: explantes transformados con LBA4404 pCAMBIA2301.

#### 4.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN HETERÓLOGO WUSCHEL DE Arabidopsis thaliana

# 4.5.1 Verificación por PCR del plásmido pER10W-35SRED en los cultivos de *A. tumefaciens* empleados para el cocultivo

Para poder corroborar la inserción del plásmido en el genoma de la bacteria se realizó el PCR utilizando ADN extraído a partir del cultivo de *A. tumefaciens* (C58 pER10W-35SRed), y se utilizó como testigo ADN extraído de cultivo de pER10W-35SRed de *E. coli.* Se amplificó una banda de 862 pb, que corresponde al fragmento esperado con los oligos para *WUSCHEL* (Figura 4.5.1). A partir de estos cultivos de C58 pER10W-35SRed de *A. tumefaciens* se llevaron a cabo los experimentos de transformación genética de *C. chinense*.



Figura 4.5.1. PCR de ADN de C58 pER10-w. Carril 1: marcador de 1 kb, carril 2: PCR ADN pER10W-35SRed (*A. tumefaciens*), carril 3 y 4: PCR ADN pER10W (*E. coli*), carril 5: mezcla.

#### 4.5.2 Presencia del gen heterólogo WUSCHEL por PCR

Después de realizar el cocultivo de los segmentos de embrión cigótico de *C. chinense*, estos fueron cultivados *in vitro* en el medio 3R con los antibióticos seleccionados hasta obtener plántulas. A partir de ADN de tejido foliar de las plantas obtenidas se llevó a cabo la evaluación por PCR con oligos para amplificar el gen *WUSCHEL*.

Se obtuvo la amplificación de una banda de aproximadamente 862 pb, que corresponde al fragmento esperado con los oligos para el gen *WUSCHEL*. Este resultado sugiere la posible inserción del gen heterólogo en las plantas *C*. *chinense* cocultivadas con C58 pER10W-35SRed, ya que no se observo ninguna banda en la plántula no cocultivada (Figura 4.5.2 A).

A pesar de que se obtuvo por PCR una banda de 862 pb en las plántulas de *C. chinense* producto de explantes cocultivados (C58 pER10W-35SRed), se debe descartar la posible amplificación del fragmento debida a la presencia de *A. tumefaciens* en estos tejidos. Para esto se evaluó por PCR la presencia de la bacteria en *C. chinense* utilizando los oligos para amplificar los genes *virE*. En los tejidos evaluados de *C. chinense* no se amplificó la banda correspondiente al fragmento esperado para los genes *virE*, como el fragmento obtenido del cultivo de *A. tumefaciens* en carril 2 (Figura 4.5.2 B).



Figura 4.5.2 Evaluación por PCR de las plántulas de *C. chinense* posiblemente transformadas con C58 pER10W-35SRed. (A): Amplificación de un fragmento de 862 pb del tamaño esperado para WUSCHEL. (B): Ausencia del fragmento de virE en los tejidos posiblemente transformados. (C) Control de carga ADN. Carril 1: marcador molecular de ADN de 1 Kb, carril 2: PCR de ADN plasmídico pER10W-35SRed, carril 3: mezcla, desde el carril 4 hasta el 8: PCR de ADN de plántulas de *C. chinense* cocultivadas con *A. tumefaciens* (C58C1 pER10W-35SRed), carril 9: PCR de ADN de plántula de *C. chinense* no cocultivada. Geles de agarosa al 0.8%, 90 V, 40 minutos.

#### 4.5.3 Activación de WUSCHEL en explantes transformados

#### 4.5.3.1 Explantes con el inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo

Después de llevar a cabo el cocultivo de los segmentos de embrión cigótico de *C. chinense* con *A. tumefaciens* pER10W-35SRed y realizar los lavados respectivos para eliminar la bacteria. El medio de cultivo semisólido

considerado como base, fue el 3R con los antibióticos para eliminar la bacteria (antes descritos). Al medio de cultivo base se le aplicaron varios tratamientos: 1) en presencia del inductor (17  $\beta$ -estradiol), 2) con el disolvente (DMSO), y 3) solo en el medio de cultivo base (ver metodología para detalles). Además se consideraron como testigos explantes infectados con pLH60 y explantes sin infectar, a los cuales se les aplicaron los mismos tratamientos antes mencionados.

Estos tratamientos se mantuvieron en el medio de cultivo semisólido hasta la tercera semana y luego se cambiaron a medio fresco, pero solo se mantuvo la mitad de las repeticiones en lo mismos medios, y la otra mitad se cultivó en el medio base (Figura 4.5.3.1 B).

En la Figura 4.5.3.1 A, se observa que los explantes cocultivados con pER10W-35SRed en presencia de todos los tratamientos, mostraron en la tercera semana menor desarrollo de tejido calloso con respecto a los testigos considerados (sin cocultivo y cocultivados con pLH60).

En la quinta semana, después de cambiar los tratamientos, se evidencia que los segmentos cocultivados con pER10W-35SRed mostraron menor desarrollo de tejido calloso en todos los tratamientos con respecto a los explantes sin infectar e infectados con pLH60 (Figura 4.5.3.1 B).

Los explantes infectados con pLH60 cultivados en los diferentes tratamientos, presentaron desde la tercera semana (Figura 4.5.3.1 A) una mayor cantidad de explantes con tejido calloso (Figura 4.5.3.1 B). Esto con relación a los no infectados o infectados con pER10W-35SRed.

Una de las posibles explicaciones a dicha respuesta puede ser que la D.O.  $_{600 \text{ nm}}$  inicial de ambos cultivos de *A. tumefaciens* fue diferente, a pesar de que los cultivos se realizaron siguiendo la misma metodología. En el caso de pER10W-35SRed tenía D.O.  $_{600 \text{ nm}}$  = 0.876 y para el cultivo con pLH60 fue de 1.473, a pesar de que ambas se diluyeron a una D.O  $_{600 \text{ nm}}$  = 0.2, para realizar la transformación (ver detalles en la metodología).

Cabe mencionar que el DMSO ocasionó un efecto desfavorable en los tejidos cultivados, los cuales presentaron necrosis. Además se observó, una disminución en el número de explantes con tejido calloso, principalmente en los segmentos cocultivados con pLH60. Sin embargo, al eliminar el DMSO del medio de cultivo, el desarrollo de callo aumento en los explantes (Figura 4.5.3.1 B). Los resultados mostrados en la Figura 4.5.3.1 B, se mantuvieron hasta los 90 días.



Figura 4.5.3.1 Explantes de C. chinense cocultivados con A. tumefaciens pER10W-35SRed en presencia del inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo. A: Número promedio ± error estándar de segmentos con desarrollo de callo en los diferentes tratamientos a la tercera semana de evaluación. B: Número promedio ± error estándar de explantes con desarrollo de callo 15 días después de cambiar los tratamientos (quinta semana). n=30, AE= antes en estradiol, ADMSO= antes en DMSO y medio 3R (ANA, AIA y BAP). C= testigo.

#### 4.5.3.2 Explantes tratados por inmersión con el inductor (17 βestradiol)

Se transformaron segmentos de embrión cigótico con pER10W-35SRed y se trataron por inmersión aplicando el inductor, inmersos únicamente en medio MS con DMSO, o sin inmersión. Además se trabajó con explantes transformados con pLH60 y con explantes sin cocultivar, a los cuales se les aplicaron los mismos tratamientos (Figura 4.5.3.2 A-B).

En la tercera semana se observó, que los explantes infectados y sin infectar, inmersos con el estradiol, o solo con medio MS y DMSO, mostraron menor desarrollo de tejido calloso, comparados con los segmentos no inmersos infectados o sin infectar (Figura 4.5.3.2 A). Sin embargo, los explantes infectados con pLH60 y pER10W-35SRed mostraron mayor cantidad de explantes con tejido calloso, en presencia del inductor y del disolvente, con respecto a los no infectados. Cabe mencionar que el medio de cultivo para todos los explantes, consistió en el medio basal MS semisólido más los reguladores de crecimiento (3R) y los antibióticos para eliminar la bacteria.

Los explantes infectados con pER10W-35SRed inmersos en el estradiol, no mostraron un mayor desarrollo del tejido calloso con respecto a los no inmersos (Figura 4.5.3.2 A-B).

#### Evaluación por microscopía de fluorescencia roja

Los explantes de *C. chinense* infectados con pLH60 y pER10W-35SRed se analizaron por fluorescencia, para detectar la presencia de la proteína roja fluorescente (RFP). Cabe mencionar que el gen *dsred* esta bajo el promotor constitutivo 35S en ambos vectores, por lo que la evaluación se realizó independientemente del tratamiento de inmersión aplicado.

En la Figura 4.5.3.2.1 se observa en el inciso A, que los callos infectados con pER10W-35SRed muestran focis y áreas con fluorescencia de mayor intensidad a la observada en los explantes no transformados. En el inciso B se observan los callos transformados y sin transformar a luz visible.

El 73% del tejido calloso transformado con pER10W-35SRed, mostró fluorescencia, así como el 62% del tejido transformado con pLH60 mostró fluorescencia de mayor intensidad. En la Figura 4.5.3.2.3 muestra el número promedio de los explantes con fluorescencia roja.



Figura 4.5.3.2 Explantes de C. chinense cocultivados con A. tumefaciens pER10W-35SRed tratados por inmersión con el inductor (17 β-estradiol). A: Número promedio de segmentos ± error estándar con desarrollo de callo en los diferentes tratamientos a la tercera semana de evaluación. B: Número promedio de explantes con desarrollo de callo en la quinta semana. C= testigo. n=25



Figura 4.5.3.3 Fluorescencia presentada por el tejido calloso de *C. chinense* transformado con pER10W-35S. A: con filtro RFP, B: luz visible. Barra horizontal: 0.1 cm.



Figura 4.5.3.4 Fluorescencia presentada por el tejido calloso de *C. chinense* transformado con pLH60. A: con filtro RFP, B: a luz visible. Barra horizontal: 0.1 cm. En la Figura 4.5.3.4, se observa que los callos de *C. chinense* transformados con pLH60 muestran fluorescencia de mayor intensidad a la observada en el tejido calloso no transformado (inciso A).





#### 4.5.4 Tejido foliar de plántulas transformadas

El tejido foliar infectado con C58 pER10W-35SRed, se indujo por inmersión y se cultivó en medio MS semisólido. Después de 45 días se evaluaron los explantes transformados y no transformados, y ninguno mostró desarrollo morfológico. En el caso de los testigos cultivados en medio MS se desarrollo tejido radicular abundante (explantes no transformados y no inmersos).

# Anexo 2

# Experimentos realizados para regenerar *C. chinense* vía organogénesis o embriogénesis somática

#### (Solis-Ramos, datos no mostrados)

Debido a la falta de un sistema de regeneración *in vitro* para *C. chinense* se realizaron los siguientes experimentos, además se consideró a la vez la respuesta *in vitro* del explante después del cocultivo. Con el objetivo de contar con un sistema que permitiera obtener plántulas regeneradas y posiblemente transformadas.

	Condiciones del cultivo		No. explantes	No.
Experimentos ensayados *	Explante	Reguladores de crecimiento	respuesta sin cocultivo/total	explantes respuesta después cocultivo
1.	Hipocótilos enraizados	5 mg/L BA + 0.3 mg/L AIA MS	0/60	·
2.	Nudos	3.4µM TDZ MS	40/40 40/40	-
3.	Secciones de hipócotilo (45 días)	1.5 mg/L ANA + 3.75 mg/L BAP 1.5 mg/L ANA 3.75 mg/L BAP MS	5/5 callos 5/5 callos 3/5 callo y 1 brote 2/5 raíz	
4.	Mitades de semillas (15 d)	1 mg/L AIA 2 mg/L BAP 2 mg/L BAP+ 1 mg/L AIA 2 mg/L BAP+ 2 mg/L 2,4- D 2 mg/L 2,4-D 2 mg/L BAP+ 1 mg/L AIA 2 mg/L BAP+ 2 mg/L ANA 2 mg/L AIA 2 mg/L ANA	6/30 rad o cot 13/30 10/30 10/30 14/30 14/30 13/30 15/30 17/30 14/30	-
5.	Segmentos	Fruto rolo		

de embrión cigótico (47 días)     2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 4/14 callo       MS     3 germ, 8/14 callo       Fruto naranja 2 mg/L ANA+AIA+BAP     0/14 MS       Pruto pintón 2 mg/L ANA+AIA+BAP     0/14 callo       MS     1 germ, 7/14 callo       MS     1 germ, 9/14 callo       6.     Mitades de semillas     3% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     20 rad, 1 cot 7 rc/30       8% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     500 mg/L cefot+3.4 µM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4 µM     7 rad, 5       15 rad, 5     15 rad, 5     15 rad, 5     15 rad, 5       8.     Segmentos de embrión cigótico (30)     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       6.3     Segmentos de embrión     25 callos y 12 germ/80     -     -       9.     Hipocótilos invertidos     T					
cigótico (47 días)     MS     callo 3 germ, 8/14 callo       Fruto naranja 2 mg/L ANA+AIA+BAP     0/14 MS     0/14       Pruto pintón 2 mg/L ANA+AIA+BAP     0/14       MS     0/14       Fruto pintón 2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       6.     Mitades de semilias     3% sacarosa+2 mg/L 2(4-D     20 rad, 1 cot 7 rc/30       8% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       7.     Hipocótilos (37 d)     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos (37 d)     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos (37 d)     50 mg/L Kan     63 callos/80       6.     Segmentos de embrión cigótico (30)     25 mg/L Kan     63 callos/80       6.     Segmentos de embrión     25 mg/L Kan     48 callos y 3       9.     Tesigo     47 callos y 3     -       9.     Hipocótilos rep     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L 2 emt A0     0/70     -       9.     Hipocóti		de embrión	2 mg/L ANA+AIA+BAP	4 germ, 4/14	
(47 dias)     MS     3 germ, 8/14 callo       Fruto naranja     2 mg/L ANA+AIA+BAP     0/14       MS     0/14       Fruto pintón     2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       MS     1 germ, 9/14       callo     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot semilias       (36 d)     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot 7 rc/30       8% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     7 rad, 5       3.4 μM TDZ     brotes, 29       callos/55     3		cigótico		callo	
Image: Segmentos     Segmentos     Somg/L callos     callo       7.     Hipocótilos     50 mg/L AnA+AIA+BAP     0/14       7.     Hipocótilos     50 mg/L AnA+AIA+BAP     2 germ, 7/14 callo       7.     Hipocótilos     50 mg/L AnA+AIA+BAP     20 rad, 1 cot, 7 rc/30       8% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     8% sacarosa (testigo)       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     50 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     50 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     50 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       9.     TDZ     brotes, 29     callos/55       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       9.     10 mg/L Kan     49 callos y 3     -       9.     100 mg/L Kan     25 callos y 3     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70     -       9.     Hipocótilos<		(47 días)	MS	3 germ, 8/14	
Fruto naranja 2 mg/L ANA+AIA+BAP     0/14       MS     0/14       Fruto pintón     2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       6.     Mitades de semilias     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot, 7 rc/30       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30     -       2,4-D     14 rad/30     -       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30     -       9% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30     -       2,4-D     18 rad/30     -       10% sacarosa+2 mg/L     24 rad/30     -       8% sacarosa (testigo)     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11     -       TDZ     brotes, 29     callos/55     -     -       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       6     germ/80     -     -     -     -       16 expl/5     100 mg/L Kan     25 callos y 12     -     - </th <th></th> <th></th> <th></th> <th>callo</th> <th></th>				callo	
2 mg/L ANA+AIA+BAP MS     0/14 0/14       Fruto pintón 2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       6.     Mitades de semilias     3% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     20 rad, 1 cot 7 rc/30     -       6.     Mitades de semilias     3% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     20 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     14 rad/30     -     -       8% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     24 rad/30     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11     -       7.     Hipocótilos     50 mg/L Kan     63 callos/55     -       8.     Segmentos de embrin cigótico (30 d)     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     25 callos y 3 germ/80     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     -     1/70 brain			Fruto naranja		
MS     0/14       Fruto pintón     2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo     1 germ, 9/14       6.     Mitades de semilias     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot     -       36.     Mitades de semilias     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot,     -       7.     Kascarosa (testigo)     9 rad, 1 cot,     -     7 rc/30       8% sacarosa (testigo)     14 rad/30     8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30     8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30     8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     10% sacarosa (testigo)     18 rad/30     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     10% sacarosa (testigo)     18 rad/30     14 rad/30       10% sacarosa (testigo)     10% sacarosa (testigo)     18 rad/30     14 rad/30       10% sacarosa (testigo)     10% sacarosa     18 rad/30     14 rad/30       10% sacarosa (testigo)     500 mg/L Kan     63 callos/55     15 rad, 5       100 mg/L Kan     63 callos/			2 mg/L ANA+AIA+BAP	0/14	
Fruto pintón     2 mg/L ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       6.     Mitades de semillas     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot     -       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot,     -     -       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot,     -     -       8/* sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot,     -     -     -       8/* sacarosa (testigo)     14 rad/30     2,4-D     14 rad/30     -       8/* sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       8/* sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       10% sacarosa+2 mg/L     24 rad/30     -     -     -       8/* sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       10% sacarosa (testigo)     10     -     -     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 29     -     -     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 9     -			MS	0/14	
2     rg/L     ANA+AIA+BAP     4 germ, 7/14 callo       6.     Mitades de semillas (36 d)     3% sacarosa+2 mg/L 2,4-D     20 rad, 1 cot /30     -       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa (testigo)     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa+2 mg/L 2,4-D     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     10 mg/L cefot+3.4 µM     7 rad, 11       -     TDZ     brotes, 29     callos/55       8.     Segmentos de embrión cigótico (30 d)     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       16 expl/5 rep     100 mg/L Kan     25 callos y 3 germ/80     -     -       9.     14 pocótilos invertidos			Fruto pintón		
6.     Mitades de semillas     3% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     20 rad, 1 cot /30     -       (36 d)     3% sacarosa+2 mg/L 3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, /30     -       8     Secarosa+2 mg/L 2.4-D     14 rad/30     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -       10% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     24 rad/30     -     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -       10% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     24 rad/30     -     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11     -       (37 d)     TDZ     brotes, 29     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 42     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 42     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 9     -     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 19     -     -     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 19     - <td< th=""><th></th><th></th><th>2 ma/L ANA+AIA+BAP</th><th>4 germ, 7/14</th><th></th></td<>			2 ma/L ANA+AIA+BAP	4 germ, 7/14	
MS     1 germ, 9/14 callo       6.     Mitades de semillas     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot /30     -       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30     -       2,4-D     14 rad/30     -       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     500 mg/L Kan     63 callos/80       6     3.4 µM TDZ     brotes, 29     callos/55       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       de embrión     50 mg/L Kan     49 callos y 3     -       de embrión     75 mg/L Kan     48 callos y 3     -       16 expl/5     rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12     germ/80				callo	
6.     Mitades de semillas     3% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     20 rad, 1 cot /30     -       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -     -       8% sacarosa+2 mg/L 2.4-D     14 rad/30     -     -     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11     -     -       (37 d)     TDZ     brotes, 29     -     callos/55     -       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       cigótico (30     germ/80     -     -     -       de embrión     50 mg/L Kan     48 callos y 3     -     -       16 expl/5     rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12     germ/80       7     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70			MS	1 germ, 9/14	
6.     Mitades de semillas     3% sacarosa+2 mg/L     20 rad, 1 cot /30     -       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -     -       8% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30     -     -     -       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30     -     -     -       2.4-D     14 rad/30     -     -     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       10% sacarosa +2 mg/L     24 rad/30     -     -     -       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30     -     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11     -     -       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 5     -     -     -       3.4 μM TDZ     brotes, 29     callos/55     -     -     -     -       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -     -     -				callo	
Att matched     2,4-D     /30       (36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa+2 mg/L     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       TDZ     callos/55     15 rad, 5     15 rad, 5       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       cigótico (30     germ/80     -     -     germ/80       rep     100 mg/L K	6.	Mitades de	3% sacarosa+2 mg/L	20 rad. 1 cot	
(36 d)     3% sacarosa (testigo)     9 rad, 1 cot, 7 rc/30       8% sacarosa +2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa +2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa+2 mg/L     2,4-D       2,4-D     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       (37 d)     TDZ     brotes, 29     callos/55       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       cigótico (30     germ/80     -     -       de embrión     50 mg/L Kan     49 callos y 3     -       cigótico (30     germ/80     -     -       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3     -       16 expl/5     rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12     -       germ/80     Testigo     47 callos y 3     -     -       9.     Hipocótilos	0.	semillas	2.4-D	/30	
(cold)     Orocentical (cold)     Tric/30       8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa+2 mg/L     2,4-D       2,4-D     18 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa+2 mg/L     2,4-D       2,4-D     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     10       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       70/37 d)     TDZ     brotes, 29     callos/55       15 rad, 5     15 rad, 5     15 rad, 5     15 rad, 5       3.4 μM TDZ     brotes, 42     callos/55     15       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       cigótico (30     germ/80     -     -       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3     -       16 expl/5     rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12     -       germ/80     Testigo     47 callos y 3     -     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L		(36 d)	3% sacarosa (testigo)	9 rad. 1 cot.	
8% sacarosa+2 mg/L     14 rad/30       2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     24 rad/30       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       (37 d)     TDZ     brotes, 29       callos/55     15 rad, 5     15 rad, 5       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80       de embrión     50 mg/L Kan     49 callos y 9       cigótico (30     germ/80       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3       16 expl/5     germ/80       rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12       germ/80     Testigo     47 callos y 3       germ/80     Testigo     47 callos y 3       germ/80     Testigo     27 mg/L ANA		(00 0)		7 rc/30	
2,4-D     14 rad/30       8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa +2 mg/L     2,4-D       2,4-D     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     24 rad/30       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11       7.     TDZ     brotes, 29     callos/55       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       64 embrión     50 mg/L Kan     49 callos y 9     -       cigótico (30     germ/80     -     -       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3     -       16 expl/5     germ/80     -     -       rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12     -       germ/80     -     -     -     -       9.     Hipocótilos     T1			8% sacarosa+2 mg/l	14 rad/30	
8% sacarosa (testigo)     18 rad/30       10% sacarosa+2 mg/L     24 rad/30       2,4-D     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     24 rad/30       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       7.     TDZ     brotes, 29     callos/55       8.     Segmentos     25 mg/L Kan     63 callos/80       64 embrión     50 mg/L Kan     49 callos y 9       cigótico (30     germ/80     -       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3       16 expl/5     rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12       germ/80     Testigo     47 callos y 3     germ/80       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70			2 4-D	14 rad/30	
10% sacarosa +2 mg/L     24 rad/30       2,4-D     24 rad/30       8% sacarosa (testigo)     7 rad, 11       7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4µM     7 rad, 11       (37 d)     TDZ     brotes, 29       callos/55     15 rad, 5       3.4 µM TDZ     brotes, 42       callos/55     15 rad, 5       8.     Segmentos       cigótico (30     germ/80       de embrión     50 mg/L Kan       63 callos y 9     -       cigótico (30     germ/80       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3       16 expl/5     rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12       germ/80     Testigo     47 callos y 3     germ/80       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70     -			8% sacarosa (testigo)	18 rad/30	
10 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0 / 0 /			10% sacarosa+2 mg/l		
8% sacarosa (testigo)     7.     Hipocótilos     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11     -       (37 d)     TDZ     brotes, 29     callos/55     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -     -<			2 4-D	24 rad/30	
7.     Hipocótilos (37 d)     500 mg/L cefot+3.4μM     7 rad, 11     -       (37 d)     TDZ     brotes, 29     callos/55     -       8.     Segmentos de embrión cigótico (30     25 mg/L Kan     63 callos/80     -       4)     75 mg/L Kan     63 callos y 9     -     -       16 expl/5     100 mg/L Kan     25 callos y 12     -       germ/80     Testigo     47 callos y 3     -       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     0/70     -			8% sacarosa (testigo)		
(37 d)   TDZ   brotes, 29     (37 d)   TDZ   brotes, 29     (allos/55   15 rad, 5     15 rad, 5   15 rad, 5     8.   Segmentos   25 mg/L Kan     63 callos/80   -     de embrión   50 mg/L Kan   63 callos/80     cigótico (30   germ/80     d)   75 mg/L Kan   48 callos y 3     16 expl/5   germ/80     rep   100 mg/L Kan   25 callos y 12     germ/80   Testigo   47 callos y 3     germ/80   Testigo   47 callos y 3     germ/80   T2   11: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     9.   Hipocótilos   T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L   0/70     invertidos   Zeatina + 0.2 mg/L ANA   1/70 brate	7	Hipocótilos	500 mg/L cefot+3 4uM	7 rad. 11	
(a) (b) (b)     1.2.2     callos/52       callos/55     15 rad, 5       15 rad, 5     15 rad, 5       brotes, 42     callos/55       callos/55     15 rad, 5       8.     Segmentos     25 mg/L Kan       de embrión     50 mg/L Kan     49 callos y 9       cigótico (30     germ/80       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3       16 expl/5     germ/80       rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12       germ/80     Testigo     47 callos y 3       germ/80     Testigo     47 callos y 3       germ/80     75 mg/L ANA     0/70		(37 d)		brotes, 29	
8.     Segmentos de embrión cigótico (30 d)     25 mg/L Kan     63 callos/80 49 callos y 9 germ/80     -       40     75 mg/L Kan     49 callos y 9 germ/80     -       16 expl/5     germ/80     -       rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12 germ/80       9.     Hipocótilos invertidos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     0/70		(0, 0)		callos/55	
3.4 μM TDZ     brotes, 42 callos/55       8.     Segmentos de embrión cigótico (30 d)     25 mg/L Kan     63 callos/80 - 49 callos y 9 germ/80       d)     75 mg/L Kan     49 callos y 9 germ/80       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3 germ/80       16 expl/5 rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12 germ/80       9.     Hipocótilos invertidos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     0/70 -				15 rad, 5	
8.     Segmentos de embrión cigótico (30 d)     25 mg/L Kan     63 callos/80 49 callos y 9 germ/80 d)     -       d)     75 mg/L Kan     49 callos y 9 germ/80 d)     -     -       d)     75 mg/L Kan     48 callos y 3 germ/80 rep     -     -       16 expl/5 rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12 germ/80     -       9.     Hipocótilos invertidos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     0/70 -     -			3 4 µM TDZ	brotes, 42	
8.     Segmentos de embrión cigótico (30 d)     25 mg/L Kan     63 callos/80 49 callos y 9 germ/80 d)     -       d)     75 mg/L Kan     49 callos y 9 germ/80 d)     -     -       16 expl/5     germ/80 rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12 germ/80     -       9.     Hipocótilos invertidos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA     0/70     -			0 p	callos/55	
de embrión cigótico (30 d)   50 mg/L Kan   49 callos y 9 germ/80     d)   75 mg/L Kan   48 callos y 3 germ/80     16 expl/5   germ/80     rep   100 mg/L Kan   25 callos y 12 germ/80     9.   Hipocótilos   T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA   0/70     9.   Hipocótilos   T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA   0/70	8	Segmentos	25 mg/L Kan	63 callos/80	-
cigótico (30   germ/80     d)   75 mg/L Kan   48 callos y 3     16 expl/5   germ/80     rep   100 mg/L Kan   25 callos y 12     germ/80   Testigo   47 callos y 3     germ/80   Testigo   47 callos y 3     germ/80   T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L   0/70     invertidos   zeatina + 0.2 mg/L ANA   1/70 brate	0.	de embrión	50 mg/L Kan	49 callos v 9	
d)   75 mg/L Kan   48 callos y 3     16 expl/5   germ/80     rep   100 mg/L Kan   25 callos y 12     germ/80   Testigo   47 callos y 3     germ/80   Testigo   47 callos y 3     germ/80   T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L   0/70     invertidos   zeatina + 0.2 mg/L ANA   1/70 brate		cigótico (30	00	germ/80	
of     rep     100 mg/L Kan     germ/80       16 expl/5     100 mg/L Kan     25 callos y 12       germ/80     Testigo     47 callos y 3       germ/80     11: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70       invertidos     zeatina + 0.2 mg/L ANA     1/70 brate		d)	75 mg/L Kan	48 callos v 3	
rep     100 mg/L Kan     25 callos y 12 germ/80       7     25 callos y 12 germ/80       9.     Hipocótilos     T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L     0/70       invertidos     zeatina + 0.2 mg/L ANA     1/70 brate		16 expl/5		germ/80	
9. Hipocótilos T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L 0/70   invertidos zeatina + 0.2 mg/L ANA		rep	100 mg/L Kan	25 callos y 12	
Testigo 47 callos y 3 germ/80   9. Hipocótilos T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L 0/70   invertidos zeatina + 0.2 mg/L ANA 1/70 broto				germ/80	
9. Hipocótilos T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L 0/70   invertidos zeatina + 0.2 mg/L ANA			Testigo	47 callos v 3	
9. Hipocótilos T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L 0/70 - invertidos zeatina + 0.2 mg/L ANA				germ/80	
invertidos zeatina + 0.2 mg/L ANA	9.	Hipocótilos	T1: 1 mg/L BAP+ 2 mg/L	0/70	-
		invertidos	zeatina + 0.2 mg/L ANA		
(15 glas)   12; 2 mg/L BAP+ 2 mg/L   1/10 prote		(15 días)	T2: 2 mg/L BAP+ 2 mg/L	1/70 brote	
5 expl/12 zeatina + 0.2 mg/L ANA		5 expl/12	zeatina + 0.2 mg/L ANA		
rep T3: 3 mg/L BAP+ 2 mg/L 0/70		rep	T3: 3 mg/L BAP+ 2 mg/L	0/70	
Eval: 70 d zeatina + 0.2 mg/L ANA		Eval: 70 d	zeatina + 0.2 mg/L ANA		

		T4: MS+ 2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA	0/70	
10.	Hoja cotiledonar (20 días) 35 ex/7 rep	2 mg/L 2, 4-D	35/35 callos	•
11.	Segmentos	1.5 mg/L 2. 4-D.	0/60	0
	de	2 mg/L 2, 4-D,	0/60	0
	hipocótilo (35 días) (12 exp/5 rep)	2.5 mg/L 2, 4-D	20/60 callos y 5/20 embriones	0
12.	Segmentos	1.5 mg/L 2, 4-D,	0/25	0
	de	2 mg/L 2, 4-D,	0/25	0
	hipocótilo	2.5 mg/L 2, 4-D	0/25	0
	(25 días) 5 exp/5 rep	MS	0/25	0
13.	Segmentos de hipocótilo (20 días) 5 expl/24 repet	2 mg/L 2, 4-D	120/120 callos y 20/120 embriones	0
14.	Segmentos de embrión cigótico 20 rep/5	A los 30 días: 4.5 mg/L BAP + 2 mg/L ANA (UBBMP)	10 cot, 32 callos/50	
	expl 30/5 MS	4.5 mg/L BAP + 2 mg/L ANA (TEC)	13 cot, 3 rad, 18 callos/50	
		2 mg/L ANA +2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP (UBBMP) 2 mg/L ANA +2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP (TEC)	5 cot, 1 rad, 22 callos/50 12 cot, 4 rad, 22 callos/50	
		MS (UBBMP)	26 cot, 8 rad, 7 callos/75	
		MS (TEC)	24 cot, 6 rad, 8 callos/75	
15.		A los 90 dias: 4.5 mg/L BAP + 2 mg/L ANA (UBBMP)	2 cot, 3 rad, 33 callos, 4	

			brote	
		4.5 mg/L BAP + 2 mg/L ANA (TEC)	6 cot, 1 rad, 37 callos	
		2 mg/L ANA +2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP (UBBMP)	1 cot, 5 rad, 25 callos, 4 embriones, 3 brotes	
		2 mg/L ANA +2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP (TEC)	24 cot, 3 rad, 24 callos	
		MS (UBBMP)	14 cot, 2 rad, 13 callos, 8	
		MS (TEC)	brotes 9 cot, 6 rad, 8 callos	
16.	Segmentos de embrión cigótico 5 expl/15	2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP (UBBMP)	52 callos, 4 exp (34 embriones), 2 expl(5 brotes)/75	-
	(07-09/06) 90 d	2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP (UB)	38 callos, 2 expl (16 brotes)/75	
17.	Segmentos de embrión cigótico 5 expl/10 repe (18-09/06) 55 d	2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP 4.5 mg/L BAP + 2 mg/L ANA	1 cot, 5 rad, 24 rad, 1 ex (5 embr)/55 2 cot, 3 rad, 33 callo, 2 embrión, 1	-
	65 U	MS	7 cot, 3 rad, 12 callo, 9 brotes/55	
18.	Segmentos de embrión cigótico 8 expl/3	Fruto verde (Dra. Sarita) 2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP 4 5 mg/L BAP + 2 mg/L	1 cot, 15 callos/24	-
	(19-10/06) 60 d	ANA	callos/24 1 cot, 7 rad, 2	

		MS	callos/24	
19.	Segmentos de embrión cigótico 09-02-08 20 repe/5 expl	Aérea: 2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP Basal: 2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP	<b>Eval: 75 días</b> 79 callos/100 63 callos/100	-
20.	Segmentos de embrión cigótico Inoculados LBA4404 41 rep/10 exp Sin inocular 15 rep/10 expl 18-02-07	2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP+500 mg/L cefotaxima+ 150 mg/L Kan 34 d después 2 mg/L ANA + 2 mg/L AIA + 2 mg/L BAP+1 g/L cefotaxima+ 500 mg/L timentina+150 mg/L Kan	Eval (68 d) Sin inocular: 5 cot, 1 rad, 49 callos, 5 plantas/150	Eval (68 d) Inoculados: 13 cot, 6 rad 55 callos, 40/410 plantas
21.	Hipocótilo 7 exp/13 rep 06-03-07	2 mg/L 2,4-D	0 respuesta	-
22.	Segmentos de embrión cigótico (Basal) 5 exp/33 rep (03-03-07)	4.5 mg/L BAP+ 2 mg/L ANA	Eval: 60 días 122 callos, 6 brotes/165	
23.	Segmentos de embrión cigótico Inoculados 173 Sin Inocular 118 expl 07-03-07	4.5 mg/L BAP+ 2 mg/L ANA+ 500 mg/L cefotaxima MS+500 mg/L cefotaxima 75 d depues + 150 mg/L kn	Eval: 48 días 2 cot, 5 rad, 0 callos, 15 cot, 15 rad, 12 callos, 5 brotes	
24	Segmentos		Eval: 60 días	Eval: 60 días

.

	de embrión		3R Sin inocular:	3R
	cigótico	2 mg/L ANA + 2 mg/L	3 cot, 2	Inoculados: 3
	pER10W-	AIA + 2 mg/L BAP+ 1 g/L	callo+rad, 4	cot, 3 rad, 2
	35SRed	cefotaxima+ 500 mg/L	callo, 14 rad, 6	callo, 2
	Inoculados	timentina	brote, 1	brotes/200
	200 exp		embrion/100	
	Sin	4.5 mg/L BAP+ 2 mg/L	Sin inocular:	BAP
	inocular	ANA+ 1 g/L cefotaxima+	5 cot, 4 rad, 1	Inoculados:
	100 expl	500 mg/L timentina	callo, 1 brote, 1	1, rad, 13
	19/04/07		embrión	brotes/200
25.	Segmentos		Sin inocular No.	Inoculados
	de embrión		plantas	No. plantas
	cigótico	2 mg/L ANA + 2 mg/L	1. C: 4/25	1. C: 2/25
	pER10W-	AIA + 2 mg/L BAP más	2. C+CI: 1/25	2. C+CI: 0/25
	35SRed	antibióticos	3. C+T: 3/25	3. C+T: 5/25
	(70 d)		4. T: 3/25	4. T: 8/25
	Inoculados		5. T+CI: 5/25	5. T+CI: 2/25
	5 rep/5 expl		6. C+T+C1: 3/25	6. C+T+CI:
	Sin		7.MR: 5/25	3/25
	inocular		8: C+MR: 7/25	7. MR: 2/25
	5 rep/5 expl		9: Testigo: 0/25	8: C+MR:
				1/25
	25-05-07			9: Testigo:
				0/25
26.	Segmentos		Eval- 35 días:	
	de embrión	100 mg/L Kan	14 rad, 3 cot, 3	
	cigótico		callos/30	
	(11-06-07)	150 mg/L Kan	23 rad, 2 cot, 1	
	6 rep/5 expl		callo/30	
	1	200 mg/L Kan	16 rad, 2 cot, 3	
			callo/30	
		250 mg/L Kan	16 rad, 2 cot, 5	
			callos/30	
		300 mg/L Kan	18 rad, 3	
		Testigo	callos/30	
			1 cot, 20	
			callos/30	
27.	Segmentos	100 mg/L Kan+ 1 g/L C+	KSB: 21 rad, 15	KI: 11 rad, 3
	de embrión	500 mg/L T	cot/50	cot/100
	cigótico		SB: 7 rad, 3	l: 6 rad, 6
	Inoculados		cot/50	cot/100
	20 rep/5		INFSB: 14 rad,	INF: 6 rad, 4

expl	16 cot	cot/100
Sin inocular	KINFSB: 6 rad,	KINF: 10 rad,
10 rep/5	12 cot	9 cot/50
exp		

**Abreviaturas:** AIA: Ácido indolacético, ANA: Ácido naftalenacético, BAP: 6-Bencil amino purina, cot: cotiledones, C: cefotaxima, CI: cloro, Eval: evaluación, expl: explantes, Germ: germinación, Kan: kanamicina, KINF: infectado y con kanamicina, KINFSB: Infectado sin bacteria y con kanamicina, KI: Infectado y con kanamicina, KSB: sin bacteria y con kanamicina, INF: infectado, INFSB: Infectado sin bacteria, MR: meropenem, MS: Murashige Skoog, 2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, TDZ: tidiazuron, rep: repetición, rad: radícular, T: timentina, SB: sin bacteria, 3R: ANA, AIA y BAP.

A partir de segmentos de embrión cigótico cultivados en medio MS con 2 mg/L ANA, AIA y BAP (3R), el cual fue sugerido por la Dra. Sara Nahuath, del Instituto Tecnológico de Mérida (ITM), Yucatán, México. Debido este medio de cultivo ha permitido obtener plántulas *in vitro* a partir de embriogénesis somática indirecta en algunas especies de orguídeas (Nauath, 2001)* y de *C. chinense*.

## BIBLIOGRAFÍA

* Nahuath, S (2001). Embriogénesis somática en 3 especies de orquídeas: *Cattleyopsis lindenii, Myrmecophila tibicinis y Laelia rubescens.* Tesis de doctorado. Instituto Tecnológico de Mérida, Mérida, Yucatán, México.

# **ANEXO 3**

# Análisis Southern blot (Amersham Biosciences, 2002)

#### A-3.1 ANÁLISIS CLUSTALW

Se realizó un alineamiento con el software ClustalW2, de la secuencia de *WUSCHEL* de *A. thaliana* con la secuencia de *WUSCHEL* de *Lycopersicum esculetum*, encontradas en el GenBank; debido a que la secuencia de *WUSCHEL* de *C. chinense* no ha sido reportada. Se consideró a *Lycopersicum esculetum*, debido a que ambas especies son de la misma familia, lo que permitiría identificar posibles sitios conservados en la secuencia de *WUSCHEL* de *A. thaliana*.

Wuenhell	
Transmontation	
PAGGhera year	
Fuschel	GCGGCAACAACAACAACAAGTCCGGCTCT99T9GTTACAC9T9TCGCCAGACCAGCACGA
Lycopersicum	ACATAGAAGATGGTGAAAAAATAGTAACAAGTTTCCTGTGCAGGCAAAGTAGTAGCC
	* * * * * *** * *** * ** *
Wangha!	00902373770377337723339773333877873333237797377577573733738
waretres	
Lycoperatcus	GTTGGALGCCAALGAACGATCAGATAAGAATATTGAAGGATCTCTACTACAACAATGGAG
Wuschel	TCCGGTCACCAACAGCCGATCAGAACAGCTGCAGACAGCTGCAGACAGTTCGGAA
Lycoperatown	TINGTCTCTBACTGCTGBACKGETTCCGGAGATATCTGCTBAGTTGBGBCAGTACGCTB
-,	
Wuschel	REATTGROOOCRAGAACGTCTTTTACTGGTTCCAGRACCATRAGGCTCGTGAGCGTCAGA
Lycopersicum	AGATTGAAGGCAAAAATGTGTTTTATTGGTTTCAGAACCATAAAGCTCGTGAAAGACAAA
	******* ***** ** ** ***** ***** *******
Wuschel	AGAAGAATTCARCOGAACAAAC
Luconeraioun	
aycoperatous	
Wuschel	TCOUTATORTO-COCCERCONTCATERED-TCCTCEACTEC-ACCATCA
Lycopersicum	TOATTCCACATCTTTGGAGATCTCCTQATGATCACCACAAGTACAACACTGCTACTACTA
Thursday 1	
webcher	
rycopersious	ATOCASSTUTCCASTUTCCATCACATCACATCACATGOSUTATIASCASTUTTAC-ACACT
Wuschel	TARCCARGACCATCATCTCTATCATCATAACAAGCCATATCCCAGCTTCAATAACG
Lycopersicum	GGAAACTRTGGTTATGGAACTTTGGCTATGGAGAAGACCTTTAGGGAG7GTTCAATATCA
Marshall .	
WUNCHET	GGAAT I FAATLATICANAL TCANOTAC TOTAL GIGT OT TOTTAL GCT CTAATGOCT
Lycoperaicum	CCACCAGGTGGTAGTATCATCAAR-ATTTGACATGG-GTTGGTGTTGATCCTTACAACA
Wuschel	ACATGAGIAGC-CATGICTATGGATCIATGGAACAAGACTGTTCTATGAATT
Lycopersicum	ATATGAGTACTACTTCCCAGCAACTTACCCTTTTCTTGAAAAAAGCAACAACAACAACA
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
Wuenhel	
Timone and own	
Lycoperatoun	
Wuschel	CACCTTACAACTTCTTCGATAGASCARAGCCTCTCTTTGGTCTAG
Lycopersicum	TAGAAACTCTGTCACTTTTCCCCATGCATGAAGAGAACATCATCTCAAATTTCTGCATCA
	* * * **** * * * *** *** *** ***
March al	
- decider	A DECEMBER OF A
Lycopersicum	AACATCATGAATCTTCTGAGGGATGGTACCATTCTGATAATAACAATTTGGCTGCTCTTG
	** **** ** * ** * * ** ** ** **
Wuschel	ACGYACGCTTCCTCTCTCCCTATGCACGGTGARGATCACATCAACGGTGGTAGTG
Lycopersicum	ARCTTACTCICARCTCTTTCCCCCTARATTATGRACTAGTCTATCTTATGTTTGTAGTAGA
-	
Munch al	
wuschel	
Lycopersicum	TARGIACTRATCIARTTIGGTATGTOCCRAGCT~~ATTTGGACCTTATGGTAATGTTART
	** * * * ***** * * ** * **** * * * * * *
Wuschel	
Lucopersion	TARTCTTRATCTARGETGTACTARTATTATTATTARTTARTARGATTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCARTAGCA
-looberered	
Wuschel	······································
Lycopersicum	
	1

Figura A-3.1 Alineamiento de la secuencia de WUSCHEL de A. thaliana con la de WUSCHEL de Lycopersicum esculetum.

#### A-3.2 SITIOS DE RESTRICCIÓN DE WUSCHEL

Seguidamente se identificaron los sitios de restricción presentes en la secuencia de WUSCHEL de A. thaliana, empleando el programa disponible en internet NEBcutter. Se seleccionaron las enzimas de restricción: Dral y Haelll, ya que permitieron liberar un fragmento conservado en la secuencia de A. thaliana (ver análisis ClustalW2), el cual se empleó como sonda en el análisis de southern blot.



Figura A-3.2 Sitios de restricción identificados en la secuencia de WUSCHEL de A. thaliana.

## A-3.3 DIGESTIÓN DE WUSCHEL CON Dral y Haelli

A continuación se presenta el gel de agarosa correspondiente a la digestión de ADN de WUSCHEL con las enzimas Dral y HaelII. La banda de 300 pb corresponde al fragmento purificado y marcado con Alkaphos como sonda.



Figura A-3.3. Digestión de ADN de WUSCHEL con Dral y Haelll. Carril 1: marcador de 1 Kb, carril 2: sin carga, carril 3: ADN digerido. Gel de agarosa al 0.8%, 90V, 40 min.

#### A-3.4 SOUTHERN BLOT

Southern blot de las plantas regeneradas y transformadas *in vitro*, con el gen *WUSCHEL* de *A. thaliana*.



Figura A-3.4. Southern blot de C. chinense transformado con el gen heterólogo WUSCHEL de A. thaliana. A: Gel de transferencia, B: Film de revelado con exposición de 1 h. Carril 1: marcador 1 Kb, 2: dilución plásmido, carril 4: ADN planta transformada, carril 5: Digestión HindIII planta transformada, carril 6: sin carga, carril 7: Digestión HindIII planta no transformada, carril 9: sin carga, carril 10: ADN pBin.

# Capítulo 5

## Overexpression of WUSCHEL in Capsicum chinense causes ectopic morphogenesis

*Este capítulo fue aceptado para su publicación en la revista Plant Cell, Tissue & Organ Culture. DOI 10.1007/s11240-008-9485-7

#### 5.1 ABSTRACT

Capsicum chinense is a recalcitrant species for *in vitro* morphogenesis, and up to date there is no efficient system for genetic transformation and regeneration of this species via somatic embryogenesis. Here, we carried out an *in vitro* transformation of *C. chinense* via *Agrobacterium tumefaciens* cocultivation with a system that expresses the heterologous gene *WUSCHEL* from *Arabidopsis thaliana. WUSCHEL* has been shown to promote the transition from vegetative to embryogenic state when overexpressed. We tested if the expression of *WUSCHEL* in *C. chinense* would promote an embryogenic response in this species. After 15 days of induction, the segments of transformed stems begun to form globular structures, suggesting that heterologus *WUSCHEL* was active and involved in the process of morphogenesis.

#### 5.2 KEYWORDS

Capsicum chinense, recalcitrant species, genetic transformation, A. tumefaciens, WUSCHEL, 17  $\beta$ -estradiol, ectopic morphogenesis.

#### 5.3 ABBREVIATIONS

BAP: 6-Benzylaminopurine; IAA: indoleacetic acid; NAA: Naphthaleneacetic acid; MS: Murashige and Skoog; PCR: polymerase chain reaction; SDS: sodium dodecyl sulfate; 3R: BAP+IAA+NAA.

#### 5.4 INTRODUCTION

Genetic transformation via Agrobacterium tumefaciens has been carried out successfully for many plant species (Herrera-Estrella et al., 2004). Since the first report for genetic transformation of Capsicum spp in 1990 until know estable transformation of this genera has been proven difficult, inefficient and unreproducible for many species of the genera (Liu *et al.*, 1990; Yu-Xian *et al.*, 1996; Manoharan *et al.*, 1998; Mihalka *et al.*, 2000; Venkataiah *et al.*, 2001; Ochoa-Alejo and Ramirez-Malagon, 2001; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002a; Cai *et al.*, 2003; Shivegowda *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002b; Mihalka *et al.*, 2003; Dabauza and Peña, 2003; Li *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). The main problem for this is the recalcitrant quality of the species making regeneration and genetic transformation *in vitro* difficult (Mihalka *et al.*, 2000).

However some success has been obtain with *Capsicum annuun* transformed with genes from the coat protein of the cuccumber mosaic virus (*CMV-CP*) (Yu-Xian *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2002a; Zhu *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2002, Cai *et al.*, 2003), or the coat protein of tomato mosaic virus (*TMV-CP*) (Cai *et al.*, 2003), or *Tsi1* gene (tobacco stress-induced gene 1) (Shin *et al.*, 2002b) which shown resistance to either cucumber mosaic virus (*CMV*), pepper mild mottle virus (*PMMV*), bacterial (*Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria) or fungal pathogens (oomycete, *Phytophtora capsici*) which represents an improvements for this susceptible cultivars in which *C. chinense* is also a very succeptible species.

In this study we carried experiments to obtain *in vitro* transformed plants of *C. chinense* via *Agrobacterium tumefaciens*. Since *C. chinense* is a recalcitrant species to *in vitro* morphogenesis (Santana-Buzzy *et al.*, 2005; López-Puc *et al.*, 2006). The heterologous gene *WUSCHEL* was chosen to improve the recalcitrant quality of the species. Previous overexpresion in *Arabidopsis thaliana and Coffea canephora* promoted the vegetative to embryogenic transition and eventually lead to somatic embryo formation (Zuo *et al.*, 2002; Arroyo-Herrera *et al.*, 2008). Transform segments of mature zygotic embryo of *C. chinense* via *A. tumefaciens* were carried out. The transformed chimeric plants with heterologous gene *WUSCHEL* where used for induction. Segments of transformed stems showed that the heterologous gene would induce the formation of globular structures with larger nucleous tipical of meristem cells.

#### 5.5 MATERIALS AND METHODS

#### 5.5.1 In vitro regeneration

The surface of *C. chinense* fruits was washed with destilled water and 5% SDS solution, followed by immersion in 70% ethanol for 30 seconds and rinsed two times with sterile destilled water before placing it in a commercial solution of sodium hypochlorite at 35%. After 20 minutes the fruits were rinsed with sterile destilled water. The seeds (mature zygotic embryos) were excised from fruits and cut in four pieces. Every segment was used immediately as an explant.

The explants were cultured in MS medium (Murashige and Skoog, 1962) added with sucrose 3% (w/v), growth regulators (3R: 8.9  $\mu$ M NAA, 11.4  $\mu$ M IAA,

and 8.9  $\mu$ M BAP), 55.49  $\mu$ M myo-inositol, 0.41 mM nicotinic acid, 0.24 mM pyridoxol-HCL, glycine and 29.65  $\mu$ M thiamine-HCL. The medium was solidified with gelrite 0.25% (w/v). The pH was adjusted to 5.8 just before being sterilised by autoclaving (121°C, 20 min). The cultures were incubated at 25 ± 2°C, under a 16 h light/8 h dark (40-50  $\mu$ mol/m² s¹) photoperiod. The composition of medium remained unchanged through the test.

#### 5.5.2 The binary vector for transformation

The disarmed Agrobacterium tumefaciens C58C1 carrying the binary vector pER10W-35SRed (Canche-Moo et al., 2006) was used to transform C. chinense. The binary vector pER10W-35SRed, contains the DsRFP reporter gene under the 35S constitutive promoter and the gene WUSCHEL under an estradiol inducible promoter (Zuo et al., 2002). The vector was generated by subcloning the gene DsRFP from pRSETB-RED that contain the DsRFP in EcoRI-BamHI (Donated by Meredith Gould, Ens Baja California). DsRFP gene was removed from pRSETB-RED by digesting the plasmid with Xbal, followed by a fill in reaction with Klenow fragment and subsequent HindIII restriction digestion. The plasmid pCD was used as it contains a 35S promoter sequence (Gallie et al., 1989). The pCD plasmid was digested with Sall followed by a fill in reaction with Klenow fragment and a subsequent HindIII restriction digestion. The DsRed containing DNA was ligated into the digested pCD plasmid with T4 ligase for 8 h at 15°C. The 35S-DsRFP DNA fragment was obtained by digesting Smal and Sacl from the new vector named pCD-35SRed. This DNA was subcloned into pER10W donated by Chua NH (Rochefeller University) by digesting pER10W with Spel. The ligation reaction was carried out after fill-in with DNA polymerse I (Klenow fragment, Invitrogene Life Technologies). The resulting plasmid pER10W-35SRed allows the expression WUSCHEL from Arabidopsis thaliana as well as a visual preselection of the transform tissue by the expression of RFP.

#### 5.5.3 Activation of strains

The Agrobacterium C58C1 (pER10W-35SRed) cells were cultured in 20 ml of liquid Luria-Bertani (LB) medium (10 g/L triptone, 5 g/L NaCl, 5 g/L yeast extract) containing the appropriate antibiotics and allowed to grow at 28°C with 200 rpm agitation for 2 days. Subsequently 200  $\mu$ l of the bacterial suspension was added to 10 ml of fresh LB medium supplemented with the required antibiotics, and the culture was allowed to grow at 28°C with 200 rpm agitation for 24 hours. Followed by the addition of 10 ml LB medium and 100  $\mu$ M of acetosyringone into the culture of 24 hours. It was incubated for 4 hours. The bacterial suspension were pelleted at 5000 rpm for 5 min at room temperature and resuspended in 20 ml of liquid MS medium containing the growth regulators (3R), and 200  $\mu$ M acetosyringone until it reached 0.2 OD_{600nm}.

#### 5.5.4 Transformation by co-cultivation of mature zygotic embryo

Four segments were cut from mature zygotic embryos of *C. chinense* using a surgical blade. Infection with a diluted culture of C58 pER10W-35SRed cells was carried out for 40 min in agitation at room temperature. The explants were blotted dry with sterilized filter paper to remove the excess of *Agrobacterium* and placed in the regeneration medium (MS solid with 3R) in petri dishes for co-cultivation for 2 days at 28°C in darkness. The controls were treated in the absence of bacterial solution.

#### 5.5.5 Tissue culture after co-cultivation

After co-cultivation the explants were washed with sterile distilled water (2-3 times) for 5 min, submerged in a solution containing 1 g/L cefotaxim and 500 mg/L timentin in agitation for 40 minutes, blotted dry on sterilized filter paper. The explants were placed in jars with 25 ml of MS solid medium containing growth regulators (3R), 1 g/L cefotaxim and 500 mg/L timentin, and 100 mg/L of kanamycin. The explants were incubated to 25°C and photoperiod of 16 h light 8 h dark (40-50  $\mu$ mol/m²s¹) to 25 ± 2°C. Subcultures were carried out every 20 days during 6 months.

#### 5.5.6 Confirmation of the transgene

Genomic DNA was isolated from leaves, meristem, stem and roots tissues from regenerated and untransformed *C. chinense* plants 6 months old. Tissues were macerated in liquid N₂, with 1 ml of extraction buffer followed by Phenol-chloroform extraction the final pellet after ethanol precipitation was resuspended in 20  $\mu$ l distilled nuclease-free water. The samples were stored at - 20°C.

The extraction of DNA from pER10W-35SRed and C58C1 were carried out acording to the manual for plasmid purification (Wizard PLUS, PROMEGA).

The primers for PCR amplification used correspond to the *WUSCHEL* sequence forward (5'-ACATATGGAGCCGCCACAG-3'), and reverse (5'-ATCGCCTCCACATTCTTCTT-3'), which amplify a 862 bp fragment. The final composition of the reaction mixture was: 2.5  $\mu$ l buffer 10X, 1.5  $\mu$ l 50 mM MgCl₂, 0.5  $\mu$ l 10 mM dNTPs mix, 1  $\mu$ l 10 mM forward and reverse primers, 200 ng of sample DNA and 0.04 U/ $\mu$ l Taq polymerase. The reaction condictions were: 95°C for 2 min, 30 amplification cycles (95°C for 1 min, 52°C for 1 min, 72°C for 1 min) and a final extension step of 10 min at 72°C.

The *vir*E2 selected primers for detection of *A. tumefaciens* were: forward (5'-TGCCCACCAAGGCGGAATT-3'), and reverse (5'-CTTTGCCGACCCATCGA -3'), which amplify a 895 bp fragment. The final composition of reaction mixture was: 2.5  $\mu$ I buffer 10X, 1.5  $\mu$ I 50 mM MgCl₂, 0.5  $\mu$ I 10 mM dNTPs mix, 0.5 mM forward and reverse primers, 200 ng sample DNA plant DNA and 0.04 U/ $\mu$ I Taq polymerase. The reaction conditions were: 94°C for 30 seconds, 30 amplification cycles (94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min) and a final extension step of 10 min at 72°C.

#### 5.5.7 Overexpression of WUSCHEL in transformed explants

Segments of stems (2 to 2.5 cm long) were cut from 6 months old transformed seedlings. The meristems and roots were removed with a surgical blade. The stems of untransformed *in vitro* cultured seedlings were used as control.

The inducer 17  $\beta$ -estradiol were prepared as 500  $\mu$ M stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO), and diluted in MS medium for the final concentration of 10  $\mu$ M and 110  $\mu$ M of inducer for were carried chemical treatements. The transformed stems were treated by immersion with inducer for 40 seconds. Controls used transformed stems were immersed in a volume of MS medium with equivalent amount of DMSO. Were stated the effect of DMSO was tested with the only MS medium immersion. After immersion the stems were blotted dry on filter paper and placed in MS medium without growth regulators, supplemented with 3% sucrose and gelrite (0.25%). The cultures were incubated under photoperiod of 16 light /8 h darkness (40-50  $\mu$ mol/m² s¹) at 25 ± 2°C.

#### 5.5.8 Histological analysis of transformed stems induced

The induced stems were fixed in 4% paraformaldehyde (FAA) in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) for 24 h under negative pressure. Samples were dehydrated in a series of gradual absolute ethanol in water: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% and 100% two times. This was followed by impregnation with JB-4 resin (Polyscience, Pensylvania, USA). The resin impregnated tissue were seccioned on a microtome (HM 325, MICROM, Hellersbergstr, Neuss, Germany). 5  $\mu$ m thick sections were cut, transfered to slides and sections were double stained with the Periodic Acid-Shiff reaction (PAS) combined with protein specific naphthol blue-black.

#### 5.5.9 RNA extraction of induced explants

Three months after induction, total RNA was extracted from 100 mg of stem taken from each treatment and controls. The RNA extraction was realized according the protocol total purification with RNAspin Midi RNA isolation Kit (GE Healthcare). Traces of genomic DNA were removed with DNAse I (Sigma).

#### 5.5.10 Reverse transcription-polymerase chain reaction

WUSCHEL cDNA synthesis was done with 1 µg of total RNA of every explant using SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen), following manufacturer's instructions. The primers used were: forward 5'-ACATATGGAGCCGCCACAG-3' and reverse (5'-ATCGCCTCCACATTCTTCTT-3'). The cycling conditions for PCR were: 95°C for 2 min, 30 cycles of 95°C for 1 min, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension step to 72°C for 10 min and 4°C (10 min).

#### 5.5.11 Northern reverse

RT-PCR products were separated on 1% (w/v) to 90 V by 40 min agarose gel and transferred to nylon membranes (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Following transfer, DNA was fixed to the membranes via UV crosslinking (120 mJ). A *WUSCHEL* probe labelling and hybridization were realized with Gene Images Alkaphos direct labelling and detection system (Amersham Biosciences) kit. The hybridization was carried on at 55°C according with the manufacturer's instructions.

#### 5.6 RESULTS

#### 5.6.1 Genetic transformation of Capsicum chinense with WUSCHEL

Capsicum chinense explants were co-cultivated with C58 pER10W-35SRed and then cultured in MS medium with growth regulators (3R) and antibiotics until transformed plants were regenered *in vitro*. Red fluorescent plantlets were selected. We evaluated the presence of *WUSCHEL* by PCR in apical meristem, stem, roots and leaves of transformed plants. Figure 5.6.1 A shows the amplification of a 862 bp fragment for the heterologous gene *WUSCHEL* only in several transformed tissues. These results suggest the presence of heterologous gene *WUSCHEL* in the whole plant of *C. chinense*.

The absence of *A. tumefaciens* in the tissues was determined by PCR with primers for *virE2* gene (figure 5.6.1 B). The fragment of 895 bp (expected size for *virE* gene) was only amplified in positive control (DNA of strain *A. tumefaciens*). The results together with the lack of bacterial growth in the absence of antibiotics, allowed us to discard the posibility that *A. tumefaciens* would remain in the tissues of transformed plants. The gene  $\alpha$ -tubulin was used as control reaction for PCR and the 700 bp fragmen was observed in all the evaluated tissues, from transformed and not tranformed plants of *C. chinense* (figure 5.6.1 C).

*In vitro* transformed plants of *C. chinense* of 4 months old, showed no differences in their phenotype with the not transformed plants cultured under the same *in vitro* conditions (figure 5.6.1 E-D).



Figure 5.6.1. Evaluation of different tissues of C. chinense transformed with C58 pER10W-35SRed. (A): Amplification of the corresponding fragment of 862 bp expected for WUSCHEL. Line 1: DNA ladder (1 Kb), 2: pER10W-35SRed, 3: transformed stem, 4: transformed apical meristem, 5: transformed root, 6: transformed leaf, 7: no load, 8: stem, 9: apical meristem, 10: root, 11: leaf, and 12: mix PCR. (B): Absence fragment virE in transformed tissues, 1: DNA ladder (1 Kb), 2: Agrobacterium, 3: mix PCR, 4: transformed stem, 5: transformed apical meristem, 6: transformed root, 7: transformed leaf, 8-9: no load, 10: stem, 11: apical meristem, 12: root and 13: leaf. (C) Internal control α-tubulin. Line 1: transformed stem, 2: transformed apical meristem, 3: transformed root, 4: transformed leaf, 5: no load, 6: stem, 7: apical meristem, 8: root, 9: leaf. (D and E) seedlings obtained in vitro 4 months old: (D) not transformed and (E) transformed with pER10W-35SRed. Scale bars: D-E, 2 cm.

#### 5.6.2 Overexpression of WUSCHEL in transformed stems of C. chinense

The figure 5.6.2 A-D shows transformed stems after 15 days of immersed in 10 or 110  $\mu$ M of 17  $\beta$ -estradiol, with immersion in MS medium with DMSO or MS medium only. The transformed stems that were not inmersed with the inducer or DMSO, presented normal development of leaves and the tissue

remained green (figure 5.6.2 A). The stems only immersed in MS medium with DMSO presented necrosis and no morphogenetic response (figure 5.6.2 B). The stems immersed with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol, developed undifferentiated tissue (calli) with globular structures (figure 5.6.2 C).

After 30 days the transformed stems immersed with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ estradiol, developed new globular structures and the initial structures shown an increment in size, also was observed the development of callus over the initial globular structures. Moreover the stems treated with 110  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol, began the formation of globular structures, similar but with less abundance than those obtained in transformed stems induced with 10  $\mu$ M (figure 5.6.2 D).

The above results were furthern confirmed in the positive induced transgenic explant evaluated by Northern reverse analysis of *WUSCHEL* transcript (figure 5.6.2 E). The *WUSCHEL* transcript became detectable on treatment with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol and was not detected in the wild type or untreated transgenic plants (figure 5.6.2 E).

The not transformed stems (control) immersed in MS medium, developed seedlings after 45 days of *in vitro* culture (figure 5.6.3 A). The not transformed stems immersed in MS medium with DMSO (figure 5.6.3 B), likewise the not transformed stems treated with MS medium with 10  $\mu$ M or 110  $\mu$ M of 17  $\beta$ -estradiol (figure 5.6.3 C-D, respectively) presented stagnation in the growth and necrosis.

After 45 days, the transformed stems immersed in MS medium, showed tipical development and growth of leaves (figure 5.6.3 E). Transformed stems immersed in MS medium with DMSO, showed necrosis after 15 days of *in vitro* culture which remain by day 45 (figure 5.6.3 F). The transformed stems immersed with MS medium with 10  $\mu$ M of 17  $\beta$ -estradiol showed more globular structures, however the callus and some globular structures that were originally white color became dark brown (figure 5.6.3 G and H). The transformed stems immersed with 110  $\mu$ M of inducer become stagnant in the development of new globular structures did not progress after day 30 of *in vitro* culture.



Figure 5.6.2. Induced expression of *WUSCHEL* in transformed explants of *C. chinense* with C58 pER10W-35SRed in MS medium. (A-C): After 15 days of treated, A: without immersion, (B): with immersion only with DMSO, (C): with immersion in 17 β-estradiol (10 μM) and (D): after 30 days immersion in 110 μM in 17 β-estradiol. (E): Northern reverse to detect *WUSCHEL* expression in stems: 1: *WUSCHEL* positive control PCR product; 2: water; 3: not transformed and not induced stem; 4: not transformed and induced stem; 5: pER10W-35SRED induced transformed stem. Scale bars: A-B, 0.4 cm; C-D, 0.2 cm.



Figure 5.6.3. Induced expression of *WUSCHEL* in transformed explants of *C. chinense* with C58 pER10W-35SRed in medium MS, after 45 days of applied the immersion treatments. A-D: not transformed explants. A: without immersion, B: immersion only with DMSO, C: 10  $\mu$ M immersion with 17  $\beta$ -estradiol. D: immersion with 110  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol. E-H: transformed explants. E: without immersion. F: immersion only with DMSO. G and H: immersion with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol. Scale bars: A, 1 cm; B-F: 0.4 cm; G-H: 0.3 cm.

#### 5.6.3 Histological analysis of transformed stems induced

As previously mentioned, the wildtype stems did not forme globular structures (figure 5.6.3 A). Also the histological analysis showed that cells were large in size, with an absence of protoderm and meristematic nodules (figure 5.6.4 A-C). The histological analysis of structures of induced transformed stems showed the presence densely stained small meristematic cells (figure 5.6.4 D-G). Meristem cells eventually developed into meristematic nodules (figure 5.6.4 H). The Section shows small masses of cells containing large nucleus and globular somatic embryos (figure 5.6.4 I). The results suggest that transformed stems expresing *WUSCHEL* promote the development of globular somatic embryos.



Figure 5.6.4. Histological sections of segments stems of *C. chinense in vitro* culture MS. A-C: not transformed stems without immersion. D-I: transformed stems with immersion in 10 μM 17 β-estradiol. A-C: Sections of stems showing the absence of meristematic nodules and of somatic embyos. D-G: Sections of stems showing presence of meristematic cells (MC). H: Section of stem with an embryogenic callus (CL) showing meristematic nodules (MN). I: Section of stem with an embryogenic callus (CL) showing meristematic embryo (GSE). Abbreviations: EP, epidermis; SP, subepidermis; VZ, vascular zones; VA, vascular bundles; PQ, parenchyma. Scale bars: A, 8 mm, B, 6 mm; C, 3 mm; D, 3 mm; E, 4 mm; F, 3 mm; G, 8 mm; H; 250 μm; I, 200 μm.

#### 5.7 DISCUSSION

Here we report the development of a system for the transformation of *C. chinense* using a heterologous gene *WUSCHEL* of *A. thaliana*. The genetic transformation in *C. chinense* is an important tool in plant improvement. However, development of an efficient and reproducible tissue culture regeneration protocol is the first step needed for this tecnology (Binzel *et al.*, 1996).

*C. chinense* is a recalcitrant species to *in vitro* morphogenesis (Santana-Buzzy *et al.*, 2005; López-Puc *et al.*, 2006). The main technical problem to solve for *in vitro* regeneration in *C. chinense*, is the maduration, germination and convertion of embryos to seedlings (López-Puc *et al.*, 2006).

Current protocols for *Capsicum annuun* are not compatible for the genetic transformation of *C. chinense* via *A. tumefaciens.* Primary due to the effect the antibiotics required for the elimination of bacterium afect the development of embryonic structures (Liu *et al.*, 1990; Yu-Xian *et al.*, 1996; Manoharan *et al.*, 1998; Mihalka *et al.*, 2000; Venkataiah *et al.*, 2001; Ochoa-Alejo and Ramírez- Malagón, 2001; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002a; Cai *et al.*, 2003; Shivegowda *et al.*, 2002b; Mihalka *et al.*, 2003; Dabauza and Peña, 2003; Li *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

In previous genetic transformation protocols for *Capsicum* used between 300 mg/L to 500 mg/L of cefotaxim to eliminate *Agrobacterium* (Liu *et al.*, 1990; Manoharan *et al.*, 1998; Romero and Pozueta *et al*, 2001; Mihalka *et al*, 2000; Venkataiah *et al.*, 2001; Shivegowda *et al.*, 2002; Dabauza and Peña, 2003), however this concentration did not eliminate the bacterium of co-culivated explants of *C. chinense*. A diverse range of antibiotics and concentrations was tested for the elimination of *A. tumefaciens* after co-cultivate of the explants of *C. chinense* (data not shown). For the elimination of *A. tumefaciens* the most efficient and compatible with development was the use of 1 g/L cefotaxim and 500 mg/L timentin.

We selected the hetorologous gene WUSCHEL of A. thaliana, because the ovexpresion of WUSCHEL in A. thaliana (Mayer et al., 1998; Gallois et al., 2002; Zuo et al., 2002) and Coffea canephora induces embryonic cell clusters (Arroyo-Herrera et al., 2008) and in rice induces multiple shoot (Noriko et al., 2003). So the overexpression of WUSCHEL in C. chinense, may be an alternative to solve the recalcitrance of the specie.

The medium selected for *in vitro* culture (3R) permits the regenerated seedlings of *C. chinense* from mature zygotic embryos. The callus developed and were evaluated by red fluorescense (data not shown). The selected seedlings were evaluated by PCR to determine transformed plants. In all the transformed tissues evaluated (stem, root, apical meristem and leaves) by PCR a fragment of 862 bp corresponding to the expected size for gene *WUSCHEL* was observed wich was not amplified in wild type tissues of *C. chinense* (figure 5.6.1 A). Standard PCR for gene *vir*E2 was used to test the absence of C58 *A*.

tumefaciens, the results suggest the positive genetic transformation with gene WUSCHEL of *in vitro* cultured plants of *C. chinense* (figure 5.6.1 B). This was carried out from plants after 6 months of transformation mantained *in vitro* with MS medium without growth regulators and without antibiotics. None of the transformed plants show the presence of bacterium, the amplification of a 862 bp fragment suggest that was incorporated the heterologous gene WUSCHEL of *A. thaliana* in the genome of plants of *C. chinense* although must likely quimeric in nature. This result suggests that the protocol presented here is useful for introducing functional genes into *C. chinense*.

After culturing for 15 days, calli was observed in the transformed stems of *C. chinense*, induced with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol; from which globular and torpedo structures formed (figure 5.6.2 C). The wild type (figures 5.6.2 A, 5.6.3 A), or transformed explants immersed in MS medium (figure 5.6.3 E) did not show development. This data coincide previous observations from root explants of *A. thaliana* that over expressed *WUSCHEL* in presence of inductive medium (17  $\beta$ -estradiol), producing numerous rapidly growing, yellowish embryogenic calli, that subsequently developed into distintive somatic embryos (Zuo *et al.*, 2002). Furthermore, dimethyl sulfoxide (DMSO) alone had no effects on transgene expression (Zuo *et al.*, 2000).

The explants with somatic embryos keep in MS medium without growth regulators were not able to germinate. After 45 days of *in vitro* culture the calli and the embryos showed necrosis. In the work of Zuo *et al.* (2002), the somatic embryos were transfered into a non-inductive medium after 30 days, and all the embryos were able to germinate and develop fertile adults plants. However, one third of the seedlings ceased to develop further after germination, and eventually died (Zuo *et al.*, 2002).

The results suggest ectopic morphogenesis in the transformed explants of *C. chinense* with gene *WUSCHEL*, that were induced with 17  $\beta$ -estradiol. This observation coincides with previous report in *Coffea canephora* showing that the homeodomain protein is active in different heterologous systems (Arroyo-Herrera *et al.*, 2008).

The stems treated with 110  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol develop structures but showed decrease embryogenic response as compared to the stems induced with 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol (figure 5.6.2 C, D). The induced transformed explants showed the expression of *WUSCHEL* by Northern reverse analysis, and none *WUSCHEL* transcripts had detectable in the wild type (figure 5.6.2 E). The results corresponded with the obtained by Zuo *et al.* (2000) in *A. thaliana*, where the transgenic plants with GFP reporter gene under XVE, showed the expression of transgen in presence of inducer.

The properties allow transgen to be expressed at desired level and period depend of the estradiol concentrations and incubation time (Zuo *et al.*, 2000). A prolonged incubation appeared to lead to a reduced transcript level (e.g. grown for 2-3 weeks in the presence of the inducer), however the transferred onto a fresh inductive medium was able to fully reactivate the system (Zuo *et al.*, 2000). Also the higthest transcript level was found in presence of

higher estradiol concentrations, and appeared to be saturated at 10  $\mu$ M estradiol (Zuo *et al.*, 2000).

The histological analysis of induced transformed stems showed the development of meristematic nodules (figure 5.6.4 H) and the formation of globular somatic embryos (figure 5.6.4 I), which presented necrosis after 45 days of *in vitro* culture (figure 5.6.3 G), which did not continue development into other embryonic stages or in plants. The results of our work showed that overexpression of gene *WUSCHEL* in stems of *C. chinense* promote the formation of embryogenic structures but these stagnate in their growth suggesting that other signals may be need it for induction of proper development in this species.

From the plant growth regulators auxin is known to be esential for the induction of somatic embryogenesis in some plant species. Althought 2,4-D is the most commonly used auxin other auxins may be required for certain species (Binzel *et al.*, 1996; Buyukalaca and Mavituna, 1996). Although only an auxin pulse is needed as it has to be promptly removed from the medium, for somatic embryos to form. *WUSCHEL* transient overexpression causes highly embryogenic callus formation in the presence of auxin, whereas it directly induces somatic embryo formation from different plant organs in the absence of any exogenous auxin (Zuo *et al.*, 2002). However, it is not clear the auxin levels required for ectopic *WUSCHEL* to induce shoot organogenesis or somatic embryogenesis and this may be species specific (Gallois *et al.*, 2004).

#### 5.8 ACKNOWLEDGMENTS

We like to thank Dirección de Intercambio Academico de la Secretaria de Relaciones Exteriores from Mexico and Centro de Investigación Científica de Yucatan.

#### 5.9 REFERENCES

- Arroyo-Herrera, A., Ku-González, A., Canche-Moo, R., Quiróz-Figueroa, FR., Loyola-Vargas, V., Rodríguez-Zapata, L.C., Burgeff D'hondt, C., Suárez-Solís, V.M., Castaño, E (2008). Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture, 94:171–180. doi 10.1007/s11240-008-9401-1.
- Binzel, M.L., Sankhla, N., Joshi, S., Sankhla, D (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep., 15: 536-540.
- Buyukalaca, S., Mavituna, F (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 46: 227-235.
- Cai, W.Q., Fang, X., Shang, H.S., Wang, X., Mang, K.Q (2003). Development of CMV- and TMV- resistant transgenic chilli pepper: field performance and biosafety assessment. Molecular Breeding, 11: 25-35.
- Cai, W., Rong-Xiang, F., Feng-Li, Z., Jiu-Chun, Z., Xiaoying, CH., Gui-Ling, W., Ke-Qiang, M., Hong-Sheng, S., Xu, W., Yue-Ren, L (2002). Virus-resistant Chili pepper produced by *Agrobacterium* speciesmediated transformation. In Khachatourians, G., Mc.Hughen, Scorza, R., Nip, W.K., Hui, Y.H. Transgenic plants and Crops. Marcel Dekker, Inc. N.Y: 563-577.
- Canche-Moo, R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V., Rodriguez-Zapata, L.C, Castaño, E (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. Plant Cell Tissue Organ Culture 84:373-377. doi:10.1007/s11240-005-9036-4.
- Dabauza, M., Peña, L (2003). Response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens* as a means of selecting proper vectors for genetic transformation. Journal of Horticultural Science and Bitechnology 78: 65-72.
- Gallie, D.R., Lucas, W.J., Walbot, V (1989). Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. Plant Cell, 1:303–311.
- Gallois, J.L., Nora, F.R., Mizukami, Y., Sablowski, R (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. Genes Dev 18: 375-380. doi:10.1101/gad.291204.
- Gallois, J.L., Woodward, C., Reddy, G.V., Sablowski, R (2002). Combined SHOOT MERISTEMLESS and WUSCHEL trigger ectopic organogenesis in Arabidopsis. Development, 129: 3207-3217.
- Herrera-Estrella, L., Simpson, J., Martínez-Trujillo, M (2004). Transgenic Plants. An historical perspective. In: Peña, L. Transgenic Plants. Methods and Protocols. Humana Press, 286: 3-31.
- Lee, H.Y., Kim, H.S., Kim, J.Y., Jung, M., Park, Y.S., Lee, J.S., Choi, S.H., Her, N.H., Lee, J.H., Hyung, N.I, Lee, CH, Yang, S.G., Harn, CH (2004). A new selection meted for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. Genetic Transformation and Hibridization. Plant Cell Rep., 23: 50-58.
- Li, D., Zhao, K., Xie, B., Zhang, B., Luo, K (2003). Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep., 21: 785-788. doi:10.1007/s00299-003-0581-1.
- Liu, W., Parrot, W.A., Hildebrand, D.F., Collins, G.B., Williams, E.G (1990). Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Rep., 9:360-364.

- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barredo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Peniche-Montalvo, M., Barahona-Pérez, F., Iglesias-Andreu, L., Santana-Buzzy. N (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capscium chinense* Jacq.). HortScience, 41 (7): 1645-650.
- Manoharan, M., Sree, C.S., Lakshmi, S (1998). Agrobacterium mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var Pusa jwala). Plant Science, 131: 77-83. PII S0168-9452(97)00231-8.
- Mayer, K.F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jurgens, G., Laux, T (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in *Arabidopsis* shoot meristem. Cell, 95:805-815. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81703-1.
- Mihalka, V., Balazs, E., Nagy, I (2003). Binary transformation systems based on "shooter" mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. A simple, efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. Plant Cell Rep., 21:778-784. doi: 10.1007/s00299-003-0597-6.
- Mihalka, V., Fari, M., Szasz, A., Balazs, E., Nagy, I (2000). Optimised protocols for efficient plant regeneration and gene transfer in pepper (*Capsicum annum* L.). J. Plant Biotechnology, 2 (3): 143-149.
- 20. Murashige, T., Skoog, F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum, 15:473-497.
- Noriko, K., Hiroshi, N., Atsushi, M., Yutaka, S., Makoto, M (2003). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. The Plant Journal, 35: 429-441. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01816.x.
- 22. Ochoa-Alejo, N, Ramírez-Malagon, R (2001). Invited Review. *In vitro* chilli pepper biotechnology. *In vitro* Cell Dev Biol., 37: 701-709. doi: 10.1079/IVP2001216.
- Romero-Pozueta, J., Houlne, G., Cañas, L., Schantz, R., Chamarro, J (2001). Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling plants explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Tissue Organ Culture, 67: 173-180.
- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Barahona-Pérez, F., Montalvo-Peniche, M.C., Zapata-Castillo, P, Solís-Ruíz, A., Zaldívar-Collí, A., Gutiérrez-Alonso, O, Miranda-Ham, L (2005). Regeneration of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) via organogenesis. HortScience 40 (6): 1829-1831.
- 25. Shin, R., Han, J.H., Lee, G.J, Peak, K.H (2002a). The potencial use of viral coat protein genes as transgene screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat

proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. Transgenic Reseach, 11:215-219.

- Shin, R., Park, J., An, J.M., Paek, K.H (2002b). Ectopic expression of *Tsi*1 in transgenic hot pepper plants enhaces host resistance to viral, bacterial, and oomycete pahogens. The American Phytopathological Society. MPMI. Vol. 15 (10). pp: 983-989. no. M-2002-0812-02R.
- Shivegowda, T., Mythili, J.B., Anand, L, Saipradad, G., Ramanjini, Gowda, Gowda, T.K (2002). *In vitro* regeneration and transformation in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77 (5): 629-634.
- Venkataiah, P., Christopher, T., Subhash, K (2001). Plant regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in tour Capsicum species. Capsicum and Eggplant Newsletters 20: 68-71.
- 29. Yu-Xian, X., Wen-Jun, O.Y., Yi-Feng, Z., Zhang-Liang, CH (1996). Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Report 16: 71-75.
- Zhu, Y., Ou-Yang, W.J., Zhang, Y.F., Chen, Z.L (1996). Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Rep., 16: 71-75.
- Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., Chua, N.H (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. The plant Journal 30(3): 349-359. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01289.x
- Zuo, J., Niu, Q.W., Chua, N.H (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. The Plant Journal, 24(2): 265-273.

# Capítulo 6

## Discusión

## 6.1 INDUCCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA INDIRECTA A PARTIR DE EMBRIÓN CIGÓTICO

La embriogénesis somática ofrece distintas ventajas sobre la regeneración vía organogénesis de células o tejidos transformados, sin embargo, para el género *Capsicum* hay pocos reportes de embriogénesis somática (Harini y Sita, 1993; Timina *et al.*, 2003; Binzel *et al.*, 1996; Buyukalaca y Mavituna, 1996; Kintzios *et al.*, 2001; Steinitz *et al.*, 2003; López-Puc *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007).

En el caso de *C. chinense*, no se contaba con un sistema de regeneración eficiente y reproducible; lo que obstaculizaba la reproducción de un tejido transgénico para la especie. Por lo que parte de este trabajo, consistió en la evaluación de protocolos de regeneración *in vitro* (Valera-Montero y Ochoa-Alejo, 1992); algunos reportados para *C. chinense* (López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007). Se emplearon diferentes tipos de explantes; como segmentos de hipocótilos o tallos, hipocótilos enraizados, segmentos de embrión cigótico, los cuales fueron cultivados en medio de cultivo MS complementado con varios reguladores de crecimiento (2 mg/L zeatina + 0.2 mg/L ANA, 5 mg/L BA+ 3 mg/L AIA, 2 mg/L 2, 4-D; 4.5 mg/L BAP + 2 mg/L ANA, 2 mg/L ANA, AIA y BAP).

La embriogénesis somática en *C. annuum* se ha obtenido a partir de embrión cigótico inmaduro (Harini y Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996), embrión cigótico maduro (Buyukalaca y Mavituna, 1996) y hojas maduras (Kitzios *et al.*, 2001), mientras que para *C. chinense* se ha utilizado hoja cotiledonar, hipocótilo, embrión cigótico y embrion cigótico germinado (López-Puc *et al.*, 2006). En la mayoría de los reportes se obtuvo embriogénesis somática directa, con excepción del trabajo de Buyukalaca y Mavituna (1996) y Zapata-Castillo, *et al.* (2007), donde los embriones somáticos se desarrollaron a partir de callo embriogénico cultivado en medio líquido.

Para C. chinense los mejores resultados se obtuvieron a partir de segmentos de embrión cigótico maduro, cultivados en medio MS con 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AIA, 8.9  $\mu$ M BAP (3R). A los 30 días de cultivo se observó que el 75% de los explantes desarrolló tejido calloso (Figuras 4.1.2 A y 4.1.4 A), y el 8% de los callos presentaron posibles estructuras embrionarias entre los 50 a 60 días de cultivo (Figuras 4.1.3, 4.1.4 C y Anexo 2). A partir de los 100 días de cultivo los embriones formados alcanzaron el estadio de torpedo.

Para la germinación de los embriones en estadio de torpedo, se

cultivaron en medio MS sin reguladores de crecimiento considerando dos condiciones: 1) manteniendo el embrión somático en el tejido calloso que le dio origen, 2) desprendiendo el embrión somático del tejido calloso. Se observó que en ambos casos, los embriones en estadio de torpedo germinaron a los 120 días de cultivo (Figura 4.1.4 F y H). Además se obtuvo la conversión a plántula en el 75% de los embriones somáticos formados (Figura 4.1.4 G-I). Sin embargo, las plántulas que permanecieron en el tejido calloso presentaron deformidades en el desarrollo del tallo y radicular (Figura 4.1.4 G), y se necrosaron (Figura 4.1.5 A). Pero en el caso, en el que el embrión en estadio de torpedo es desprendido del tejido calloso, se regeneró una plántula (130 días de cultivo) sin deformidades y con sistema radicular bien formado (Figura 4.1.4 I, Figura 4.1.5 B).

En cultivos embriogénicos de *Capsicum* y de otras especies, se han reportado defectos en los embriones somáticos de manera similar, observándose embriones fusionados, ausencia de cotiledones, un cotiledón simple, cotiledones mal formados o fusionados, falta de brotes o deformidades en el meristemo apical (Steinitz *et al.*, 2003). Las anormalidades están asociadas con el uso del 2,4-D en el medio de inducción, en cambio los embriones inducidos con ANA tienen morfología mas normal que los inducidos con 2,4-D (Rodríguez y Wetzstein, 1998). Según evidencias con manipulaciones *in vitro* de embriones somáticos y cigóticos de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, las auxinas exógenas y el transporte polar están involucrados en la formación temprana de los patrones. Los antagonistas de auxinas endógenas inhiben la diferenciación normal en embriones somáticos jóvenes bajo crecimiento isodiamétrico (Steinitz *et al.*, 2003).

De acuerdo con Buyukalaca y Mavituna (1996), el 2,4-D a 9.05  $\mu$ M fue efectivo para la inducción de callo embriogénico, pero a los 60 días se redujo su concentración (4.52  $\mu$ M) para obtener crecimiento saludable, y no afectar la capacidad embriogénica. También mencionan que los explantes que primero formaron raíz no produjeron callo embriogénico bajo ninguna condición. La frecuencia de conversión fue 97% para la germinación *in vitro* y 48% para la germinación *in vitro*.

Los procesos de embriogénesis somática son a menudo iniciados en medio de cultivo conteniendo altos niveles de auxinas (principalmente 2,4-D), pero los embriones usualmente no se desarrollan bien hasta que la concentración de auxinas es reducida (Machackova y Zazimalova, 2008). El 2,4-D es la auxina más comúnmente utilizada en el género *Capsicum*, ya sea sola o en combinación con BAP o TDZ (Harini y Sita, 1993, Buyukalaca y Mavituna, 1996; Binzel *et al.*, 1996; Kintzios *et al.*, 2001; Steinitz *et al.*, 2003; López-Puc *et al.*, 2006; Zapata-Castillo *et al.*, 2007).

Se ha reportado que diferentes combinaciones de ANA, AIA y BAP favorecen el desarrollo de brotes por lo que se usan para inducir la regeneración vía organogénesis directa o indirecta a partir de diferentes tipos de explantes en diferentes cultivares de *Capsicum* (Liu *et al.*,1990; Valero-Montero y Ochoa-Alejo, 1992; Zhu *et al.*, 1996; Manoharan *et al.*, 1998; Venkataiah *et*  al., 2001, Shivegowda et al., 2002; Cai et al., 2002; Li et al., 2003; Lee et al., 2004: Kumar et al., 2005). Las mejores combinaciones para la inducción de brotes en C. annuum, se han obtenido cuando se han aplicado desde 1 mg/L de AIA y 2 mg/L ó 10 mg/L de BA para obtener la formación de brotes a partir de callos (Liu et al., 1990); con 8 mg/L de BA y 2 mg/L de AIA se obtuvo el 62% de explantes con brotes (Zhu et al., 1996); con 0.5 mg/L de TDZ se logró el 90.9% de brotes formados (Manoharan et al., 1998); con 4 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de AIA se obtuvieron 2.5 brotes por explante (Mihalka et al., 2000). Sin embargo, en este estudio los segmentos de embrión cigótico maduro de C. chinense en medio de cultivo MS semisólido con 8.9 µM ANA, 11.4 µM AIA y 8.9 µM BAP desarrollaron callo embriogénico y posteriormente embriones somáticos. También se ha reportado el desarrollo de embriones somáticos inducidos con ANA en explantes cotiledonarios de Solanum melongena (Tarré et al., 2004) y con BAP en ejes embrionarios de Arachis archeri y A. appressipila.

En este estudio, se determinó que después del cocultivo con A. tumefaciens, la respuesta in vitro de los segmentos de embrión cigótico de C. chinense no disminuyó significativamente (29%) (Figura 4.4.2.1). Cabe mencionar que la respuesta in vitro disminuyó o se suprimió después del cocultivo, en los explantes utilizados en los demás protocolos de regeneración ensayados (Anexo 2).

# 6.1.2 Análisis histológico de tejidos de *C. chinense* cultivados *in vitro* durante la inducción de embriogénesis somática

En la embriogénesis somática directa generalmente se considera que tiene un origen unicelular, mientras que para la embriogénesis somática indirecta, las opiniones varían con respecto al origen unicelular o multicelular (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). Los estudios histológicos de los callo embriogénico de *C. chinense* obtenidos en este trabajo, mostraron la presencia de pequeñas células meristemáticas densamente teñidas (Figura 4.1.5 A-C) en la periferia del callo. El estudio morfológico e histológico del proceso de embriogénesis somática indirecta obtenidos en este estudio, permitieron identificar cinco estadios de desarrollo: 1) globular, 2) oblongo, 3) acorazonado, 4) torpedo y 5) cotiledonar. El estadio oblongo es la transición entre el estadio en forma globular y el acorazonado (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002), lo cual coincide con lo reportado para *C. annuum* (Binzel *et al.*, 1996).

La histología mostró que el desarrollo de los embriones somáticos, se presenta mediante los típicos estadios correspondientes a forma globular, acorazonado, torpedo, y cotiledonario (Binzel *et al.*, 1996). A la fecha solo hay dos reportes de *C. annuum* que incluyen análisis histológico del proceso de embriogénesis somática (Harini y Sita, 1993; Binzel *et al.*, 1996).

La calidad morfológica de los embriones somáticos ha mostrado que afecta la eficiencia de la conversión a plántulas, en la embriogénesis somática

exhiben clara bipolaridad, cotiledones bien definidos y un buen desarrollo del ápice del brote se convierten mejor que los embriones que muestran morfológicas anormalidades (Rodríguez y Wetzstein, 1998). Los embriones somáticos logran germinar con éxito dependiendo del desarrollo apropiado de los meristemos apicales, cuyas células son pequeñas con núcleos y citoplasma denso (Nickle y Yeung, 1993). Esta morfología coincide con las características de las células de meristemo apical de los embriones cotiledonarios de *C. chinense* obtenidos en este estudio (Figura 4.1.7 F).

Los análisis histológicos confirmaron que la regeneración de plántulas de *C. chinense* ocurrió mediante embriogénesis somática indirecta, ya que no hubo conexión vascular con el tejido materno, la estructura presentó bipolaridad y las características del embrión somático. Además por los eventos involucrados en la embriogénesis somática indirecta originada en los tejidos estudiados, podemos decir que el tejido calloso tiene origen simétrico unicelular. Cuando los embriones tienen origen unicelular, se observan divisiones celulares coordinadas y algunas veces los embriogénesis somática están conectados al tejido materno por un suspensor. En contraste, los embriones de origen multicelular se observan inicialmente como protuberancias con divisiones celulares no coordinadas, los embriones están en contacto con el área basal y están típicamente fusionados con el tejido maternal (Quiróz-Figueroa *et al.*, 2006).

El empleo del embrión cigótico maduro como explante, representa una alternativa potencial sobre los embriones somáticos inmaduros u otros tipos de explantes empleados en los sistemas de embriogénesis somática; pues las semillas secas pueden almacenarse fácilmente y estar disponibles continuamente (Steinitz *et al.*, 2003).

Se considera que la falta de un sistema de regeneración eficiente ha limitado el desarrollo de experimentos de transformación genética en el género *Capsicum* (Zhu *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1997). Hasta la fecha para *C. chinense* hay dos sistemas de regeneración *in vitro* mediante embriogénesis somática. López-Puc *et al.*, (2006) indujeron la embriogénesis en medio de cultivo MS con 9-05  $\mu$ M de 2,4-D utilizando embriones cigóticos germinados *in vitro* e hipocótilos y obtuvieron un promedio de 87 y 175 embriones por explante respectivamente. Sin embargo, la principal limitante fue la maduración, germinación y conversión a plántulas; la mayoría de los embriones no germinaron y algunos de los embriones que germinaron no se convirtieron en plántulas y/o presentaron diferentes anormalidades morfológicas (López-Puc *et al.*, 2006).

Zapata-Castillo *et al.*, (2007) lograron la inducción de callo embriogénico a partir de hipocótilos, en 30 días de cultivo en medio MS líquido con 9-05  $\mu$ M 2,4-D. Posteriormente el callo se transfirió a medio de cultivo líquido con 4.4  $\mu$ M 2,4-D, para la disgregación y multiplicación, y los embriones somáticos se formaron cuando se suprimió el 2,4-D y se adicionó TDZ (Zapata-Castillo *et al.*, 2007). Sin embargo, este sistema de regeneración no es atractivo para regenerar tejido transformado de *C. chinense* mediante *Agrobacterium*  tumefaciens, debido a que el uso de medio líquido representa una limitante para la eliminación de la bacteria en el tejido calloso disgregado. Ya que los antibióticos empleados para la eliminación de la bacteria después del cocultivo, se mantienen en el medio por varios subcultivos.

Sin embargo, el sistema de regeneración establecido en este trabajo, ofrece una alternativa para que mediante embriogénesis somática indirecta se puedan obtener células o regenerar plántulas transformadas genéticamente. Lo cual puede contribuir al mejoramiento genético de *Capsicum chinense*, incorporando genes de interés (Solís-Ramos *et al.*, 2009). Los análisis histológicos mostraron el origen unicelular de los embriones somáticos mediante ESI, cuyo sistema es muy prometedor para la regeneración de células genéticamente transformadas, y evitar quimeras (Trigiano *et al.*, 1989).

#### 6.2 ELIMINACIÓN DE A. tumefaciens DESPUÉS DEL COCULTIVO

Otra etapa a considerar en la transformación genética de *C. chinense* es la eliminación de *A. tumefaciens* de los segmentos de embrión cigótico después del cocultivo. Esto para minimizar el riesgo de interferencia en el crecimiento y regeneración de los tejidos de plantas potencialmente transformados y para reducir el riesgo de liberar la agrobacteria al ambiente (Ogawa y Mii, 2005).

En los reportes de transformación genética para el género *Capsicum*, el antibiótico más utilizado en la eliminación de *A. tumefaciens* fue la cefotaxima en concentraciones que van de los 300 mg/L hasta los 500 mg/L (Liu *et al.*, 1990; Manoharan *et al.*, 1998; Romero y Pozueta *et al.*, 2001; Venkataiah *et al.*, 2001; Shivegowda *et al.*, 2002; Dabauza y Peña, 2003). En este trabajo se utilizó inicialmente la cefotaxima a 500 mg/L para eliminar la bacteria de los explantes de *C. chinense*; sin embargo no se obtuvo éxito ya que hubo reincidencia bacteriana.

Debido a lo anterior, se evaluaron diferentes antibióticos  $\beta$ -lactámicos solos o en combinación, en los tratamientos de lavado y en el medio de cultivo (MS semisólido más 8.9  $\mu$ M ANA, 11.4  $\mu$ M AlA y 8.9  $\mu$ M BAP), de los explantes cocultivados. Los tratamientos que lograron eliminar la bacteria de los explantes de *C. chinense* estuvieron conformados por: 1) 500 mg/L de cefotaxima más 5 mg/L de meropenem, 2) 1 g/L de cefotaxima lavando con cloro (15%), 3) 1 g/L cefotaxima más 500 mg/L de timentina, 4) el mismo tratamiento anterior pero con lavando con cloro (15%), y 5) 500 mg/L de timentina con lavado con cloro (15%). A los 70 días de cultivo, se logró eliminar la bacteria en un 60 a 80% de los segmentos de embrión cigótico evaluados (Figura 4.2.1).

Se logró eliminar la bacteria de los segmentos de embrión cigótico de *C. chinense* cocultivados con varios antibióticos; sin embargo no todos los tratamientos tuvieron la misma respuesta *in vitro* (Figura 4.2.2). Empleando 1 g/L de cefotaxima más 500 mg/L de timentina, se presentó una mayor cantidad de plántulas, a partir de los explantes cocultivados (48%). Por ío que ese

tratamiento, no solo permitió eliminar la bacteria en un 60% del total de los explantes, sino que también se desarrollaron más plántulas a partir de los segmentos cocultivados (Figura 4.2.2).

## 6.3 EMPLEO DE LA KANAMICINA COMO AGENTE SELECTIVO EN EXPLANTES DE C. chinense

En los experimentos de transformación genética para *C. chinense* se utilizaron los vectores pCAMBIA2301 y el pER10W-35SRed, que portan el gen selectivo *nptll* que le confiere a la célula vegetal resistencia a la kanamicina. Por lo que fue necesario establecer la dosis mínima letal de kanamicina para los segmentos de embrión cigótico para *C. chinense*.

En la mayoría de los reportes de transformación genética para *Capsicum*, se ha empleado la kanamicina como agente selectivo en concentraciones que van desde los 25 mg/L hasta los 250 mg/L (Liu *et al*, 1990; Manoharan *et al.*, 1998; Romero-Pozueta *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002a; Shivegowda *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002b; Cai *et al.*, 2002; Dabauza y Peña, 2003; Mihalka *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Delis *et al.*, 2005).

Sin embargo, se ha visto que la kanamicina no es un marcador de selección óptimo para la transformación genética de *Capsicum*, ya que especies de este género son altamente tolerantes al agente selectivo (Shin *et al.*, 2002a; Liu *et al.*, 2003, Dabauza y Peña, 2003). Lo anterior coincide con lo obtenido en este trabajo, ya que segmentos no cocultivados de *C. chinense* mostraron tolerancia a concentraciones de hasta 300 mg/L de kanamicina (Figura 4.3.1). Esto puede ocasionar escapes de plantas tolerantes a la kanamicina en los experimentos de transformación genética de plantas (Mihalka *et al.*, 2000).

Se ha determinado que los tejidos de *Capsicum* no transformados reducen su respuesta organogénica conforme aumenta la concentración de kanamicina. Cai *et al.* (2003), determinaron que no se producen brotes adventicios en hipocótilos no transformados de *C. annuum*, cuando la concentración de kanamicina es igual o mayor a 50 mg/L. Además Delis *et al.* (2005), encontraron que 50 mg/L de kanamicina reduce la cantidad de explantes con organogénesis (23.1%) comparados con el testigo (83.6%).

En este estudio los segmentos de *C. chinense* no cocultivados y en medio de cultivo en ausencia de kanamicina, mostraron un incremento en la formación de tejido calloso con relación a los tratamientos con kanamicina; siendo evidente en la segunda y tercera semana de cultivo (Figura 4.3.1 B). Sin embargo, los explantes sin infectar, cultivados con kanamicina presentaron desarrollo radicular, el cual no se presentó en los explantes cultivados en ausencia de kanamicina (Figura 4.3.1 A).

Estos resultados permiten un sistema de selección de plantas para tejido calloso posiblemente transformado de *C. chinense*; ya que aquellos explantes no transformados en presencia de 100 mg/L de kanamicina no formarían tejido calloso y en el caso de observarse desarrollo de callo podría

tratarse de tejido transformado.

#### 6.4 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN REPORTERO GUS

En estudios preliminares de transformación genética, se emplean genes reporteros para determinar de forma fácil y rápida si el método de transformación genética, permite incorporar un gen de interés. Uno de los genes reporteros más utilizados es el *uidA* que codifica la β-glucuronidasa, que puede ser medido por fluorometría, espectrometría, o ensayo histoquímico.

En este estudio se cocultivaron segmentos de embrión cigótico de *C. chinense* (LBA4404 pCAMBIA 2301), los cuales fueron evaluados por tinción histoquímica a los 30 días de cultivo *in vitro*. En la prueba de tinción GUS (Jefferson *et al.*, 1987), se presentó coloración azul tanto en explantes cocultivados como en no cocultivados (Figura 4.4.1.1). Los resultados muestran que existe actividad endógena tipo  $\beta$ -glucuronidasa en tejidos de *C. chinense*, como es el caso del tejido calloso desarrollado a partir de segmentos de embrión cigótico (Figura 4.4.1.2).

#### 6.4.1 Efecto del pH en la actividad endógena tipo β-glucuronidasa en tejidos de *C. chinense*

Diferentes estudios han demostrado que algunas plantas presentan actividad endógena en algunos tejidos, principalmente en los reproductivos (Pleg y Bino,1989; Hu *et al.*, 1990). Un importante prerrequisito para el uso de genes reporteros es la ausencia de actividad endógena en los organismos a transformar (Martin *et al.*, 1992).

Siguiendo la metodología propuesta por Jefferson (1987), se determinó en este estudio, actividad endógena tipo GUS en siguientes tejidos de *C. chinense*: embrión cigótico, estambres, placenta, pericarpio, callos (60 d) y raíces (90 d) (Figura 4.4.3).

Se ha reportado que el pH de la solución de tinción influye fuertemente en la actividad endógena de *A. thaliana* (Martin *et al.*, 1992). Por lo que se determinó el efecto del pH del buffer fosfato, en la actividad endógena tipo GUS de los tejidos de *C. chinense*, modificándolo en un intervalo de 6 a 8.

En todos los tejidos evaluados de *C. chinense* con pH ácido (pH 6), se presentó actividad endógena tipo GUS (Figura 4.4.3). Lo que corresponde a evidencias de que la actividad endógena tipo  $\beta$ -glucuronidasa con pH ácidos (pH 5), esta presente en una amplia variedad de especies (Martin *et al*, 1992).

Sin embargo al incrementar el pH a 8 en la solución de tinción, se suprimió la actividad endógena tipo GUS en todos los explantes de *C. chinense*, a excepción de los estambres y de la placenta. Esto coincide con lo reportado para *A. thaliana*, ya que se determinó que la actividad endógena tipo GUS se suprime a pH entre 7 y 8 (Hu et al., 1990).

Además se observó actividad GUS en los explantes de *Nicotiana tabacum* cocultivados con LBA4404 pCAMBIA2301, utilizando el buffer fosfato a pH 8 (Figura 4.5.2).

# 6.4.2 Transformación genética de C. chinense con LBA4404 pCAMBIA2301

Se llevó a cabo el cocultivo de segmentos de embrión cigótico con el gen reportero GUS, los cuales fueron cultivados en el medio antes descrito. Se obtuvieron plántulas y se evaluaron por medio de tinción histoquímica considerando el buffer fosfato a pH 8. La Figura 4.4.4 B) muestra un tallo de la plántula de *C. chinense* con actividad GUS, caso contrario al tallo de la plántula no transformada (Figura 4.4.4 A). Estos resultados sugieren la posible transformación de los explantes de *C. chinense* con el gen *uidA*.

Además en la prueba histoquímica a pH 8, se consideró como testigo, explantes de *Nicotiana tabacum* transformados con el gen reportero y se observó actividad GUS en el tejido foliar transformado (Figura 4.4.4 C).

Los resultados de la evaluación histoquímica con buffer fosfatos a pH 8, sugieren que el gen *uidA* posiblemente introducido en los tejidos de *C. chinense* y *N. tabacum* está activo, ya que se obtuvo coloración azul en el tejido transformado (Figura 4.4.4 A, C). En el caso del tejido de plantas no transformadas no se presentó dicha actividad (Figura 4.4.4 B, D).

## 6.5 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE Capsicum chinense CON EL GEN HETERÓLOGO WUSCHEL DE Arabidopsis thaliana

#### 6.5.1 Activación de WUSCHEL en explantes transformados

#### Explantes con inductor (17 β-estradiol) en el medio de cultivo

Los segmentos de embrión cigótico infectados con pER10W-35SRed, cultivados en medio 3R adicionado con el inductor, no mostraron desarrollo de estructuras somáticas embrionarias.

La presencia del 17  $\beta$ -estradiol en el medio de cultivo 3R, afectó la respuesta *in vitro*; ya que disminuyó la cantidad de explantes con tejido calloso y además no hubo desarrollo de plántulas (Figura 4.6.2.1 A). Además el disolvente (DMSO) ocasionó necrosis de los segmentos.

A pesar de que en la cuarta semana se cambiaron los tratamientos, eliminando la presencia del inductor o del disolvente; los explantes no desarrollaron estructuras somáticas.

#### Explantes tratados por inmersión con el inductor (17 β-estradiol)

Los segmentos de embrión cigótico infectados (pER10W-35SRed) e inmersos con el inductor, no desarrollaron estructuras somáticas (Figura 4.6.1.2).

Sin embargo se disminuyó el efecto negativo del disolvente sobre los explantes, al aplicar un menor tiempo de inmersión, además de un tratamiento de lavado por un periodo de 5 minutos. Dicho tratamiento se seleccionó en base a los resultados obtenidos en ensayos anteriores (datos no mostrados). La inmersión en el disolvente (DMSO) o en el 17  $\beta$ -estradiol durante 30 segundos, seguido de un lavado por 5 minutos, es suficiente tiempo para que el inductor penetre en el tejido del explante, ocasionándole menor daño (datos no mostrados). Esto se observó en los explantes de *C. chinense* inmersos en el inductor en presencia de bromuro de etidio, los cuales fueron expuestos a luz UV.

#### Evaluación por microscopía de fluorescencia roja

Sin embargo, a partir de los segmentos de *C. chinense* infectados con pLH60 y pER10W-35SRed se desarrolló tejido calloso. Este tejido calloso mostró la presencia de focis con fluorescencia roja, lo cual sugiere la posible transformación genética del tejido con el gen reportero *dsred*, que codifica para la proteína roja fluorescente (RFP) (Figura 4.6.1.3).

Sin embargo, los explantes posiblemente transformados con el gen reportero *dsred* y con *WUSCHEL*, no desarrollaron estructuras embrionarias en presencia del inductor.

#### Segmentos de tallo inmersos en el inductor (17 β-estradiol)

Se seleccionó el gen heterólogo WUSCHEL de A. thaliana, debido a que la sobreexpresión del gen en A. thaliana (Gallois et al., 2002; Zuo et al., 2002) y Coffea canephora induce grupos de células embriogénicas (Arroyo-Herrera et al., 2008) y en arroz induce fenotipos de múltiples brotes (Noriko et al., 2003). Sin embargo, en A. thaliana se reportó que si otra proteína homeodominio, SHOOT MERISTEMLESS (STM), está simultáneamente sobreproducida, son inducidos brotes ectópicos (Gallois et al., 2002). Por lo que la sobreexpresión de WUSCHEL en C. chinense, puede ser una alternativa para resolver la recalcitrancia de la especie.

A partir de los segmentos de *C. chinense* cocultivados con pER10W-35SRed, se obtuvieron plátulas *in vitro*, las cuales mostraron la presencia del gen *WUSCHEL* por medio de PCR (Figura 5.6.1 A) y por medio de fluorescencia roja la presencia del gen *dsred* (Figura 4.6.1.5).

Como el gen *WUSCHEL* esta regulado por el promotor inducible con el 17  $\beta$ -estradiol, se tomaron segmentos de tallo de *C. chinense* posiblemente transformados con el gen y fueron inducidos, ya sea adicionado al medio de cultivo MS el inductor, o aplicado por medio de inmersión.

Los tallos cocultivados inmersos en 5  $\mu$ M del inductor, presentaron estructuras globulares a partir de los 15 días de cultivo (Figure 5.6.2 C); las

cuales no se observaron en los explantes no cocultivados en presencia del inductor. Después de 30 días, los tallos transformados inmersos con 10  $\mu$ M 17  $\beta$ -estradiol, desarrollaron nuevas estructuras globulares y además tejido calloso. A los 45 días de cultivo las estructuras globulares y el tejido calloso se necrosaron (Figure 5.6.3 G). Los análisis histológicos de las estructuras sugieren que de los tallos transformados con *WUSCHEL* e inducidos se desarrollaron posibles embriones somáticos (Figure 5.6.4 I).

Esta observación coincidió con reportes previos en *Coffea canephora*, debido a que la proteína homeodominio, parece trabajar bien en un sistema heterólogo (Arroyo-Herrera *et al.*, 2008). *WUSCHEL* se ha encontrado que induce la formación ectópica de células madre (Schoof *et al.*, 2000; Gallois *et al.*, 2004; Lenhard and Laux, 2003; Zuo *et al.*, 2002).

Los resultados de este trabajo mostraron que la sobreexpresión del gen WUSCHEL en tallos de *C. chinense* promueven la formación de estructuras embriogénicas, sin embargo estancan su crecimiento; sugiriendo que quizás otras señales están involucradas en la inducción embriogénica y adecuado desarrollo en esta especie.

Cabe mencionar, que tejido foliar y radicular de *C. chinense* infectado con pER10W-35SRed fue inducido con el 17  $\beta$ -estradiol, pero no mostraron alguna respuesta morfogénica.

Las plántulas de *C. chinense* transformadas con *WUSCHEL* están siendo micropropagadas *in vitro*.

#### 6.6. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN PARA Capsicum chinense

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron establecer un sistema de transformación genética mediante *A. tumefaciens* (Figura 6.1), el cual mostró ser útil para introducir genes funcionales (WUSCHEL) dentro de *C. chinense*.





# 6.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo-Herrera, A., Ku-González, A., Canche-Moo, R., Quiróz-Figueroa, F.R., Loyola-Vargas, V., Rodríguez-Zapata, L.C., Burgeff D'hondt, C., Suárez-Solís, V.M., Castaño, E (2008). Expression of WUSCHEL in Coffea canephora causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Culture.
- Binzel, M., Sankhla, N., Joshi, S., and Sankhla, D (1996 a). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep., 15. pp: 536-540.
- Binzel, M., Sankhla, N., Joshi, S., and Sankhla, D (1996 b). *In vitro* regeneration in chile pepper (*Capsicum annuum* L.) from half-seed explants. Plant Growth Regulation, 20: 287-293.
- Buyakalaca, S., Mavituna, F (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 46: 227-235.
- Cai, W., Rong-Xiang, F., Feng-Li, Z., Jiu-Chun, Z., Xiaoying, CH., Guiling, W., Ke-Qiang, M., Hong-Sheng, S., Xu, W., and Yue-Ren, L (2002). Virus-resistant Chili pepper produced by *Agrobacterium* speciesmediated transformation. In Khachatourians, G., Mc.Hughen, Scorza, R., Nip, W.K., Hui, Y.H. Transgenic plants and Crops. Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp: 563-577.
- Cai, W.Q., Fang, X., Shang, H.S., Wang, X. and Mang, K.Q (2003). Development of CMV- and TMV resistant transgenic chilli pepper: field performance and biosafety assessment. Molecular Breeding, 11: 25-35.
- Dabauza, M. and Peña, L (2003). Response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens* as a means of selecting proper vectors for genetic transformation. Journal of Horticultural Science and Bitechnology, 78: 65-72.
- Delis, M.; Garbaczewska, G.; Niemirowicz-Szczyy, K (2005). Differentiation of adventitious Buds from *Capsicum annuum* L. Hypocotyls after co-culture with *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Biológica Cracoviensia. Series Botánica, 47(1) :193-198.
- Gallois, J.L., Nora F.R., Mizukami, Y., Sablowski, R (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. Genes Dev, 18: 375-380. doi:10.1101/gad.291204.
- Harini, I., and Sita, L (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). Plant Science, 89 : 107-112.
- Hu, C.Y., Chee, P., Chesney, R.H., Zhou, J.H., Miller, H., and O'brien, W.T (1990). Intrinsic GUS-like actives in seed plants. Plant Cell Rep, 9: 1-5.
- 12. Jefferson, R.A (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant. Mol. Biol. Rep., 5 : 387-405.

- Khan, H., Siddique, I. and Anis, M (2006). Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. Brief communication. Biologia Plantarum, 50 (4): 789-792.
- Kitzious, S., Drossopoulos, J. and Lymperopoulos, CH (2001). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from leaves of chilli pepper. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 55-62.
- Kumar, V., Gururaj, H.B., and Narasimha, B.C (2005). Direct shoot organogenesis on shoot apex from seedling explants of (*Capscium annuum* L.) Scientia Horticulturae, 106: 237-246.
- Kim, S.J., Lee., S.J., Kim. B.D., Aek, K.H (1997). Satellite RNA mediated resistance to cucumber mosaic virus in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). Plant Cell Reports. 16: 825-830.
- Lenhard, M., Laux, T (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. Development, 130: 3163-3173. doi:10.1242/dev.00525.
- Lee, H.Y., Kim, H.S, Kim, J.Y, Jung, M., Park, Y.S., Lee, J.S., Choi, S.H., Her, N.H., Lee, J.H., Hyung, N.I., Lee, C.H., Yang, S.G., Harn, C.H (2004). A new selection meted for pepper transformation: callusmediated shoot formation. Genetic Transformation and Hibridization. Plant Cell Rep., 23: 50-58.
- Li, D., Zhao, K., Xie, B., Zhang, B., Luo, K (2003). Establishment of a highly efficient transformation system for pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Rep., 21: 785-788.
- Liu, W., Parrot, W.A, Hildebrand, D.F., Collins, G.B. and Williams, E.G (1990). Agrobacterium induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Rep., 9: 360-364.
- López-Puc, G., Canto-Flick, A., Barrerdo-Pool, F., Zapata-Castillo, P., Peniche-Montalvo, M., Barahona-Pérez, F., Iglesias-Andreu, L., and Santana-Buzzy (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of habanero pepper (*Capscium chinense* Jacq.). HortScience, 41 (7): 1645-650.
- 22. Machackova I. and Zazimalova E. 2008. Chapter 5. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. The Background. Edited by George E., Hall M., and De Klerk J. Springer, Netherlands. 1: 175-204.
- Manoharan, M.; Sree, C.S., and Lakshmi, S (1998). Agrobacterium mediated genetic transformation in hot chilli (*Capsicum annuum* L. var *Pusa jwala*). Plant Science, 131: 77-83.
- 24. Martin, T., Wohner, R.V., Hummel., S., Willmitzer, L., and Frommer, W.B (1992). The GUS reporter system as a tool o study plant gene

expression. In: Gallager, S. GUS protocols. Academic Press, Inc. California, pp: 23-43.

- 25. Mihalka, V., Balazs, E., Nagy, I (2003). Binary transformation systems based on "shooter" mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. A simple, efficient and universal gene transfer technology that permits marker gene elimination. Plant Cell Rep., 21 : 778-784.
- Mihalka, V, Fari, M., Szasz, A., Balazs, E., Nagy, I (2000). Optimised protocols for efficient plant regeneration and gene transfer in pepper (*Capsicum annum* L.). J. Plant Biotechnology, 2 (3) : 143-149.
- Ogawa, Y., and Mii, M (2005). Evaluation of 12 β-lactam antibiotics for *Agrobacterium*-mediated transformation through in plant antibacterial activities and phytotoxicities. Plant Cell Rep., Genetic transformation and hybridization, 23: 736-743.
- 28. Nickle T., and Yeung E (1993). Failure to establish a functional shoot apical meristem may be a cause of conversion failure in somatic embryogenesis. Ann Bot. 80: 1284.
- Noriko, K., Hiroshi, N., Atsushi, M., Yutaka, S., Makoto, M (2003). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. The Plant Journal, 35: 429-441. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01816.x.
- 30. Plegt, L., and Bino, R.J (1989). β-glucuronidase activity during development of the male gametophyte from transgenic and non-transgenic plants. Mol.Gen.Genet., 210 : 321-327.
- Quiroz-Figueroa, F., Rojas-Herrera, R., Gálaz-Avalos R.M. and Loyola-Vargas, V. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tissue Organ Culture. 86: 285-301.
- Quiróz-Figueroa FR., Méndez-Zeel M., Sánchez-Teyer F., Rojas-Herrera R., Loyola-Vargas, V.M. (2002). Diferential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. J. Plant Physiol 159: 1267-1270.
- Rodríguez, A., and Wetzstein, H.Y. (1998). A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoinensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Protoplasma 204:71-83.
- Romero-Pozueta, J., Houlne, G., Cañas, L., Schantz, R., Chamarro, J (2001). Enhanced regeneration of tomato and pepper seedling plants explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 67: 173-180.
- Schoof, H., Lenhard, M., Haecker, A., Mayer K.F.X., Jürgens, G., Laux, T (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell, 100: 635-644. doi:10.1016/S0092-8674(00)80700-X.

- Shin, R., Han, J.H., Lee, G.J., and Peak, K.H (2002a). The potential use of viral coat protein genes as transgene screening marker and multiple virus resistance of pepper plants coexpressing coat proteins of cucumber mosaic virus and tomato mosaic virus. Transgenic Research, 11: 215-219.
- Shin, R., Park, J., An, J.M. and Paek, K.H (2002b). Ectopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhaces host resistance to viral, bacterial, and oomycete pahogens. The American Phytopathological Society. MPMI, 15 (10): 983-989.
- Shivegowda, T.; Mythili, J.B.; Anand, L.; Saipradad, G.; Ramanjini Gowda; Gowda, T.K (2002). *In vitro* regeneration and transformation in chilli pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77 (5): 629-634.
- Solis-Ramos, L.Y., González-Estrada, T., Nahuath-Dzib, S., Zapata-Rodríguez, L.C, Castaño, E. Overexpression of WUSCHEL in Capsicum chinense causes ectopic morpogenesis. Aceptado. Plant Cell, Tissue & Organ Culture.
- 40. Steinitz, B., Kusek, M., Tabib, Y., Paran, I., and Zelcer, A (2003). Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerates obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant., 39 : 296-303.
- Timina, O., Tsykaliuk, R. and Orlov, P (2003). Somatic embryos of Capsicum annuum L., genetic specialities of formation. Capsicum and Eggplant Newsletter, 22: 103-106.
- 42. Trigiano R.N., Gray DJ., Conger BV., McDaniel J.K. (1989). Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. Bot. Gaz 150: 72-77.
- Tarré, E., Magioli, C., Margis-Pinheiro, M., Sachetto-Martins, G., Mansur, E., Santiago-Fernandes, L. (2004) *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious root initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). Revista Brasil. Bot. 27(1): 79-84.
- Valera-Montero and Ochoa-Alejo, N (1992). A novel approach for chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. Plant Science, 84: 215-219.
- Venkataiah, P., Christopher, T., and Subhash, K (2001). Plant regeneration and Agrobacterium-mediated genetic transformation in four Capsicum species. Capsicum and Eggplant Newsletters, 20: 68-71.
- Zapata-Castillo, P., Canto-Flick, A., López-Puc., G., Solís-Ruíz, A., Pérez-Barahona., F. Iglesias-Andreu, L. and Santana-Buzzy, N (2007). Somatic embryogenesis in Habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) from cell suspensions. Hort Science.
- Zhu, Y., Ou-Yang., W.J., Zhang, Y.F., and Chen, Z.L (1996). Transgenic sweet pepper plants from *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Rep., 16: 71-75.

48. Zuo, J., Niu, Q.W., Frugis, G., and Chua, N.H (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. The plant Journal, 30(3): 349-359.

## Capítulo 7

## Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue transformar genéticamente células de *Capsicum chinense* Jacq., y obtener plántulas con el transgen. La hipótesis de partida fue evaluar si *Agrobacterium tumefaciens* era capaz de transferir su ADN-T a células de *C. chinense* cultivadas *in vitro*, y las células transformadas regeneraran plántulas con el transgen. Además si *WUSCHEL* actúa como activador de la embriogénesis en algunos tejidos vegetativos de *Arabidopsis thaliana*; se esperaba que en *C. chinense* la sobreexpresión de este gen heterólogo incremente la respuesta embriogénica.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, y a lo discutido anteriormente, las principales conclusiones son las siguientes:

- Capsicum chinense es una especie recalcitrante; sin embargo a partir de segmentos de embrión cigótico cultivados en medio MS con 8.9 μM ANA, 11.4 μM AIA y 8.9 μM BAP, se formó tejido calloso con estructuras embrionarias (8%). Al ser desprendidos del tejido calloso, los embriones en estadio de torpedo germinaron en medio de cultivo MS (75%) y desarrollaron plántulas.
- Empleando 1 g/L de cefotaxima más 500 mg/L de timentina se eliminó Agrobacterium tumefaciens de los explantes de C. chinense cocultivados (60%) y permitió la obtención de un mayor número de plántulas (48%).
- Los segmentos de embrión cigótico de C. chinense mostraron resistencia a concentraciones de 300 mg/L de kanamicina. Sin embargo, el crecimiento radicular se favoreció en los explantes no transformados y cultivados con kanamicina (100 hasta 300 mg/L). La formación de tejido calloso aumentó en los explantes no transformados sin kanamicina.
- Los resultados mostraron la existencia de actividad endógena tipo βglucuronidasa en tejidos de Capsicum chinense. La actividad βglucuronidasa derivada de GUS en tejido de C. chinense, debe evaluarse con el buffer fosfato a pH 8; ya que con esas condiciones no se observó actividad endógena tipo GUS, a excepción de los estambres y la placenta.
- Los tallos de plántulas regeneradas de C. chinense mostraron actividad β-glucuronidasa, utilizando el buffer fosfato a pH 8, lo cual sugiere la posible transformación genética con el gen uidA.
- La amplificación de un fragmento correspondiente al gen WUSCHEL sugiere la inserción del gen heterólogo en los explantes de C. chinense sometidos a transformación con la cepa C58C1 con pER10W-35SRed.

- La ausencia del fragmento correspondiente a los genes vir en las plántulas evaluadas mediante PCR, sugieren la ausencia de *A. tumefaciens* en los mismos.
- Los callos de *C. chinense* mostraron zonas con fluorescencia roja, lo cual sugiere la posible transformación genética con el gen *dsred*.
- Los tallos de C. chinense quiméricos con el gen WUSCHEL e inducidos con 5 μM de 17 β-estradiol, mostraron formación de estructuras somáticas. Además los resultados de los análisis histológicos de las estructuras desarrolladas en los explantes transformados con el gen WUSCHEL, permitieron corroborar el origen embriogénico.
- El Northern reverse sugiere la presencia de los transcritos correspondientes al gen WUSCHEL en los explantes posiblemente transformados de *C. chinense*, los cuales están ausentes en los explantes no transformados.
- Se estableció un sistema de transformación genética mediante *A. tumefaciens* para *C. chinense*, útil para introducir genes funcionales.

# Capítulo 8

## Perspectivas

- Micropropagar *in vitro*, las plántulas de *C. chinense* transformadas con el gen heterólogo de *A. thaliana WUSCHEL*. Con el objetivo de multiplicar el material vegetal posiblemente transformado.
- Realizar otros Southern Blots considerando un mayor número de plantas posiblemente transformadas con el objetivo de evaluar la estabilidad del transgen.
- Cultivar ex vitro las plántulas de C. chinense regeneradas y transformadas (quiméricas) con el gen heterólogo WUSCHEL de A. thaliana. Con el objetivo de obtener plantas en el invernadero con frutos, para extraer las semillas y cultivarlas ex vitro.
- Evaluar la progenie derivada de las plantas posiblemente transformadas con el gen WUSCHEL. Con el objetivo de determinar la presencia del transgen en las generaciones (T1, T2 y T3), para evaluar la estabilidad del transgen.
- Emplear el sistema de transformación genética vía A. tumefaciens, desarrollado en este trabajo para incorporar otros genes de interés en Capsicum chinense. Con el objetivo de favorecer el mejoramiento genético de la especie y/o el estudio de genes particulares.