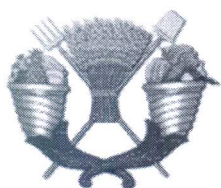


UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO



"Enseñar la explotación de la Tierra no del Hombre"

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA INSTITUTO DE HORTICULTURA

Obtención de plantas transgénicas de crisantemo
(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv. 'Indianápolis'
que acumulan trehalosa

TESIS

Que como requisito parcial
Para obtener el Título de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

MARIA DEL ROCIO VALLE SANDOVAL

Chapingo, México, Noviembre de 2008



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Instituto de Horticultura

**OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CRISANTEMO
(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) CV. 'INDIANÁPOLIS' QUE
ACUMULAN TREHALOSA**

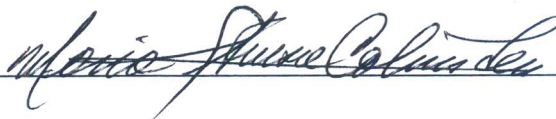
Tesis realizada por **María del Rocío Valle Sandoval** bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de: **DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA.**

PRESIDENTE:



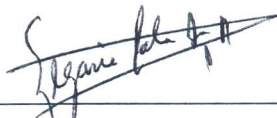
Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



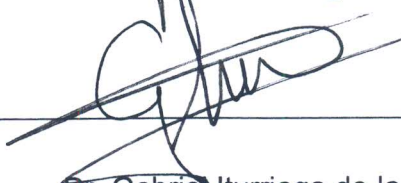
Dra. María Teresa Colinas León

ASESOR:



Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:



Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente

LECTOR EXTERNO:



Dra. Alejandrina Robledo Paz

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria (DGETA) por el otorgamiento de la Beca-Comisión para realizar esta investigación. Especialmente para el Ing. Eugenio Hernández Ortiz e Ing. Emilio Roacho Santillanez por su valioso apoyo y los ánimos para culminar este largo proceso, sin esos elementos esto no hubiese sido posible.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento recibido, sin éste apoyo la ciencia no podría avanzar en México.

A la Universidad Autónoma Chapingo por ser la generadora de tanto conocimiento, pero sobre todo al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por haberme aceptado como su estudiante y darme su experiencia, amistad y apoyo en todo momento. A todo el equipo que conforma el laboratorio de cultivo de tejidos de preparatoria agrícola del grupo AGRIBOT, por darme el espacio para hacer todo el trabajo experimental, especialmente al Maestro Isaías Gil Vázquez, a la Maestra Georgina Flores García, al Maestro Erik Rafael Navarro, a la Maestra Irma e Hilario, con quienes no sólo compartí el trabajo, sino la amistad, su gran entereza en el trabajo y la sabiduría de

formar un equipo. También, sin olvidar un agradecimiento profundo a Alejandra Varela Rojo, con quien todos los estudiantes de postgrado en el departamento de Fitotecnia encontramos un apoyo incondicional.

A mi comité asesor, grandes maestros, los cuales no sólo me dieron sus conocimientos, sino que son mis ejemplos por su calidad humana y profesional.

A mis compañeros de generación, con quienes más que un equipo de estudio, formamos una familia.

DATOS BIOGRAFICOS

La autora de la presente tesis es Maestra en Ciencias Especialista en Genética, originaria del Distrito Federal. Nació el 19 de Diciembre de 1966. Dentro de sus actividades profesionales se encuentran: formar parte del gran equipo que conforma la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria (DGETA) desde septiembre de 1992 a la fecha, realizando actividades docentes y administrativas.

**OBTENCION DE PLANTAS TRANSGENICAS DE CRISANTEMO
(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS' QUE
ACUMULAN TREHALOSA**

**GENERATION OF TRANSGENIC PLANTS OF
CHRYSANthemUM(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv.
'INDIANÁPOLIS' THAT ACCUMULATE TREHALOSE**

Maria del Rocío Valle Sandoval¹ José Oscar Mascorro Gallardo²

RESUMEN GENERAL

El crisantemo es uno de los cultivos ornamentales más demandados en nuestro país, solo después de las rosas y los claveles. El alargamiento en la vida postcosecha es uno de los objetivos más importantes en estas especies. El objetivo principal fue generar mediante ingeniería genética, plantas transgénicas que acumulen trehalosa y con ello alargar la vida en postcosecha de las flores cortadas. Para ello: a) se desarrolló un protocolo eficiente de regeneración

por organogénesis directa, para las variedades 'Indianápolis' y 'Texana'; b) se duplicó la eficiencia de emisión de brotes al explorar el efecto de la glucosa en la fase de inducción de la brotación. Adicionalmente se evaluó la posibilidad de utilizar glucosa como un agente de selección positivo durante la transformación genética; c) se desarrolló un protocolo eficiente (3% de transformantes) y reproducible de transformación

genética mediante agroinfección para la variedad 'Indianápolis', y d) se generaron plantas transgénicas con los genes quiméricos 35S::ScTPS1-TPS2::NOS y Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS, de las cuales las primeras fueron caracterizadas molecular, bioquímica y fisiológicamente. Se obtuvieron 33 líneas transgénicas independientes; algunas de éstas acumularon trehalosa en cantidades de hasta 150 ng.mg⁻¹. Estas líneas en comparación con las no transgénicas poseían más contenido de clorofila (450 mg contra 75 mg). Además, presentaron anomalías en la morfología vegetativa y flor de menor tamaño y volumen, aunque los días para inducir la floración en ambas fueron similares. Las líneas transgénicas mostraron mayor tolerancia al estrés hídrico, sin embargo, esto no correlacionó positivamente con la vida postcosecha, ya que las líneas transgénicas, en particular la que mostró mayor tolerancia al estrés

hídrico, tuvo una menor vida postcosecha.

Palabras clave: Crisantemo, Trehalosa, agroinfección, estrés hídrico.

¹Tesista

²Director

GENERAL ABSTRACT

Chrysanthemum is one of the ornamental plants most in demand in Mexico, after rose and carnation. Increasing its postharvest life is one of the most important goals in this group of species. Several objectives were established in this work and achieving them will make it possible to apply the modern biotechnological tools to the genetic improvement of cut chrysanthemum. The main goal was to generate through genetic engineering transgenic plants able to accumulate trehalose, thus increasing the postharvest life of cut flowers. For this, the following was undertaken: a) an efficient protocol for regenerating shoots under tissue culture was

developed for 'Indianapolis' and 'Texana' varieties; b) the efficiency for producing shoots by applying glucose in shoot induction phase was duplicated. Additionally, the possibility to using glucose as a positive selection agent during genetic transformation was evaluated; c) an efficient and reproducible transformation protocol (3 % of transformants) by agroinfection was developed, and finally, d) transgenic plants with chimeric genes *35S::ScTPS1-TPS2::NOS* and *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS* were generated. The first group was characterized at the molecular, biochemical and physiological levels. Thirty three independent transgenic lines were generated, and some of them accumulated trehalose in values

up to around 150 ng.mg⁻¹. These lines in comparison with non-transgenic ones accumulated more chlorophyll (450 mg versus 75 mg). Moreover, some abnormalities showed up in vegetative morphology and in a smaller and more compact less flower, although the days to induce flowering were similar to the NT line. Transgenic lines showed higher tolerance to hydric stress; however this does not correlated with longer postharvest life. On the contrary, the more drought tolerant line showed a shorter postharvest life.

Key words: chrysanthemum, Trehalose, agroinfection, hydric stress.

¹Thesis author

² Thesis advisor

INDICE

	Pag.
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	3
Objetivo particular	3
Hipótesis	4
 2. REVISIÓN GENERAL DE LITERATURA.....	5
2.1 Crisantemo: origen, taxonomía y morfología.....	5
2.2 Cultivo <i>in vitro</i> del crisantemo	6
2.3 Transformación genética de crisantemo vía <i>Agrobacterium</i> .	8
2.4 La trehalosa y sus características	9
2.5 Metabolismo de la trehalosa y la señalización en plantas	13
2.6 Obtención de plantas tolerantes a diferentes tipos de estrés mediante la manipulación de los genes para la síntesis de trehalosa.....	17
2.7 Perspectivas	21

	Pag.
3. REGENERACIÓN DIRECTA <i>IN VITRO</i> DEL CRISANTEMO, <i>Dendranthema X grandiflorum</i> Kitam, A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO.....	23
Resumen.....	23
Summary.....	24
Introducción.....	25
Materiales y Métodos.....	27
Resultados.....	30
Discusión	38
Literatura Citada	41
4. EFECTO DE LA GLUCOSA EN LA ORGANOGÉNESIS DE CRISANTEMO (<i>Dendranthema X grandiflorum</i> Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS'	44
Resumen.....	44
Summary.....	45
Introducción	45
Materiales y Métodos	48
Resultados y Discusión	51
Literatura Citada	62
5. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR AGROINFECCIÓN PARA CRISANTEMO (<i>Dendranthema</i> <i>X grandiflorum</i> Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS'.....	65

	Pag.
Resumen	65
Summary	66
Introducción	67
Materiales y Métodos	69
Resultados	75
Discusión	81
Literatura Citada	86
 6. OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CRISANTEMO (<i>Dendranthema X grandiflorum</i> Kitam) QUE ACUMULAN TREHALOSA Y TOLERANTES A ESTRÉS HÍDRICO.....	 91
Resumen.....	91
Summary.....	92
Introducción	92
Materiales y Métodos	96
Resultados y Discusión	103
Literatura Citada	114
 7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....	 119
8. LITERATURA CITADA	130

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pág.
REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL		
1	Expresión de genes que sintetizan trehalosa en plantas transgénicas.....	18
REGENERACIÓN DIRECTA <i>IN VITRO</i> DEL CRISANTEMO, <i>Dendranthema X grandiflorum</i> Kitam, A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO		
2	Comparaciones múltiples de rangos para determinar el efecto de tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes y la cantidad de brotes por explante de crisantemo variedad 'Indianápolis'.	32
3	Comparaciones múltiples de rangos para determinar el efecto de tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes y la cantidad de brotes por explante de crisantemo variedad 'Texana'.....	35
EFFECTO DE LA GLUCOSA EN LA ORGANOGÉNESIS DE CRISANTEMO (<i>Dendranthema X grandiflorum</i> Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS'		

Cuadro		Pág.
4	Efecto de la glucosa en combinación con BAP y AIA sobre el porcentaje de brotación (% B) y número de brotes por explante (BE) en crisantemo cv. 'Indianápolis'.....	53
5	Análisis del efecto de diferentes concentraciones de glucosa en la frecuencia de explantes con brotación (% B).....	57
6	Análisis del efecto de diferentes concentraciones de la hormona 6-Bencilaminopurina (BAP) en la frecuencia de explantes con brotación (% B).....	57
7	Análisis del efecto de diferentes concentraciones de la hormona ácido indolacético (AIA) en la frecuencia de explantes con brotación (% B).....	58
8	Análisis del efecto de la interacción glucosa y la hormona BAP en la frecuencia de explantes con brotación (% B).....	59
9	Análisis del efecto de la interacción glucosa y la hormona AIA en la frecuencia de explantes con brotación (% B).....	60
10	Análisis del efecto de la interacción de las hormonas BAP y AIA en la frecuencia de explantes con brotación (% B).....	61

**PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR
AGROINFECCIÓN PARA CRISANTEMO
(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv.
'INDIANÁPOLIS'**

- | | | |
|----|---|----|
| 11 | Comparación de frecuencias de la presencia de expresión estable del gen <i>GUS</i> en la transformación genética de crisantemo variedad 'Indianápolis'..... | 72 |
|----|---|----|

**OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE
CRISANTEMO (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam)
QUE ACUMULAN TREHALOSA Y TOLERANTES A
ESTRÉS HÍDRICO**

- | | | |
|----|---|-----|
| 12 | Comparación de datos morfológicos entre las líneas transformadas de crisantemo cv. 'Indianápolis' y las no transformadas..... | 107 |
|----|---|-----|

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
REVISIÓN DE LITERATURA GENERAL		
1	Estructura de la trehalosa, los caminos metabólicos generales implicados en su biosíntesis y degradación. ..	13
2	Interacción de la trehalosa-6-fosfato (T6P) con la hexocinasa (HXK) y las vías de señalización de azúcares.	16
 REGENERACIÓN DIRECTA <i>IN VITRO</i> DEL CRISANTEMO, <i>Dendranthema X grandiflorum</i> Kitam, A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO		
3	(A) Cultivo <i>in vitro</i> , después de tres semanas de subcultivo, (B) Fase de enraizamiento a las dos semanas cultivo, (C) Aclimatización en invernadero, (E) Transferencia a maceta, (F) Plantas de crisantemo variedad 'Indianápolis' en floración después de 17 semanas de crecimiento a partir de segmentos de tallo...	34

Figura		Pág.
4	A) Cultivo <i>in vitro</i> , después de 2 semanas, (B) Fase de alargamiento a las dos semanas, (C) Fase de enraizamiento, (D) Aclimatización en invernadero, (E) Transferencia en maceta, (F) Plantas de crisantemo variedad 'Texana' con flores después de 18 semanas de crecimiento a partir de segmentos de tallo.....	37

**EFFECTO DE LA GLUCOSA EN LA ORGANOGÉNESIS
DE CRISANTEMO (*Dendranthema X grandiflorum*
Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS'**

5	Brotes por explante (NB) en cada uno de los tratamientos.	51
6	Porcentaje de brotes por explante (%B) en cada uno de los tratamientos.....	52
7	Crecimiento de los explantes en los diferentes medios. Después de dos semanas de incubación en glucosa y dos en sacarosa como fuente de carbono.....	55

**PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR
AGROINFECCIÓN PARA CRISANTEMO
(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv.
'INDIANÁPOLIS'**

- 8 (A) Vector pBI121, (B) Efecto de GUSint en bacterias en vida libre: tinción con X-gluc de la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404(p35SGUSint) (izq.) y LBA4404(pBI121) (der.). 70
- 9 (A) Explantes no transformados desarrollados en medio selectivo a los ocho días de incubación, (B) Explantes con áreas transformadas desarrollados en medio selectivo a los 25 días de incubación, (C) Brotes no resistentes y resistentes a kanamicina desarrollados a los 45 días, (D) Reacción GUS negativa observada en microscopio estereoscópico 20X, (E,F) Reacción GUS positiva en callos de 20 días de incubación, (G) Detección del gen *nptII* mediante PCR en callos desarrollados durante 20 días: M, marcador de peso molecular; T, callos transgénicos; NT, callos no transgénicos; CP, control positivo (vector binario)..... 79

**OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE
CRISANTEMO (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam)
QUE ACUMULAN TREHALOSA Y TOLERANTES A
ESTRÉS HÍDRICO**

- | | | |
|----|--|-----|
| 10 | Comportamiento de las flores producidas por las líneas transgénicas que acumulan trehalosa y las no transgénicas (NT). El número anotado en la esquina inferior izquierda corresponde a la calificación de senescencia asignado en la escala 0 a 3. Los cuatro estadios se muestran con la línea NT..... | 103 |
| 11 | Plantas de crisantemo. (A) no transgénicas desarrolladas en medio no selectivo, (B) no transgénicas desarrolladas en medio selectivo, (C) transgénica en medio selectivo. | 105 |
| 12 | Amplificación por PCR de un fragmento de 780 pb del gen <i>nptII</i> , empleado como gen de selección al hacer la transformación genética. En el control positivo (C+) se amplificó el fragmento de <i>Arabidopsis</i> transformada con el vector pBI121 que también lleva el gen <i>nptII</i> | 105 |
| 13 | Plantas de crisantemo transgénicas y no transgénicas | |

	(NT), de seis semanas de crecimiento en maceta y bajo condiciones de invernadero.....	106
14	Contenido de trehalosa en 20 líneas transgénicas analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. El control (-) son plantas no transgénicas.....	107
15	Contenido de clorofila en seis líneas transgénicas y una no transgénica.....	108
16	Efecto del contenido de trehalosa en la pérdida del peso fresco.....	109
17	Contenido relativo de agua (CRA) de líneas transgénicas y NT de 8 semanas de edad, después de 15 días sin riego.....	110
18	Experimentos de desecación y recuperación a las 24 horas después de irrigar las plantas hasta capacidad de campo. Las líneas transgénicas toleran más la sequía en comparación con la NT, pero la línea 35S-19 muestra mayor tolerancia. Se indican el número de días que las plantas se dejaron sin irrigar (De izquierda a derecha: NT, 35S-8, 35S-18, 35S-19).....	112

1. INTRODUCCIÓN

La floricultura es una actividad que ha crecido en México en los últimos años. En 1988 se cultivaron 6,700 hectáreas con flores, mismas que en la actualidad se incrementaron hasta 9,500 hectáreas, concentradas en Michoacán, Querétaro, Estado de México y Morelos. El valor de la demanda de flores en el país es de alrededor de 450 millones de dólares al año y se obtienen unos 30 millones de dólares por exportaciones de plantas ornamentales de los cuales la mayoría son ventas de empresas medianas y grandes. El cultivo de crisantemo reviste gran importancia dentro del contexto del viverismo, al ocupar el tercer lugar a nivel nacional, en lo que respecta a especies más demandadas después de las rosas y los claveles. El Estado de México es la principal entidad productora de flores en el país, con un volumen de más de 29, 661 000 ton en 2005, equivalentes a un 88 por ciento de la producción nacional de flores. El crisantemo está entre las flores más cotizadas en todas sus variedades, ya que tiene una demanda muy alta en la entidad por ser una flor tradicional, como lo es la variedad Indianápolis en la región de Texcoco (SAGARPA, 2005 y 2006). El mercado de flores demanda una calidad de flor garantizada en tamaño, color y duración de la flor después del corte. El crisantemo y algunas flores de corte sufren de marchitamiento prematuro de las hojas, sin embargo, no hay

información sobre condiciones del medio durante la precosecha que afectan los procesos después de la cosecha (Meeteren *et al.*, 2005).

Las condiciones del medio son factores severos que limitan el crecimiento y la producción de cultivos. Entre estos factores están el estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas, los cuales deshidratan los tejidos vegetales y causan daño celular irreversible y la muerte (Bray *et al.*, 2000; Bartels y Sunkar, 2005). Sin embargo, hay algunos organismos que pueden sobrevivir largos periodos en un estado de escasa humedad y tienen la capacidad de rehidratarse y comenzar sus funciones metabólicas después de que hay suministro de agua (Crowe *et al.*, 1992; Clegg, 2001). Todos estos organismos tienen en común la capacidad de sintetizar y acumular grandes concentraciones de trehalosa (Elbien *et al.*, 2003).

Algunas plantas de interés agrícola han sido transformadas genéticamente para evaluar el papel de la trehalosa en su efecto protector bajo condiciones de estrés. Entre esas plantas se encuentran el tabaco, *Arabidopsis thaliana*, arroz, papa y jitomate (Bartels y Sunkar, 2005). Los resultados han sido muy variados, pero siempre ha habido una mejora en la respuesta de las plantas a la sequía.

Hay evidencias que indican que la trehalosa podría contribuir a mejorar la calidad postcosecha de los cultivos ornamentales, pues se ha reportado que su aplicación en solución a flores cortadas de tulipán y gladiolo, alarga la vida postcosecha de éstas al mantener un contenido óptimo de agua (Iwaya-Inoue y Takata, 2001; Otsubo y Iwaya-Inoue, 2000).

Considerando lo anterior, la presente investigación, tuvo los siguientes objetivos:

Objetivo general

Obtener plantas de crisantemo que acumulen trehalosa, mediante la inserción del gen *ScTPS1-TPS2* (genes que codifican para las enzimas trehalosa-6-fosfato sintetasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*) que codifican la proteína bifuncional TPS/TPP (trehalosa-6-fosfato sintetasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa), para evaluar su comportamiento ante estrés abiótico y la vida post cosecha de las flores cortadas.

Objetivos particulares

1. Desarrollar un protocolo eficiente de cultivo *in vitro* y regeneración por organogénesis directa para al menos una variedad cultivada en la zona de influencia de la Universidad Autónoma Chapingo.
2. Establecer un protocolo eficiente y reproducible de transformación genética por agroinfección para la variedad seleccionada.

3. Obtener líneas transformadas con las construcciones quiméricas 35S::ScTPS1-TPS2::NOS y Rd29A::ScTPS1::NOS, que acumulen trehalosa endógenamente.
4. Evaluar el fenotipo de las líneas transformadas en su tolerancia a la escasez de agua y la calidad post cosecha de la flor después del corte.

La hipótesis bajo la cual se desarrolló la investigación fue:

HIPÓTESIS

La síntesis y acumulación trehalosa endógena en las plantas transformadas con *ScTPS1-TPS2* les conferirá tolerancia a estrés hídrico y les permitirá producir flores con mayor vida postcosecha.

2. REVISIÓN GENERAL DE LITERATURA

2.1. El crisantemo: origen, taxonomía y morfología.

El crisantemo (*Dendrathera X grandiflorum* Kitam), también conocido como crisantemo ornamental, proviene del vocablo griego *Krus anthemon*, que significa “flor dorada”. Es una planta originada de Asia Oriental donde se ha cultivado desde hace más de 2000 años (Texeira da Silva, 2003).

Pertenece a la familia Asteraceae y probablemente se originó de híbridos entre especies tetraploides de *D. indicum* var. *Procumbens* (Lour.), nativa del norte de China, con una especie diploide de *D. zawadskii* var. *Latilobum* (Maxim.), nativa de China Central; no obstante éstas son hipótesis, ya que el verdadero origen aún no está claro (Fukai, 2003).

El crisantemo que actualmente cultivan los floricultores es un híbrido complejo y la mayoría de las especies de donde se han generado los cultivares actuales son originarias de China (Fukai, 2003). Las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, liguladas o rugosas, de color variable entre el verde claro y oscuro, cubiertas de un polvillo blanquecino que les da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas. Lo que se conoce como flor es realmente una

inflorescencia en capítulo. Existen diversos tipos de capítulos cultivados comercialmente aunque en general esta inflorescencia está formada por dos tipos de flores: femeninas (radiales, que se corresponden con la hilera exterior de las margaritas) y hermafroditas (concéntricas, ubicadas en el centro de la inflorescencia). El receptáculo es plano o convexo y está envuelto de brácteas (Fukai, 2003). Las variedades cultivadas se obtienen por hibridación, seleccionándolas por la forma y color de la flor, así como para adaptabilidad y calidad de la cosecha (Kofranek, 1988).

2.2. Cultivo *in vitro* del crisantemo

El crisantemo se propaga vegetativamente a través de estacas o esquejes. Los programas de mejoramiento se han enfocado a mejorar varias características para incrementar el valor ornamental, incluyendo color de la flor, tamaño, forma y calidad. Aunque las características deseables han sido introducidas por mejoramiento clásico, esta técnica tiene sus limitaciones. Primero, hay un número reducido de genes que puedan explotarse en programas de mejoramiento. Segundo, las cruzas dependen de la incompatibilidad o diferencias en el nivel de ploidía entre progenitores. Tercero, las características tales como crecimiento uniforme y sincronía en la floración son poligénicas. Además, las cruzas sexuales pueden alterar el delicado balance de factores que determinan el crecimiento y desarrollo (Texeira da Silva, 2003). La biotecnología ofrece la posibilidad de desarrollar nuevo germoplasma. Las

técnicas de estimulación de yemas axilares o cultivo de secciones nodales *in vitro* son las que más se usan en la micropropagación (Rout *et al.*, 2006). Un número de factores han influenciado la inducción de la morfogénesis en crisantemo. Rout & Das (1997) y Teixeira (2003) han hecho revisiones amplias de los avances de la biotecnología del crisantemo. Se ha enfatizado en la aplicación del cultivo *in vitro* para la propagación en masa y también se ha discutido de las varias posibilidades para mejorar el crisantemo mediante las herramientas de la biotecnología moderna. Prasad *et al.* (1983) reportó que el promedio de multiplicación de brotes depende del genotipo. La frecuencia de regeneración y número de brotes por explante es diferente entre variedades, por lo que no existe un protocolo general (Young *et al.*, 2003). Un número importante de investigaciones que han usado diferentes especies y variedades, medios de cultivo, reguladores de crecimiento, combinaciones y concentraciones de aditivos al medio de cultivo (por ejemplo, el uso de la sacarosa en diferentes concentraciones o de nitrato de plata), produjeron brotes de diferentes tipos de explantes: tallos (nodal o internodal), yemas axilares, hojas, meristemos y yemas apicales, protoplastos, raíces, pedicelos, pétalos y otras partes de la planta (Teixeira, 2004). Los estudios de regeneración principalmente se han enfocado a la eliminación de la variación somaclonal y obtención de quimeras, fenómenos a menudo asociados con regeneración indirecta vía callo (Pillai y Zulkifli, 2000). En cuanto a la aclimatización en invernadero, como los crisantemos generalmente se propagan como esquejes, este proceso no involucra mayor dificultad, siendo la sobrevivencia del 100 %.

2.3. Transformación genética de crisantemo vía *Agrobacterium*

La susceptibilidad del crisantemo a *Agrobacterium* ha sido demostrada desde 1975, con el descubrimiento de la agalla de la corona debido a la agroinfección en diferentes partes de la planta de *C. morifolium* (Rout *et al.*, 2006). Se han aislado cepas específicas de *A. tumefaciens* a partir de agallas de la corona de *D. grandiflora* (Rout *et al.*, 2006). Los primeros experimentos que se desarrollaron en 11 variedades de crisantemo usaron el método de disco de hoja y revelaron que la eficiencia de transformación era genotipo dependiente. Debido a esto, se han reportado bajas eficiencias de transformación, donde además, resaltan en los protocolos las inconsistencias y su baja repetitividad. Se ha determinado una estrecha relación entre el éxito de la transformación mediada por *Agrobacterium* y la eficiencia de regeneración. En las revisiones de Teixeira (2003 y 2005), se muestra que de los 50 casos de transformación en crisantemo reportados, los explantes que se usaron fueron: hoja (50 %), tallo (22 %), hoja/tallo (14 %), raíces (2 %) y partes florales (2 %). El agente selectivo fue: kanamicina (80 %), gentamicina (4 %), higromicina (10 %), Glufosinato de amonio (2 %) y paramomicina (2 %). Además, cuando se uso kanamicina, en más de la mitad de los estudios se emplearon concentraciones menores a 25 mg.L⁻¹. Las cepas usadas fueron: LBA4404 (56 %), EHA101/105 (22 %), AGL0/1 (20 %), A281 (10 %) y otras (28 %). Sólo un estudio reportó el uso de *A. rhizogenes*. El agente para eliminar *Agrobacterium* después de la fase de cocultivo fue: cefotaxima (64 %), vancomicina (26 %), carbenicilina (16 %),

ticarcilina (16 %), solo o combinados. Estos agentes fueron aplicados en la mayoría de los casos (84 %) en concentraciones mayores a los 250 mg.L⁻¹. Las eficiencias de transformación de crisantemo varían desde 0 a 35 %, donde los factores determinantes han sido la regeneración, la cepa bacteriana y la presión de selección (Teixeira, 2003; Teixeira, 2004).

2.4. La trehalosa y sus características.

Los azúcares son fundamentales para la vida. Los disacáridos no reductores juegan un papel único en la biosfera. Proporcionan una fuente soluble de energía en forma de una molécula estable que puede funcionar como un compuesto protector. La trehalosa y la sacarosa son los dos azúcares no reductores que tienen esta característica. La trehalosa es sintetizada por todos los organismos excepto por los animales vertebrados. Es el principal azúcar en la sangre de artrópodos, que se utiliza como combustible para volar en los insectos. La trehalosa se encuentra también en altas concentraciones en hongos, bacterias y arqueobacterias. Ésta es el precursor para la síntesis de quitina (Merzendonfer *et al.*, 2003), como lo es la sacarosa para la síntesis de polisacáridos de la pared celular en las plantas. Las plantas son únicas en lo que se refiere al proceso de síntesis de ambos azúcares no reductores; sin embargo, la sacarosa tiene la función principal de ser el azúcar translocado en las plantas. La trehalosa se encuentra en cantidades milimolares en unas cuantas plantas, denominadas especies especializadas en la resurrección, donde se cree las protege de la desecación (Crowe *et al.*, 1992). En la vasta

mayoría de las plantas la trehalosa está presente en cantidades traza (por debajo de concentraciones micromolares). La sacarosa es más soluble que la trehalosa, particularmente a bajas temperaturas, por esta razón es el azúcar más adecuado para el transporte en plantas en el floema en concentraciones tan altas como 1 M. Las plantas pueden acumular compuestos protectores además de la trehalosa (polímeros de sacarosa, fructosa, rafinosa entre otros), debido a que concentraciones altas de trehalosa son incompatibles con las proteínas asistidas por chaperonas durante la recuperación de una condición de estrés (Leyman *et al.*, 2001).

La trehalosa fue identificada inicialmente como un componente en el hongo del cornezuelo del centeno en 1832 (Crowe *et al.*, 1998). El nombre de trehalosa fue introducido en 1858 cuando se encontró en las secreciones de los capullos de los escarabajos del desierto del Medio Oeste, *Larinus nidificans* y *L. maculatus*. Estas secreciones, eran conocidas por gentes nativas por ser comestibles y dulces, por lo que fueron llamadas “trehala maná” (Crowe *et al.*, 1998). La trehalosa siempre ha sido parte de la dieta en los humanos como un componente de hongos comestibles, crustáceos marinos, levaduras del pan y la cerveza. A su vez, este azúcar ha sido reconocido por su habilidad protectora, por su estabilidad y baja reactividad. Entre sus características se pueden mencionar su capacidad para soportar temperaturas mayores a 100 °C, un pH entre 3.5 a 10 durante 24 horas, protege proteínas y membranas de la desnaturalización mediante el reemplazo de agua como enlace de hidrógeno para residuos polares, durante la desecación forma una estructura cristalina

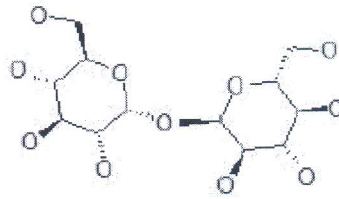
amorfa que limita el movimiento molecular, evitando la agregación de proteínas y difusión de radicales libres; la configuración del enlace α,α -1,1 (Figura 1) es crucial para conservar la estructura de la bicapa lipídica de las membranas celulares en ausencia de agua (Albertorio *et al.*, 2007; Brumfiel G, 2004; Crowe *et al.*, 1998; Wolkers *et al.*, 2003). La trehalosa enmascara sabores y olores desagradables y tiene su propio sabor dulce, de aproximadamente la mitad de dulce que la sacarosa; por esta última razón la trehalosa es un ingrediente importante en productos alimenticios y bebidas como un estabilizador y preservador aún de productos frescos (Schiraldi *et al.*, 2002). También puede usarse como un crioprotector de células en medicina y microbiología, además de ser un componente básico en la producción de cosméticos. La precisa asociación de la trehalosa con el estrés no ha sido muy clara. Por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* un incremento en el contenido de trehalosa se correlaciona con sobrevivencia bajo condiciones de desecación, pero cepas mutantes que no sintetizan la enzima trehalosa fosfato sintetasa (TPS) son también tolerantes a la desecación. La trehalosa no es ni necesaria ni suficiente para sobrevivir a la desecación (Ramakumar y Tunnacliffe, 2006).

En lo referente a la síntesis de la trehalosa, hay cinco rutas que se dan en la naturaleza. Solo una de ellas, la vía OtsA-OtsB, produce el intermediario trehalosa-6-fosfato, que al parecer es fundamental en las plantas (Eastmond *et al.*, 2003). Esta vía es la más distribuida y se encuentra en todos los organismos procariontes y eucariontes que sintetizan la trehalosa y es la única

vía detectada en las plantas. La ruta OtsA-OtsB, involucra la participación de la enzima TPS que cataliza la transferencia de una molécula de glucosa de la uridina difosfato glucosa (UDPG) a glucosa-6-fosfato (G6P) para formar trehalosa-6-fosfato (T6P) y uridín difosfato (UDP). Posteriormente la enzima trehalosa fosfato fosfatasa (TPP) desfosforila a la T6P para formar trehalosa y fosfato inorgánico (Bell *et al.*, 1998) (Figura 1).

Los primeros datos de la presencia de trehalosa en plantas estuvieron restringidos a las llamadas plantas de resurrección, por ejemplo, especies de *Selaginella* y *Myrothammus flabellifolia*, así como otros hallazgos curiosos como la presencia de trehalosa en exudados tipo maná en flores. La falta de reportes en la mayoría de las plantas, llevó al supuesto de que la trehalosa era de relevancia mínima. La primera publicación sobre la posible existencia de la vía de biosíntesis de trehalosa en las plantas se dio cuando se aisló el gen AtTPS1 de *Arabidopsis thaliana* mediante complementación funcional de la mutante *tps1* de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* (Blázquez *et al.*, 1997). Poco tiempo después se encontró, analizando el genoma de *Arabidopsis*, toda una familia de genes codificantes de *TPSs* y otra para *TPPs* (Goddijn y van Dun, 1999; Leyman *et al.*, 2001).

A



B



C



Figura 1: Estructura de la trehalosa (A) y los caminos metabólicos generales implicados en su biosíntesis y degradación (B), caracterizada en diferentes especies de levaduras (C)

2.5. Metabolismo de la trehalosa y la señalización en plantas

En plantas, parece que la principal función de la biosíntesis de la trehalosa, excepto en las plantas denominadas de resurrección, es la de regular el metabolismo. La función regulatoria es desarrollada, en parte, por la T6P (Paul, 2007; Eastmond *et al.*, 2003). No hay evidencia de otras actividades regulatorias de la TPS1 de plantas, aunque otras TPSs que no tienen actividad catalítica (*AtTPS5-11*) pudieran estar asociadas con funciones regulatorias. La expresión de los genes de *E. coli otsA* restaura la condición mutante *tps1* (Schluepmann *et al.*, 2003). Esta restauración de la condición mutante

probablemente no se debe al efecto regulatorio de la enzima TPS codificada por *otsA*. Sin embargo, las proteínas tanto de plantas como de bacterias sintetizan T6P. Las cantidades relativas de T6P son distintas en *A. thaliana* cuando se expresan los genes *otsA* y *otsB* (Schluepmann *et al.*, 2003). Estas cantidades de T6P afectan el crecimiento de plantas transgénicas de *A. thaliana* en sacarosa. Altos niveles de T6P estimula el crecimiento de plantas transgénicas en sacarosa comparado con el de plantas no transgénicas. Contrariamente, bajos niveles de T6P afecta la habilidad de la planta para utilizar sacarosa. La cantidad de T6P está inversamente relacionada a las cantidades de hexosas fosfatos y UDPG (Pellny *et al.*, 2004; Schluepmann *et al.*, 2003) sugiriendo que la T6P pudiera regular las cantidades de estos intermediarios. T6P no está únicamente involucrada en regular el uso de la sacarosa, sino también en las cantidades de T6P que también responden fuertemente a la sacarosa. En un estudio reciente, se observó un incremento de 27 veces en los niveles de T6P en tres horas en respuesta a un suministro de sacarosa (Lunn *et al.*, 2006). En plantas la T6P es sintetizada a partir de glucosa-6-fosfato (G6P) y UDPG, que son los productos catabólicos de la sacarosa. UDPG se produce directamente a través de la enzima sacarosa sintetasa; G6P es producida de glucosa a través de la invertasa y hexocinasa o fructosa y fructosa-6-fosfato (F6P) por la acción de la sacarosa sintetasa, fructocinasa y fosfoglucosa isomerasa. El rápido incremento de la T6P al suministrar de sacarosa puede ser una respuesta a un cambio en el tamaño de la reserva de G6P y UDPG, sustratos de la enzima TPS1 que se expresa constitutivamente. De este modo, los niveles de T6P pudieran reflejar la disponibilidad de las hexosas fosfato, UDPG y sacarosa,

debido a que la sacarosa alimenta este reservorio. La F6P estimula la síntesis de trehalosa en levaduras (Londesborough y Vuorio, 1993), de ahí que la síntesis de trehalosa reflejaría los niveles de este metabolito. Es interesante resaltar que los niveles de T6P, hexosas fosfato y UDPG se estabilizan y caen tres horas después de suministrar sacarosa (Lunn *et al.*, 2006), lo cual sustenta la observación en plantas transgénicas donde la T6P pudiera regular el tamaño de las reservas de sacarosa (Paul *et al.*, 2008).

UDPG y G6P son dos moléculas centrales de las cuales se derivan funciones celulares –energía para la respiración y esqueletos de carbono para la síntesis de celulosa, pared celular, polisacáridos, almidón, lípidos, proteínas y sacarosa (Figura 2). UDPG tiene particular importancia en plantas ya que es un elemento esencial para la síntesis de la pared celular. La trehalosa se forma a partir de UDPG y G6P, por lo tanto juega un papel central en el metabolismo y desarrollo vegetal, sin embargo, la trehalosa no es un producto terminal vital, ya que es eliminada en el flujo metabólico principal. La síntesis de T6P y trehalosa pueden actuar potencialmente como un indicador del tamaño de las reservas de G6P y UDPG sin comprometer otras funciones. La importancia de esta reserva en determinar el crecimiento fue confirmada recientemente en un estudio con una línea recombinante de *A. thaliana*, en el cual se observó fuerte segregación transgresiva de la biomasa, la cual muestra una estrecha relación entre el tamaño de la reserva de hexosas fosfatos y la biomasa (Meyer *et al.*, 2007; Paul *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2008). En el mismo estudio los niveles de trehalosa y biomasa mostraron una correlación positiva, aunque la razón no fue clara.

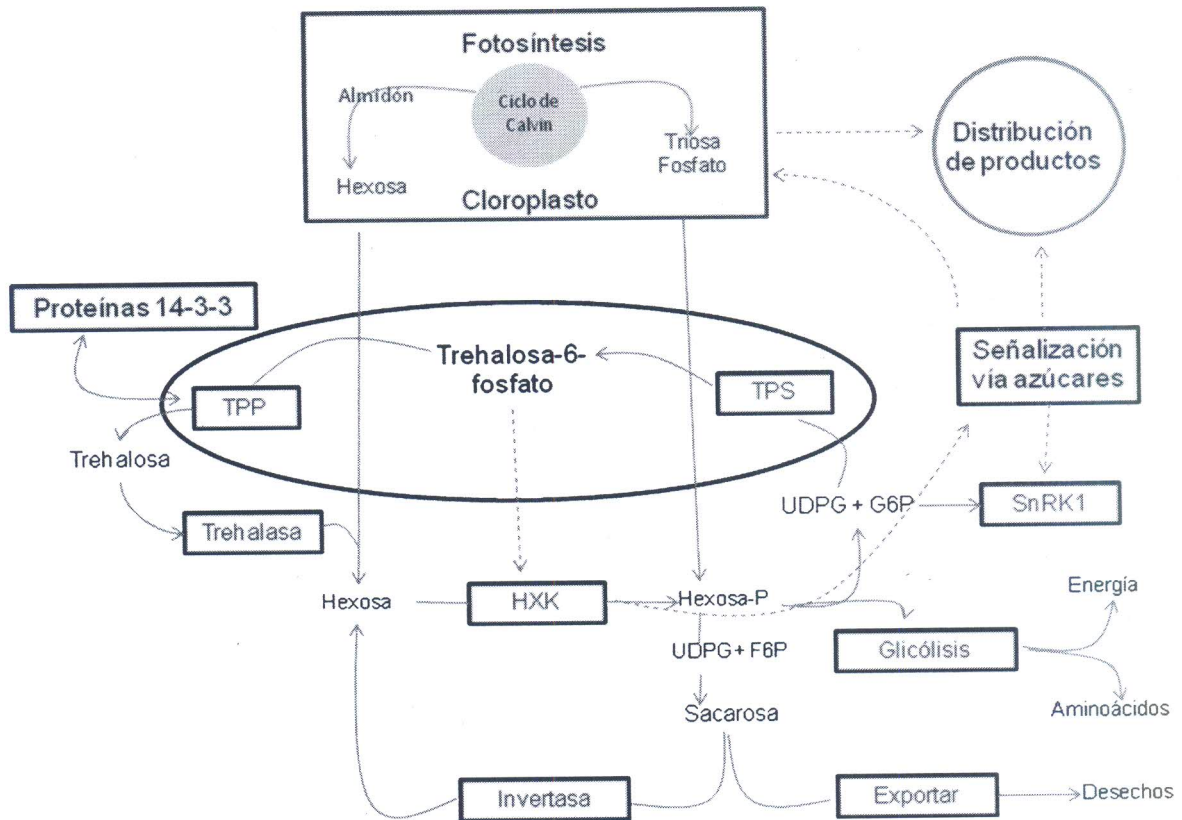


Figura 2: Interacción de la trehalosa-6-fosfato (T6P) con la hexocinasa (HXK) y las vías de señalización de azúcares (Paul et al., 2008).

En el metabolismo del almidón se ha encontrado una estrecha relación entre la T6P y la acumulación de almidón. En un estudio se observó que esta acumulación se da en respuesta al suministro de trehalosa y la regulación transcripcional de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), la cual es clave en la síntesis de almidón. La T6P activa a la AGPasa a través de un mecanismo de oxidación reducción de activación dependiente de tioredoxina

(Kolbe *et al.*, 2005). Este mecanismo de activación opera bajo condiciones de alta concentración de sacarosa, la cual induce altos niveles de T6P (Lunn *et al.*, 2006; Schluepmann *et al.*, 2003). Este hallazgo nuevamente apoya el concepto de que T6P refleja las condiciones de altas concentraciones de asimilados y comunica estas condiciones al cloroplasto para activar la síntesis de almidón (Paul *et al.*, 2008).

La mutante *tps1* de *Arabidopsis thaliana* es letal, ya que impide el desarrollo del embrión. Este trabajo con la mutante *tps1*, mostró que la TPS1 se requiere para una etapa del desarrollo, básicamente en la fase de torpedo y al final de la embriogénesis temprana (Baud y Graham, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Eastmond *et al.*, 2002;).

2.6. Obtención de plantas tolerantes a diferentes tipos de estrés mediante la manipulación de los genes para la síntesis de trehalosa.

El estrés abiótico es una de las mayores limitantes de la producción de cultivos y su rendimiento. La sequía y la salinidad afectan más del 10 % de la tierra arable disminuyendo el rendimiento de la mayoría de los cultivos en alrededor del 50 %. Debido a esto, hay necesidad de mejorar la tolerancia al estrés causada por las condiciones adversas del medio. Durante décadas los fitomejoradores han intentado a través de la aplicación de técnicas tradicionales obtener cultivos resistentes a sequía, salinidad y otros estreses abióticos. Por lo

tanto, para los ingenieros genéticos, la tolerancia al estrés ha sido uno de los principales objetivos de la investigación agrícola (Miranda *et al.*, 2007).

La transformación genética con los genes involucrados en la síntesis de trehalosa, ha permitido un mejorar de la tolerancia al estrés en diferentes especies de plantas, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Expresión de genes que sintetizan trehalosa en plantas transgénicas (Penna, 2003)

Origen	Gen usado	Promotor	Planta Usada	Efectos
<i>E. coli</i>	<i>otsA, otsB</i>	Constitutivo (CaMV35S)	Tabaco	Mejora el crecimiento bajo condiciones de estrés, produce alteraciones fisiológicas.
Levadura	TPS	Tejido-específico <i>rbcS</i>	Tabaco	Altos niveles de trehalosa
Levadura	TPS1	Constitutivo (CaMV35S)	Tabaco	Crecimiento achaparrado, hojas deformes, reducido contenido de sacarosa y tolerancia a sequía.
<i>E. coli</i>	TPS	Específico de tubérculos (Patatina)	Papa	No se detectó síntesis de trehalosa.
<i>E. coli</i> y levadura	TPS TPP	Constitutivo (CaMV35S)	Tabaco	Incrementa la fotosíntesis (TPS) Reduce la fotosíntesis (TPP)
<i>E. coli</i>	<i>otsA, otsB</i>	Tejido específico (<i>rbcS</i>) y dependiente al estrés (inducible por ácido abscísico)	Arroz	Mantiene el crecimiento vegetal, menos daño foto-oxidativo, balance mineral favorable (bajo estrés salino, sequía y bajas temperaturas) y más trehalosa, incrementa la tolerancia al estrés.

Las plantas de tabaco transformadas con el gen *TPS1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* acumularon trehalosa cuantificable y mostraron una

marcada tolerancia a la sequía, un reducido contenido de sacarosa y algunos cambios morfológicos como menor crecimiento y hojas deformes. Asimismo, las plantas de tabaco transformadas con los genes bacterianos *OtsA* o *TPS1* tuvieron una mayor habilidad para retener agua y fotosintetizar bajo condiciones de estrés hídrico, mientras que las plantas que llevaban el gen *OtsB* (actividad TPP) tuvieron niveles reducidos de fotosíntesis. En ambos tipos de plantas de tabaco se produjeron pequeñas cantidades de trehalosa ($\leq 0.5 \mu\text{mol g}^{-1}$ peso fresco) mediante la expresión constitutiva de los genes (Pilon-Smits *et al.*, 1998).

En el caso de *Arabidopsis thaliana*, se observó que las plantas que expresaban TPS con un promotor constitutivo eran de color verde oscuro con una acumulación de antocianinas a lo largo de los bordes de los cotiledones. Las hojas se agrupaban en forma de roseta, más pequeñas y más verdes comparadas con las que no eran transgénicas. Las plantas maduras produjeron muchas hojas y el número de semillas en las primeras flores fue pobre. La acumulación de trehalosa pudo obtenerse también en tabaco usando un promotor tejido específico (subunidad pequeña de la Rubisco) (Holmstrom *et al.*, 1996). En papa, la expresión del gen de la TPS fue dirigida por un promotor específico de tubérculo; sin embargo no se detectó la síntesis de la trehalosa. Los bajos niveles o la ausencia de trehalosa en plantas transgénicas puede explicarse por la actividad de una trehalasa específica. La trehalasa contribuye a la degradación de la trehalosa y al añadir el inhibidor de trehalasa (validamicina A) hace que la trehalosa se acumule (Goddijn y van Dun, 1999).

De ahí que, se han establecido varias estrategias entre las que se encuentran, la acumulación de trehalosa mediante la inactivación de la trehalasa o mediante la expresión de los genes para que la biosíntesis este bajo la regulación de promotores tejido específico o inducibles.

Una investigación basada en las estrategias anteriores, fue sobreproducir trehalosa en plantas transgénicas de arroz usando un promotor inducible por estrés o tejido específico de una construcción bifuncional de la trehalosa-6-fosfato sintetasa/fosfatasa (TPSP) (Garg *et al.*, 2002). La sobreexpresión regulada de la fusión genética llevó a la acumulación de trehalosa únicamente bajo condiciones de estrés salino. Tal estrategia involucró un solo evento de transformación. Las plantas de arroz transgénicas mostraron cantidades elevadas de trehalosa y altos niveles de tolerancia a estrés, salino, hídrico y bajas temperaturas. Las plantas al ser expuestas a 100 mM de NaCl durante cuatro semanas bajo condiciones hidropónicas, crecieron bien, florecieron y produjeron semillas, aún después de eliminar las condiciones de estrés. Los autores también encontraron que las líneas transgénicas sujetas a dos ciclos de 100 horas de estrés hídrico y subsecuente hidratación por tres semanas, tuvieron buen crecimiento comparado a la marchitez por sequía en plantas no transgénicas. Las plantas transgénicas también mostraron una mejor función del fotosistema II y mayor capacidad fotosintética bajo condiciones no estresantes. Bajo cada una de las condiciones de estrés, las líneas transgénicas mostraron un crecimiento normal, similar a las plantas no transgénicas (Datta, 2002). Un trabajo similar se realizó en *Arabidopsis thaliana*,

la cual fue transformada con una construcción bifuncional de los genes *ScTPS1-TPS2* de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, donde se observó que las plantas transgénicas eran resistentes a condiciones extremas de sequía, calor, frío y salinidad sin que las plantas mostraran anormalidades morfológicas (Miranda *et al.*, 2007). Las cantidades de trehalosa que acumulan las plantas transgénicas no son tan altas como para que la función principal de este azúcar sea como agente osmótico, aunque si como osmoprotector. Mas bien el principal efecto podría deberse a que al manipular la vía, se altera la expresión de genes relacionados con la respuesta adaptativa de las plantas al estrés, como el ABI4, y el cual está involucrado en la transducción de señales por ABA (Avonce *et al.*, 2004).

2.7. Perspectivas

Con este conocimiento generado, se ofrecen posibilidades de obtener plantas transgénicas de diversos cultivos con tolerancia a varios tipos de estrés. También será posible manipular la fotosíntesis y la distribución de carbohidratos manipulando el metabolismo de la trehalosa. Además hay la posibilidad de poder entender el papel del metabolismo de la trehalosa en las interacciones planta-microorganismo, de tal forma que sea factible desarrollar nuevas estrategias para el control de enfermedades causadas por hongos y bacterias. Será interesante probar si la acumulación endógena de la trehalosa en cultivos

de interés agrícola, como las plantas ornamentales, tiene algún efecto sobre la conservación postcosecha (Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005).

3. REGENERACIÓN DIRECTA *IN VITRO* DEL CRISANTEMO (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO

RESUMEN

Para la aplicación de la biotecnología moderna en un programa de mejoramiento es indispensable contar con un sistema de regeneración *in vitro* eficiente. Se desarrolló un protocolo reproducible y efectivo, en cuanto a la obtención de más brotes por explante, de regeneración por organogénesis directa, para dos variedades de crisantemo (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) 'Indianápolis' y 'Texana', las cuales son comercialmente importantes en la región de Texcoco, Estado de México. Se evaluó el efecto del tipo de explante (hoja o tallo), distintos niveles y combinaciones de las auxinas ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) y la citocinina benzilaminopurina (BAP). La variedad 'Indianápolis' mostró un mayor porcentaje de brotes por explante en medio de Murashige y Skoog (MS) con 2 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIA. En cambio, la variedad 'Texana' requirió 3 mg L⁻¹ de BAP y 1.8 mg L⁻¹ de AIA. En ambas variedades el alargamiento de los brotes y

la inducción de raíces se obtuvo en el medio MS al 100 y 50 % de sus sales y sin hormonas.

PALABRAS CLAVE: *Dendranthema X grandiflorum*, cultivo *in vitro*, regeneración de plantas, organogénesis.

SUMMARY

Modern application of biotechnology in a breeding program needs to be provided with an efficient system of regeneration *in vitro*. An efficient and reproducible (especially for the number of shoots for explants) protocol of regeneration for direct organogenesis was developed, for two varieties of chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) 'Indianapolis' and 'Texana', which are commercially important in the region of Texcoco state of Mexico. The explants types (leaf or stem) were evaluated with different levels and combinations of auxins, naftalenacetic (ANA) and indolacetic (IAA) acids, and the cytokinin benzylaminopurine (BAP). The variety 'Indianapolis' showed the best percentage of shoots for explant on the medium Murashige and Skoog (MS) with 2 mg L⁻¹ BAP and 1 mg L⁻¹ IAA, while the variety Texana 3 mg L⁻¹ of BAP and 1.8 mg L⁻¹ IAA. In both varieties lengthening of shoots and induction of roots was obtained in the MS 100% and 50% of its salts and without adding hormones.

KEY WORDS: *Dendranthema X grandiflorum*, *in vitro* culture, regeneration of plants, organogenesis.

INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) se encuentra entre los tres cultivos ornamentales más importantes a nivel mundial, con un enorme valor económico y cultural (Boase *et al.*, 1997). Las variedades comerciales se propagan vegetativamente por esquejes y estaquillas o *in vitro*, a partir de meristemos para obtener plantas sanas. La organogénesis es un proceso que comprende el desarrollo de vástagos o raíces directamente de los explantes o a partir de un callo desarrollado previamente (regeneración indirecta). Murashige (1974) y Narayanaswamy (1977) describieron los factores relacionados con el explante (edad fisiológica y ontogénica, el tamaño y el tejido u órgano del que es extraído) y con la planta madre (estado fisiológico) que depende de la época del año en que se realiza el cultivo. Estos factores deben ser considerados para la inducción exitosa de la organogénesis. La regeneración de crisantemo por cultivo de tejidos en diferentes variedades, se ha logrado al utilizar medios basales, diferentes reguladores de crecimiento y concentraciones, aditivos como antioxidantes y otros. La organogénesis se desarrolla a partir de una gran variedad de explantes como tallos (nodal e internodal), yemas axilares, hojas, ápices o meristemos apicales, protoplastos, raíces, pedicelos y floretes. Los datos que se muestran en la amplia revisión que hace Teixeira (2003), resaltaron la importancia de esta tecnología para efectos de un programa de mejoramiento, que tenga como objetivo obtener plantas con nuevas características mediante ingeniería genética. La regeneración indirecta de brotes adventicios vía callo fue obtenida a partir de tallo, pétalo y ápice, sin

embargo, este tipo de regeneración puede resultar en variantes somaclonales y la formación de quimeras, mientras que la regeneración directa de hoja y tallo puede eliminar tales efectos (Teixeira 2003). El cultivo de *Chrysanthemum morifolium*, ha permitido inducir una gran variación somaclonal (Pillai & Zulkifli, 2000). Generalmente, el tallo ha mostrado mayor capacidad de regeneración que la hoja (Gao *et al.*, 2001).

Aún cuando se han establecido protocolos eficientes de regeneración para distintas variedades, se destaca que éstos son genotipo dependientes y difíciles de adaptar directamente a otras variedades (Teixeira 2003), por lo que, para desarrollar un protocolo de transformación genética se debe establecer primero un sistema de regeneración que produzca un mayor porcentaje de formación de brotes de la variedad que se pretende manipular mediante esta tecnología. En este marco de referencia el objetivo principal fue desarrollar una nueva variedad de crisantemo mediante ingeniería genética, para lo cual en el presente trabajo se planteó determinar las condiciones óptimas para regenerar *in vitro* plantas de distintas variedades de crisantemo cultivadas comercialmente en el municipio de Texcoco, Estado de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los esquejes de crisantemo sin enraizar de tres semanas de edad fueron de las variedades: 'Indianápolis', 'Texana', 'Puma', 'Shosmy', 'Eleonora' y 'Hartmann'. Los esquejes crecieron en condiciones de invernadero, durante los meses de octubre a marzo. Las hojas fueron cuidadosamente eliminadas para evitar daño en la epidermis del tallo. Los tallos fueron desinfectados en una solución de detergente al 3 % (p/v) durante tres minutos, etanol al 70 % (v/v) durante un minuto, 10 minutos con una solución 1.5 % de cloro activo (Cloralex®) y 0.5 ml de Tween 20. Finalmente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar. Posterior a la desinfección, se cortaron secciones internodales aproximadamente de 2 mm de longitud, las cuales fueron divididas en sección del área apical, media y basal para conservar la polaridad de los explantes. También, de los fragmentos de hoja se evaluó la respuesta morfogénica para determinar el efecto del explante en la organogénesis.

Medios de cultivo y condiciones experimentales

Los explantes fueron cultivados en el medio basal de Murashige & Skoog (1962), con 3 % de sacarosa y 0.6 % de agar. El medio fue suplementado con

las hormonas 6-bencilaminopurina-HCl (BAP) (SIGMA, ALDRICH) (2.0 y 3.0 mg L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (SIGMA, ALDRICH) (0.1 a 1.8 mg L⁻¹) y ácido naftalenacético (ANA) (SIGMA, ALDRICH) (0.1 a 1.0 mg L⁻¹). Fueron evaluados 12 tratamientos para las seis variedades y ocho tratamientos adicionales para Texana. Los cultivos se mantuvieron bajo temperaturas entre 24 a 32 °C, 16 horas de fotoperíodo y una intensidad luminosa de 96 µmol m⁻² s⁻¹ (lámparas fluorescentes de 30 W). El cultivo *in vitro* constó de las fases de: inducción de brotes, subcultivo, alargamiento de brotes y enraizamiento. En la fase de inducción, los explantes se sembraron en cajas Petri, la polaridad de los fragmentos internodales de tallo se conservó y los fragmentos de hoja con el haz en contacto se colocaron con el medio de cultivo. El subcultivo de los explantes se desarrolló en frascos de 125 ml con un volumen de 25 ml de medio. La fase de alargamiento fue en frascos de 250 ml con un volumen de 30 ml de medio. Posteriormente, los brotes se colocaron en el medio MS basal al 50 % de su sales, 1.5 % de sacarosa y 0.6 % de agar para la formación de raíces.

Aclimatización en invernadero

El agar se eliminó de los brotes enraizados. Posteriormente, los brotes se trasladaron a charolas que contenían 'Peat moss' (Premier®) como sustrato), el cual fue desinfectado con una solución con 0.1 % (p/v) de Tecto 60® (Ingrediente activo Tiabendazol 60 %) y 0.1 % (p/v) de Fungimycin® agrícola (ingredientes activos 18.1 % p/v de estreptomicina y 2 % p/v de oxitetraciclina).

Las charolas se cubrieron con domos de plástico para mantener la humedad relativa. Las plantas de 12 cm de longitud se replantaron en macetas y se expusieron a dos horas de luz artificial de $320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (focos de 100 W) durante la noche. Las plantas se fertilizaron con una solución nutritiva que contenía en mg L^{-1} los siguientes nutrientes: N = 250, P = 60, K = 250, Ca = 300, S = 200, Mg = 75, Fe = 3, Mn = 0.5, B = 0.5, Cu = 0.1 y Zn = 0.1. Las fuentes empleadas fueron fertilizantes comerciales (nitrato de calcio, sulfato de potasio, fosfato monoamónico, sulfato de magnesio, sulfato ferroso, ortoborato de sodio, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y sulfato de zinc) diluidos en agua.

Análisis estadístico

El diseño experimental usado fue completamente al azar con dos repeticiones por la cantidad de tratamientos a evaluar. La unidad experimental fue una caja Petri con 15 explantes. Se evaluaron los caracteres por ciento de explantes con brotes (% B) y número de brotes (NB) formados por explante a los 45 días. La variable % B fue analizada mediante pruebas de comparación de dos proporciones binomiales por pares de tratamiento (Infante & Zárate, 1984). La variable NB se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal & Wallis (1952), debido a que la distribución de los datos no fue normal (Infante & Zárate, 1984). Esta prueba se basa en la asignación de rangos para comparar muestras independientes, con ajustes por empates bajo un diseño experimental completamente al azar. Posterior a la asignación de los intervalos se efectuó la

comparación de medias de rangos correspondientes tratamientos (Conover, 1980).

RESULTADOS

Respuesta de las seis variedades a las combinaciones hormonales

De las seis variedades de crisantemo evaluadas con 12 combinaciones hormonales, únicamente las variedades 'Indianápolis' y 'Texana' regeneraron en brotes adventicios, a partir de segmentos internodales de tallo. Las variedades, que si regeneraron, lo hicieron bajo diferentes combinaciones de BAP (2 mg L^{-1} y 3 mg L^{-1}) y AIA (1 mg L^{-1} y 1.8 mg L^{-1}).

Los explantes de las variedades que no regeneraron brotes, solamente formaron un callo somero de color amarillo y se oxidaron durante el cultivo. Fue posible observar que el 80 % de las secciones de tallo cercanas al ápice se oxidaron. Asimismo, el porcentaje de regeneración fue menor en la zona apical, por lo que se consideró tomar únicamente las secciones de tallo de la parte media.

Al comparar la capacidad de regeneración de los explantes que proceden de hoja y tallo, en éstos últimos se observó oxidación de los tejidos, mayor formación de callo y no se obtuvieron brotes.

Regeneración eficiente de la variedad 'Indianápolis'

De las combinaciones hormonales probadas, únicamente con las concentraciones de 2 mg L^{-1} y 3 mg L^{-1} de BAP con las tres concentraciones de AIA, se obtuvieron brotes en los diferentes porcentajes que fluctuaron entre 11 y 55 %. El porcentaje de explantes con brotes (% B) no resultó significativamente diferente en los cinco tratamientos. Tampoco, el número de brotes en los tratamientos que contenían 2 y 3 mg L^{-1} de BAP con 0.5 y 1.0 mg L^{-1} de AIA resultaron con diferencias significativas. Las cinco combinaciones tuvieron en común la presencia de AIA. Aún cuando los resultados estadísticos no mostraron diferencias claras, los datos promedios permitieron establecer que la combinación de BAP/AIA (2:1) fue la que dio mejor respuesta en cuanto al porcentaje de explantes con brotes (55 %) y número de brotes por explante (2.4) en comparación con las otras combinaciones. Además, los brotes formados en este tratamiento mostraron una morfología más uniforme (Cuadro 2).

Cuadro 2. Comparaciones múltiples de rangos para determinar el efecto de tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes y la cantidad de brotes por explante de crisantemo variedad Indianápolis. En la columna % B (proporciones) los valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial. En la columna NB (rangos) los valores con la misma letra son iguales en la misma columna de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de rangos a una $p \leq 0.05$).

Tratamientos		Por ciento de explantes con brotes (% B)	No. de brotes por explante (NB)	(% B) Proporciones	(NB) rangos
BAP (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)				
2	0.5	44	2.40	0.51 a	683 a
2	1.0	55	2.40	0.71 a	777 a
3	0.1	11	0.40	0.37 a	429 b
3	0.5	50	1.80	0.35 a	671 a
3	1.0	28	1.60	0.14 a	653 ab

Durante el proceso de regeneración los explantes mostraron una serie de cambios. Los primeros cambios morfogénéticos ocurrieron después de una semana de cultivo y se manifestó con el crecimiento del explante, una coloración verde y la formación de callo en la zona superior del explante que no estuvo en contacto con el medio. Después de dos a tres semanas los primeros brotes se formaron directamente de la zona no diferenciada de los explantes. Posteriormente, el alargamiento y diferenciación continuó hasta que después de 30 o 35 días, los brotes con hojas en desarrollo se observaron (Figura 3B). Una vez que se estableció la fase de inducción, se hizo un subcultivo con el mismo medio de inducción, ya que esto permitió que hubiera un mayor número de brotes y a su vez los brotes alcanzaran un tamaño y vigor adecuados.

La fase de aclimatización *ex vitro*, es una fase crítica en el cultivo *in vitro*. Para el caso del crisantemo, utilizar como sustrato 'Peat moss' combinado con alta humedad relativa y la exposición de las plantas a dos horas diarias de la luz (durante la noche) por tres semanas (21 días) permitió que las plantas se desarrollaran adecuadamente hasta una altura de 12 cm, cuando se transfirieron a macetas. Una vez que las plantas tuvieron una altura de 20 cm se retiró la luz por la noche para inducir la floración y a las dos semanas se observaron los primeros botones florales y posteriormente a las dos semanas las flores. En el presente trabajo y para el caso de la variedad Indianápolis, el tiempo para regenerar plantas completas a partir de segmentos de tallo y llevarlas hasta floración requirió de 17 semanas (119 días).

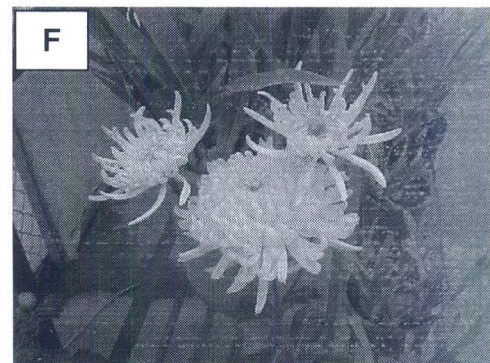
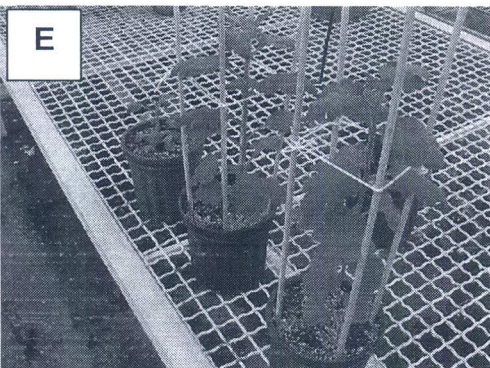
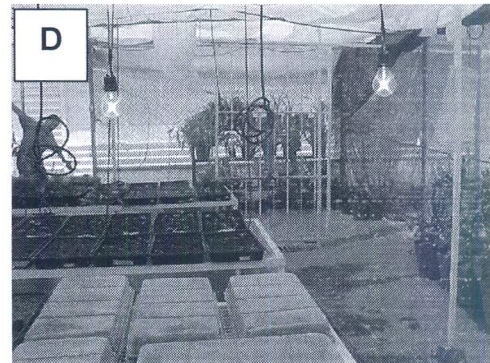
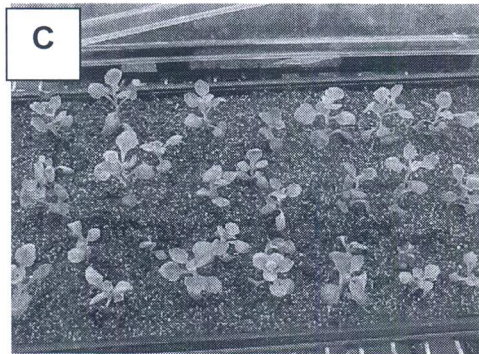


Figura 3. (A) Cultivo *in vitro*, después de tres semanas de subcultivo, (B) Fase de enraizamiento a las dos semanas cultivo, (C) Aclimatización en invernadero, (E) Transferencia a maceta, (F) Plantas de crisantemo variedad Indianápolis en floración después de 17 semanas de crecimiento a partir de segmentos de tallo.

Regeneración eficiente de la variedad 'Texana'

En una primera etapa, cuando fueron probados los doce tratamientos, esta variedad mostró una respuesta muy baja, ya que se obtuvieron en promedio de uno a tres brotes por explante en el 20 % de los mismos, con la combinación hormonal de 3 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIA. Partiendo de este resultado y para mejorar la respuesta se probaron otras combinaciones hormonales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparaciones múltiples de rangos para determinar el efecto de tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes y la cantidad de brotes por explante de crisantemo variedad Texana. En la columna % B (proporciones) los valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial. En la columna NB (rangos) los valores con la misma letra son iguales en la misma columna de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de rangos a una $p \leq 0.05$.

Tratamientos		Porcentaje de explantes con brotes (%B)	No. de brotes por explante (NB)	(%B)	(NB) Rangos
BAP (mg L ⁻¹)	AIA (mg L ⁻¹)			Proporciones	
3	1.0	20	0.20	0.20 c	115 c
3	1.2	20	0.30	0.30 c	121 c
3	1.4	40	0.80	0.80 b	163 b
3	1.6	80	2.80	2.80 a	295 a
3	1.8	80	4.10	3.60 a	340 a

En cinco tratamientos se obtuvo respuesta. La mejor la combinación fue en 3 mg L⁻¹ de BAP y 1.8 mg L⁻¹ de AIA, bajo la cual se logró un 80 % de explantes con brotes (Cuadro 3). Al igual que la variedad Indianápolis fue necesaria una relación de BAP/AIA cercana a 2:1 para lograr la emisión de brotes. En la variedad 'Texana' se hicieron dos subcultivos de dos semanas cada uno para inducir una mayor cantidad de brotes por explante (2.4 en 'Indianápolis' contra 4.1 en 'Texana').

Los brotes diferenciados fueron más pequeños y menos vigorosos que los de la variedad 'Indianápolis'. Además, una semana más fue requerida para que las plantas regeneradas alcanzaran el tamaño óptimo (12 cm) para transferirse al suelo y crecer en el invernadero. Sin embargo, una vez en maceta mostraron un crecimiento con hojas mucho más grandes y verdes, comparadas con las de la variedad 'Indianápolis'. También, la floración fue más rápida que la variedad 'Indianápolis'. Una semana después de quitar la luz nocturna fue posible observar los botones florales y las flores se obtuvieron en tres semanas (Figura 4). Desde la siembra de los segmentos de tallo hasta la floración, 'Texana' requirió de 18 semanas (126 días), el cual resultó mayor tiempo del invertido para 'Indianápolis'.

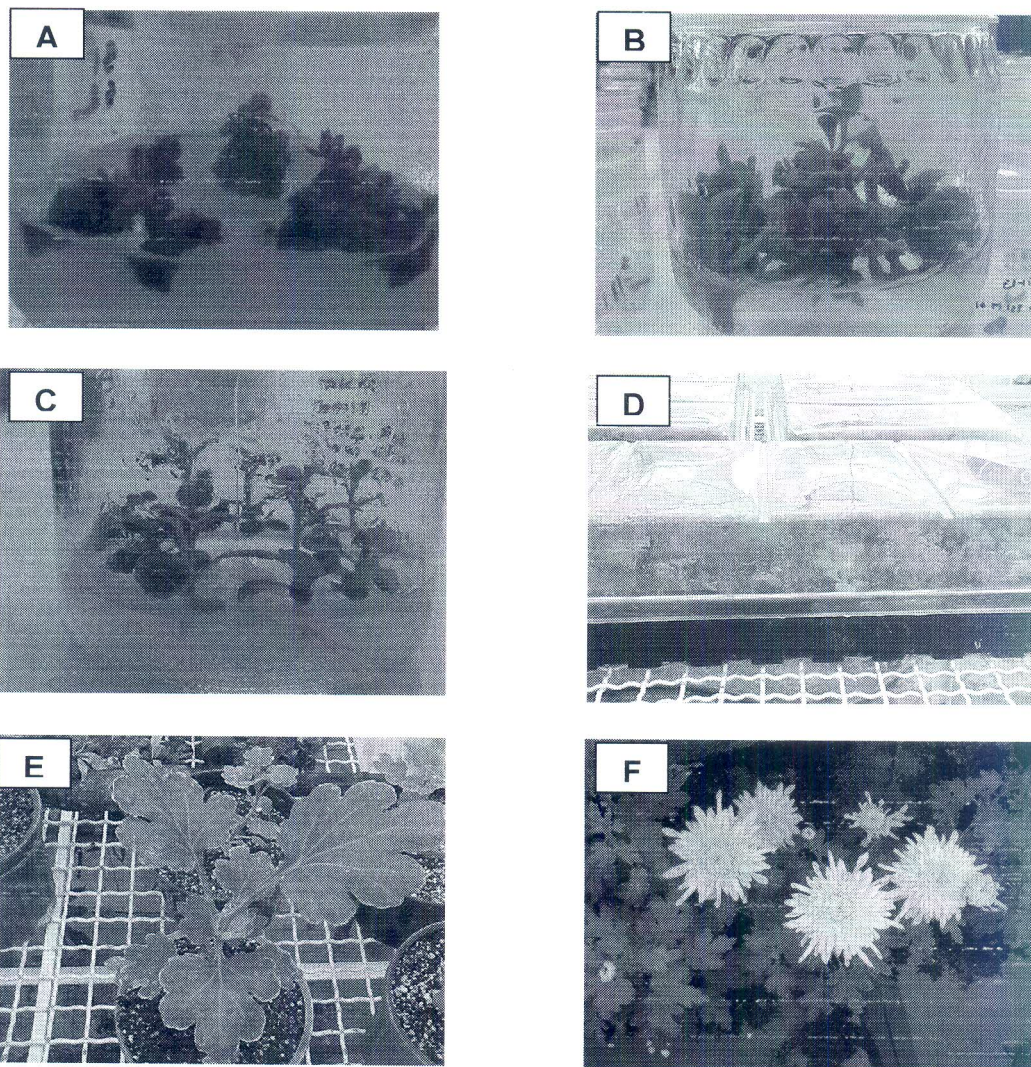


Figura 4. (A) Cultivo *in vitro*, después de 2 semanas, (B) Fase de alargamiento a las dos semanas, (C) Fase de enraizamiento, (D) Aclimatización en invernadero, (E) Transferencia en maceta, (F) Plantas de crisantemo variedad Texana con flores después de 18 semanas de crecimiento a partir de segmentos de tallo.

DISCUSIÓN

Las diferencias en cuanto a la capacidad de regeneración de la variedad 'Indianápolis' y 'Texana' concordó con los resultados obtenidos con otras variedades (Teixeira, 2003), en los cuales se ha determinado que las citocininas y auxinas jugaron un papel importante en la obtención de brotes. Diversos estudios han demostrado que no existe una combinación de BAP con AIA o ANA que sea estándar para todas las variedades de crisantemo, ya que hay una fuerte influencia del genotipo (Teixeira, 2003). Para el crisantemo se determinó que la mejor combinación fue BAP con AIA en una relación cercana 2:1 (Karim *et al.*, 2003). Los estudios realizados mostraron que *D. indicum* produjo uno a dos brotes por explante cuando se cultivaron segmentos de hoja en medio MS con 0.2 mg L⁻¹ de AIA y 3 ó 5 mg L⁻¹ de BAP (Ledger *et al.*, 1991). En cambio, seis genotipos de *D. morifolium* regeneraron pobremente, con un promedio de sólo 2.5 brotes por explante (Chagas *et al.*, 2004). De 11 variedades de *D. morifolium*, solamente ocho produjeron brotes en un medio que contenía 1 mg L⁻¹ de NAA y 1 mg L⁻¹ de BAP (Kaul *et al.*, 1990). Entonces, la capacidad de regeneración de brotes en crisantemo es genotipo dependiente y ésta ha variado ampliamente de 0 a 90 % de los explantes (Teixeira, 2003).

Lu *et al.* (1990) seccionaron segmentos de tallo en tres partes, que clasificaron como explante de tipo I (zona apical), tipo II (zona media) y tipo III (zona basal). Determinaron que el explante tipo I fue más efectivo en la formación de brotes, ya que los explantes más cercanos al ápice resultaron más competentes en la

regeneración. De igual forma, Rout & Das (1997) establecieron que el potencial morfogénico varió con la etapa de madurez del tallo. En comparación con los datos citados, en la presente investigación se obtuvo un mayor porcentaje de respuesta al cultivar segmentos tomados de la porción media del tallo, pero no con los segmentos obtenidos cerca del ápice. Los segmentos cortados cerca del ápice fueron más pequeños y se oxidaron fácilmente, mientras que los de la base, aún cuando fueron de mayor tamaño, regeneraron pobremente debido probablemente a que los tejidos eran más viejos. Lu *et al.* (1990) establecieron que en el crisantemo existe un gradiente de etapas de desarrollo en el tallo, lo que determina que sea crítico seleccionar la etapa más adecuada del explante para asegurar un alto porcentaje de regeneración.

En relación al tipo de explante, Gao *et al.* (2001) y Himstedt & Jacobsen (2001) compararon la capacidad morfogénica de hoja y tallo, y encontraron una mayor capacidad de regeneración en tejidos de tallo que de hoja. Los explantes que provinieron de tallo han mostrado mayor capacidad de regeneración que los pecíolos y las hojas, en un intervalo de dos a 10 brotes por explante, lo que depende de igual forma del genotipo (Teixeira & Fukai, 2003). Para explicar lo anterior, Kaul *et al.* (1990) determinaron que existen diferentes respuestas de los explantes cortados de tallo y hoja, debido particularmente a la concentración de auxinas. Los mismos autores explicaron el efecto de los diferentes niveles endógenos de hormonas en los tejidos, lo cual afecta la respuesta a las hormonas aplicadas exógenamente. Aunado a esto, Miyazaki & Tashiro (1978) registraron que los segmentos de tallo de *Chrysanthemum morifolium* cv.

'Kayono-sakura', obtenidos de plantas jóvenes de nueve semanas, produjeron brotes adventicios con mayor facilidad que los obtenidos de plantas más viejas (19 semanas). Asimismo, Miyazaki & Tashiro (1978) determinaron que los segmentos provenientes de esquejes crecidos durante el invierno regeneraron más brotes que durante primavera o verano. En el presente trabajo, los mejores porcentajes de brotación se obtuvieron en los meses de otoño e invierno, con lo cual se determinó el efecto de estacionalidad.

El desarrollo de plantas completas de crisantemo, desde los segmentos de tallo para 'Texana' e 'Indianápolis' hasta floración, requirió 119 y 126 días. Lu *et al.* (1990), registraron un período de 15 semanas para la variedad 'Royal Purple', quienes emplearon los segmentos de tallo para obtener plantas completas a través de regeneración directa. En comparación, un sistema de regeneración que utiliza como explante los meristemos, la obtención de plantas con flores es de 21 semanas. En invernadero el tiempo que se requiere para obtener plantas con flores desde esquejes es de 15 semanas, de acuerdo al manejo de los productores de crisantemo de la región de Texcoco.

Con base en la amplia revisión efectuada por Teixeira (2003) no existía información previa en la literatura sobre el manejo exitoso *in vitro* de las variedades Indianápolis y Texana bajo un esquema de regeneración directa a partir de segmentos de tallo. Con los resultados obtenidos en el presente trabajo será posible el aplicar las técnicas de transformación genética para

incorporar nuevas características, como mayor vida postcosecha, resistencia a frío, variantes en color y morfología.

LITERATURA CITADA

- Boase M., R., R. Miller and S.C. Delores. 1997. Chrysanthemum systematics, genetics and breeding. En: Janick J (ed) Plant Breeding Reviews. Vol. 14. John Wiley and Sons, New York. 480 pp.
- Conover W., J. 1980. Practical nonparametric statistics. John Wiley and Sons. New York. 250 pp.
- Chagas E., A., C.B. Fraguas, E.F. Silva, M. Pascual and V. Mendonça. 2004. Multiplicação in vitro de crisantemo cv white polaris. R. Bras. Agrociencia 10: 123-126
- Gao, Y., B. Zhang, G. Ding and Q. Zhang. 2001. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflorum*. J. Beijing Forestry Univ. 23: 32-43.
- Himstedt J., P. and H.J. Jacobsen. 2001. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Chrysanthemum* (*Dendranthema X grandiflorum*). Acta Hort. (ISHS) 560: 421-424.
- Infante, G. y G.P. Zárate. 1984. Métodos Estadísticos. Editorial Trillas. Distrito Federal, 643 pp.
- Karim M., Z., M.M. Amin, M.A.K. Azad, F. Begum, M.M. Rahman, M.M. Islam and R. Alam. 2003. Effects of different plant growth regulator on *in vitro*

- shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium*. OnLine J. Biol. Sci. 3: 553-560.
- Kaul, V., M.R. Miller, J.F. Hutchison and D. Richards. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendrathera grandiflora* Tzvelev (sin. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). Plant Cell Tissue Organ Cult. 21: 21-30.
- Ledger S., E., S.C. Delores, and N.K. Given. 1991. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Rep. 10: 195-199.
- Lu C., Y., G. Nugent and T. Wardley. 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cv. Royal Purple) Plant Cell Repor. 8: 733-736
- Miyazaki, S. and Y. Tashiro. 1978. Tissue culture of *Chrysanthemum morifolium*. IV. Explant sources for stem segment culture. Agr. Bull. Saga. Univ. 44: 67-78.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-136.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-479.
- Narayanaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue culture. En: Reinert J, Bajaj YPS (eds) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture Springer-Verlag. Berlin. 500 pp.

- Pillail, V., and L. Zulkifli. 2000. Somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium* generated through petal cultures. J. Trop. Agric. Food Sci. 28: 115-120.
- Rout G., R. and P. Das. 1997. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. Sci. Hort. 69: 239-257.
- Teixeira S., J.A. and S. Fukai. 2003. Chrysanthemum organogenesis through thin cell layer technology and plant growth regulator control. Asian J. Plant Sci. 2: 505-514.
- Teixeira S., J.A. 2003 Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. Biotechnology Advances 21: 715-766.

4. EFECTO DE LA GLUCOSA EN LA ORGANOGÉNESIS *in vitro* DE CRISANTEMO (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS'

RESUMEN

La glucosa es una fuente de carbono, sin embargo, en años recientes se le han atribuido funciones que tiene que ver con procesos de crecimiento y desarrollo. El presente trabajo, muestra la interacción de este azúcar con hormonas como Bencilaminopurina (BAP), en el proceso de regeneración directa de crisantemo. Se probaron diferentes concentraciones de glucosa, de la citocinina BAP y de la auxina ácido indolacético (AIA), para evaluar su efecto en la organogénesis directa de crisantemo variedad 'Indianapolis' a partir de secciones de tallo cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS). Los resultados mostraron que una concentración de 2 % de glucosa incrementa el número de brotes por explante y además varía las concentraciones necesarias de BAP (1 mg.L^{-1}) y AIA (1 mg.L^{-1}) comparado al medio que contiene sacarosa, con lo cual se tiene una evidencia más de la interacción de la glucosa con BAP y AIA durante el cultivo *in vitro* de los tejidos vegetales.

PALABRAS CLAVE: Crisantemo, glucosa, organogénesis, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, cultivo de tejidos.

SUMMARY

The glucose is a carbon source, however, in recent years have been ascribed functions related with processes of growth and development. This work shows the interaction of glucose with bencilaminopurine (BAP) during *in vitro* regeneration. Different levels of glucose, BAP and indolacetic acid (AIA) were tested to asses the effect of each factor and their interactions during *in vitro* regeneration of chrysanthemum where are used sections of stem cultivated on medium Murashige and Skoog. The results showed that a concentration of 2% glucose increased the number of shoots per explant and also alters the concentration of BAP (mg.L^{-1}) and AIA (1 mg.L^{-1}) required for an efficient response to regeneration, as compared to the medium containing sucrose, giving an evidence on the interaction of glucose with BAP ad AIA during *in vitro* tissue culture of plants.

KEY WORDS: Chrysanthemum, organogenesis, glucose, *Dendranthema X grandiflorum* Kitam, tissue culture.

INTRODUCCIÓN

Los azúcares en las plantas están involucrados en procesos metabólicos claves tales como la fotosíntesis (Krapp *et al.*, 1993) y la síntesis y degradación de almidón (Koch, 1996). Adicionalmente al tener un papel central en el

metabolismo, ayudan a regular muchos procesos fisiológicos y del desarrollo (Koch, 1996; Smeekens, 1998; Sheen *et al.*, 1999; Yu, 1999). Por ejemplo, los niveles de azúcar juegan un papel importante en determinar el tiempo en el cual algunas especies de plantas producirán flores. Los tratamientos que inducen floración pueden también llevar a un incremento en el transporte de carbohidratos desde las hojas a los meristemos apicales (Corbesier *et al.*, 1998). Este incremento en el transporte de azúcares se lleva a cabo antes del incremento de la actividad metabólica que ocurre durante la transición a la floración sugiriendo que los niveles de azúcares no se incrementan únicamente en respuesta a una mayor demanda metabólica y que los azúcares pudieran estar actuando como la señal de la transición a la floración (Bernier *et al.*, 1993).

Asimismo, se ha resaltado la importancia de los azúcares en controlar la expresión de un número significativo de genes (Koch, 1996). Este papel como moléculas señalizadoras ha sido ampliamente reconocido en microorganismos y recientemente en animales y plantas. Durante el crecimiento y el desarrollo de las plantas, los azúcares modulan una gran cantidad de procesos vitales como la germinación de semillas, el desarrollo de la plántula, la diferenciación de hojas y raíces, la transición floral, la maduración de frutos, la embriogénesis, la senescencia, así como la respuesta a la luz, al estrés y a los patógenos (León y Sheen, 2003; Rolland *et al.*, 2002).

La glucosa es un nutriente universal, y con excepción de las plantas, es preferido por la mayoría de los organismos como fuente de carbono y energía, en la biosíntesis y formación de carbohidratos y la pared celular. La habilidad para detectar señales por glucosa es importante para organismos tan diversos como *Escherichia coli*, levaduras, moscas, mamíferos y plantas. En contraste a la amplia información disponible en la detección de glucosa y mecanismos de señalización en bacterias y eucariotes unicelulares, la importancia de la glucosa ha sido reconocida sólo recientemente como una molécula central en la señalización en animales y plantas multicelulares (Moore *et al.*, 2003). Desde hace varios años, también se le ha asignado un papel regulatorio de numerosos genes relacionados con la fotosíntesis, función en la cual la hexocinasa, además de su función catalítica en la fosforilación de azúcares, juega el papel de sensor de glucosa (Jang y Sheen, 1994; Sheen, 1990).

Recientemente, se ha reportado el uso de glucosa como agente selectivo durante la transformación genética, ya que a dosis altas es capaz de inhibir la germinación y la organogénesis, pero esta inhibición es superada en presencia del gen *AtTPS1* de la trehalosa 6-fosfato sintetasa (Avonce *et al.*, 2004; Leyman *et al.*, 2006). Finalmente, existen algunos reportes en los que se ha observado una mejora en la respuesta morfogénica, por organogénesis directa o por embriogénesis somática, al utilizar glucosa en vez de sacarosa como fuente de carbono en frijol ayocote (*Phaseolus coccineus*) (Genga y Allavena, 1991); en berenjena (*Solanum melongena*) (Mukherjee *et al.*, 1991); en nuez avellana (*Corylus avellana*) (Yu y Reed, 1992) y en el té ginseng

(*Panax ginseng*) (Tang, 2000). Esta gama de efectos de la glucosa se pueden interpretar a la luz de los conocimientos actuales que implican a este azúcar, junto con las principales hormonas vegetales que se utilizan de manera rutinaria en las técnicas de propagación *in vitro*, en numerosos procesos de desarrollo en las plantas.

En este trabajo se reporta el efecto promotor de la glucosa en la organogénesis, cuando se le utiliza de manera transitoria y a ciertas dosis durante la fase de inducción de la brotación, así como la interacción de este azúcar con las hormonas BAP y AIA utilizadas durante el cultivo *in vitro* del crisantemo.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal.

Se utilizaron esquejes cultivados *ex vitro* y sin enraizar de la variedad Indianápolis. Para la desinfestación las hojas fueron cuidadosamente eliminadas para evitar daño en la epidermis del tallo. Una vez eliminadas las hojas, los tallos fueron colocados en solución jabonosa al 3 % durante tres minutos, etanol 70 % durante un minuto, solución de PPMTM (Plant Preservative Mixture) al 2 % durante cinco minutos y finalmente hipoclorito de sodio 15 % (con 0.1 mL Tween 20) por 10 minutos y luego se hicieron tres enjuagues con agua estéril. Después de la desinfección, se cortaron secciones internodales de aproximadamente 2 mm de ancho.

Medios de cultivo y condiciones experimentales.

Se empleo el medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (MS) (1962), al cual se le adicionaron diferentes concentraciones 6-bencilaminopurina-HCl (BAP) (SIGMA, ALDRICH) (0, 0.1, 1 y 2 mg.L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (SIGMA, ALDRICH) (0, 0.1 y 1 mg.L⁻¹) y glucosa (20, 40, 60 y 80 g.L⁻¹), con lo que se establecieron 48 condiciones experimentales (4 BAP X 3 AIA X 4 glucosa=48 combinaciones) los cuales se compararon con el medio base para regenerar crisantemo a partir de tallo, que consistió del medio MS con 2 mg.L⁻¹ BAP, 1 mg.L⁻¹ de AIA y 30 g.L⁻¹ de sacarosa, el cual fue previamente establecido por Valle Sandoval *et al.* (2008). Todos los medios contenían 6 % (p/v) de agar-agar (MERCK), purificado y exento de inhibidores. El pH se ajustó a 5.7±0.1 y fueron esterilizados en una autoclave a 1.05 kg.cm⁻¹ y 121 °C durante 15 minutos.

Todos los cultivos fueron desarrollados en un ambiente controlado, con un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una intensidad lumínica de 90 mol.m⁻²s⁻¹ y 26 ± 2 °C.

Los explantes se mantuvieron en fase inductiva de la brotación por 2 a 3 semanas en medio con las combinaciones hormonales a probar, así como glucosa como fuente de carbono. Después, los explantes se sembraron en medio fresco, pero cambiando la glucosa por sacarosa al 3 % como fuente de carbono. Bajo estas condiciones se mantuvieron otras dos o tres semanas, al

cabo de las cuales los brotes previamente inducidos se desarrollaron. Al final de esta etapa se hizo el recuento de brotes inducidos.

Después, los brotes fueron escindidos y trasplantados en frascos de cristal anchos con capacidad de 250 mL, con 25 mL de medio MS sin hormonas y 3 % (p/v) de sacarosa, donde se mantuvieron por espacio de 15 días, hasta que los brotes alcanzaron un tamaño de dos a tres centímetros. Estos brotes fueron de nuevo colocados en medio MS pero reduciendo los macro y microelementos al 50 %, sin hormonas y 15 g.L^{-1} de sacarosa, hasta la formación de raíces.

Análisis estadístico.

De los 49 tratamientos con 15 repeticiones cada uno, las variables evaluadas fueron el porcentaje de explantes con brotes (% B) y el número de brotes por explante (NB). La variable % B, fue evaluada con pruebas de comparación de dos proporciones binomiales (Infante y Zárate, 1984), así como por pares de tratamiento mediante análisis factorial para determinar que factor solo o que combinación de factores era determinante en la regeneración.

El NB se analizó con una prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, basada en la asignación de rangos para comparar muestras independientes, utilizando ajustes por empates bajo un diseño experimental completamente al azar. Posteriormente se efectuó la comparación múltiple de rangos basada en la suma de promedios (Conover, 1980). Para comparar el efecto conjunto de

ambas variables en la eficiencia de brotación (EB), se obtuvo la variable compuesta $EB = \% B \times NB \times 100$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 49 tratamientos probados sólo 14 (28.6 %) formaron brotes. El total de los tratamientos y la respuesta para las dos variables consideradas se muestra gráficamente en las Figuras 5 y 6.

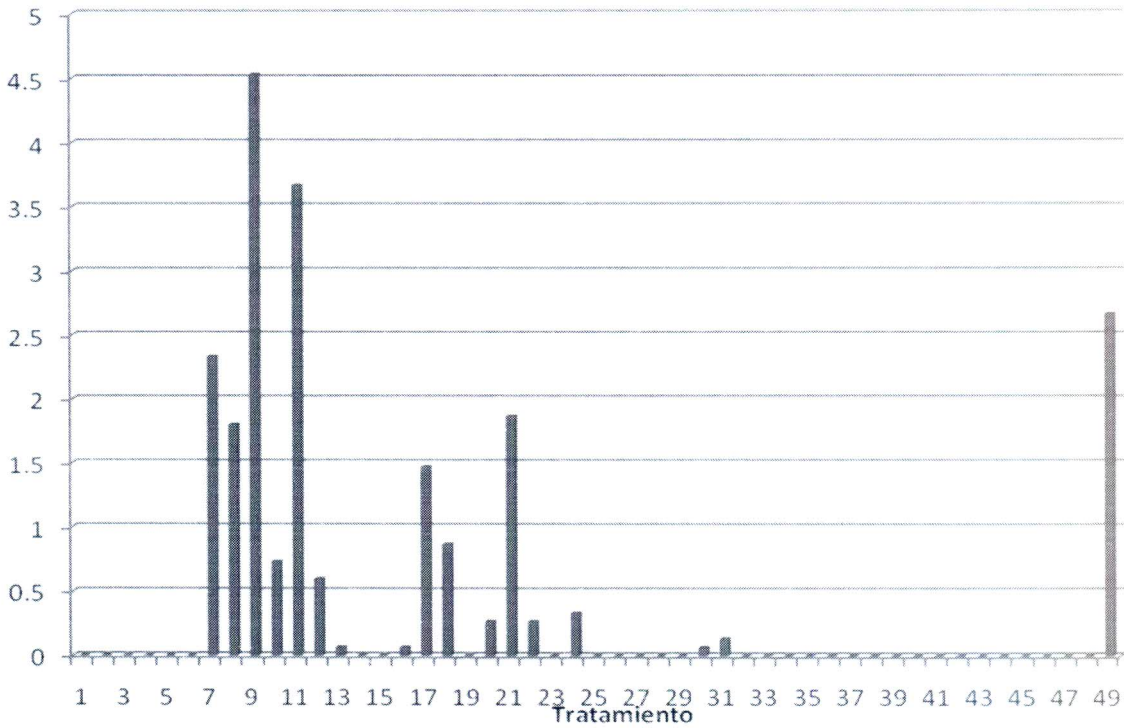


Figura 5: Brotes por explante (NB) en cada uno de los tratamientos.

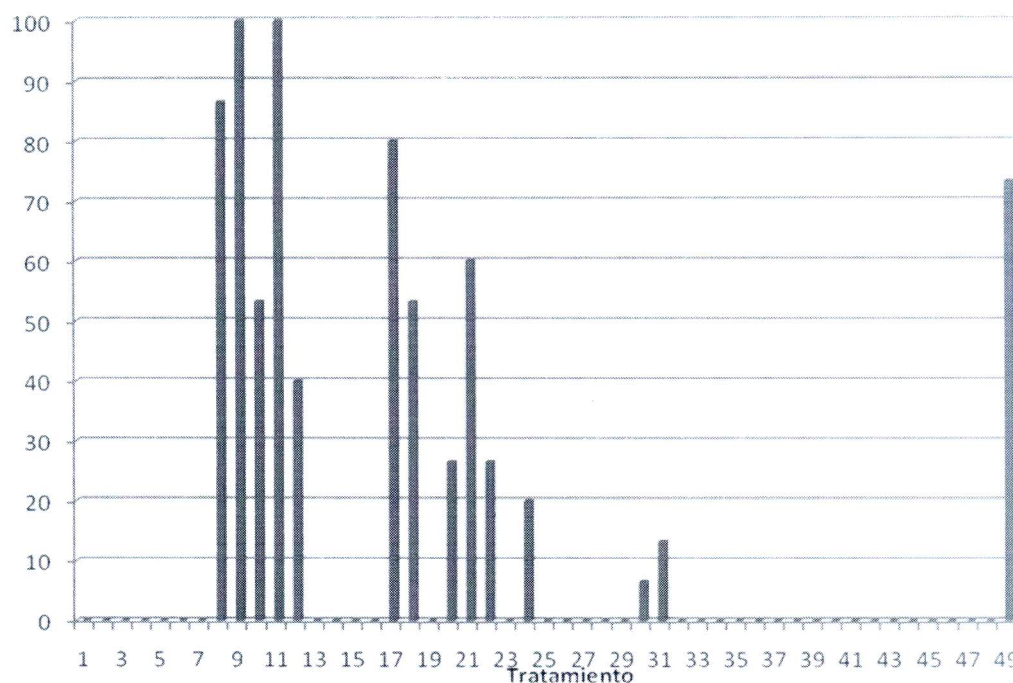


Figura 6. Porcentaje de brotes por explante (% B) en cada uno de los tratamientos.

Donde no hubo brotes, se observó en algunos casos formación de callo y en otros necrosis del tejido. Para el análisis estadístico se consideraron únicamente los tratamientos que mostraron respuesta positiva en ambas variables (Cuadro 4).

CUADRO 4. Efecto de la glucosa en combinación con BAP y AIA sobre la respuesta en el porcentaje brotación (% B) y brotes por explante (BE) en crisantemo cv. 'Indianápolis'.

GLUCOSA %(p/v)	BAP mg.L ⁻¹	AIA mg.L ⁻¹	%B	BE	EB
2	0.1	0.1	80 b ^X	1.5 d ^Y	120
2	0.1	1	53 cd	0.8 de	42.4
2	1	0	40 d	2.3 bc	92
2	1	0.1	87 b	1.86 cd	161.8
2	1	1	100 a	4.5 a	450
2	2	0	53 cd	0.7 de	37.1
2	2	0.1	100 a	3.6 a	360
2	2	1	40 d	0.6 ef	24
4	0.1	1	6.6 f	0.06 g	0.396
4	1	0.1	27 e	0.2 g	5.4
4	1	1	60 c	1.86 cd	111.6
4	2	1	20 e	0.33 fg	6.6
6	1	0	13 ef	0.13 g	1.69
sacarosa	2	1	73 bc	2.6 b	189.8

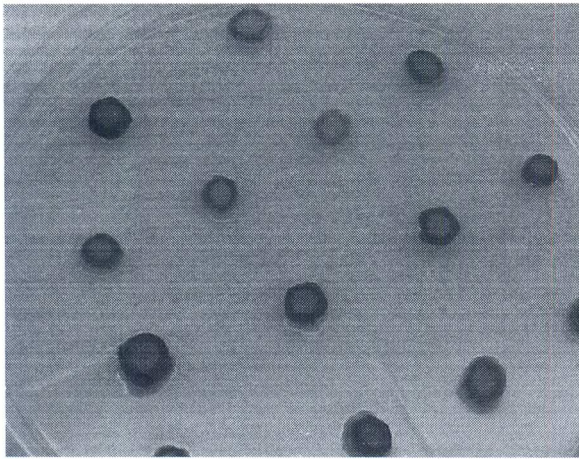
(^X) Valores con la misma letra dentro de cada columna indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial. (^Y) Valores con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de rangos a una $P \leq 0.05$. Eficiencia de Brotación ($EB = \% B \times BE \times 100$).

Los tratamientos 9 y 11 fueron estadísticamente superiores al resto, para las variables % B (porcentaje de brotes con explantes) y BE (brotes por explante); también se generó una variable compuesta EB (eficiencia de brotación), con el producto de las dos variables, con lo cual se obtiene una estimación del número de brotes que se esperan al utilizar 100 explantes. En comparación con el testigo con sacarosa, con el tratamiento 9 (1 mg.L⁻¹ BAP, 1 mg.L⁻¹ AIA, 2 % glucosa), se obtendrían 450 brotes (por 100 explantes cultivados), en comparación con 190 del control con sacarosa (Cuadro 4). El incremento en la

respuesta se debió a que hubo un mayor porcentaje de explantes con brotes (100 %) , así como una mayor cantidad de brotes por explante (4.5) que el testigo (73 % y 2.6) (Cuadro 4; Figuras 5, 6 y 7).

El uso de glucosa al 2 % y aplicada transitoriamente en el medio durante la fase de inducción de la brotación, junto con una combinación adecuada de BAP y AIA permitió al menos duplicar el número de brotes obtenidos. Otro tratamiento superior al testigo fue el 11 (2 mg.L⁻¹ BAP, 0.1 mg.L⁻¹ AIA, 2 % glucosa), sin embargo en este caso los brotes eran de entrenudos cortos y hojas de tamaños irregulares.

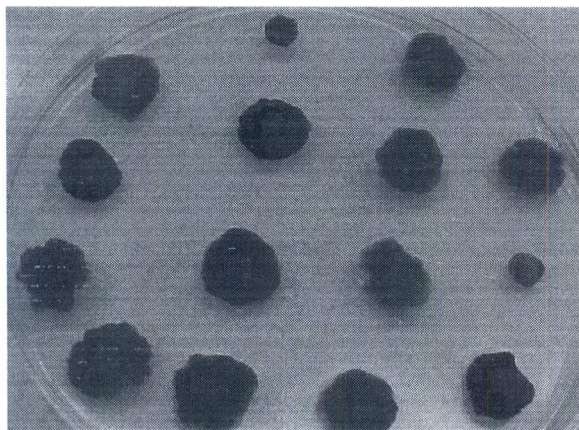
Los resultados, muestran que la mejor respuesta se obtiene con 2 % de glucosa ya que al 4 % la respuesta es menor y prácticamente se abate en 6 % de glucosa (Cuadro 4). Para que la organogénesis ocurra, se requiere también la adición de BAP y AIA (generalmente con mayor concentración de BAP respecto a AIA). La excepción fue el tratamiento 18, que con 0.1 mg.L⁻¹ BAP y 1 mg.L⁻¹ AIA, indujo brotación. Para que ocurra el desarrollo normal de los brotes, es necesario que al cabo de dos o tres semanas máximo, los explantes se cambien a un medio con sacarosa como fuente de carbono ya que la persistencia de la glucosa inhibe el desarrollo de los brotes formados.



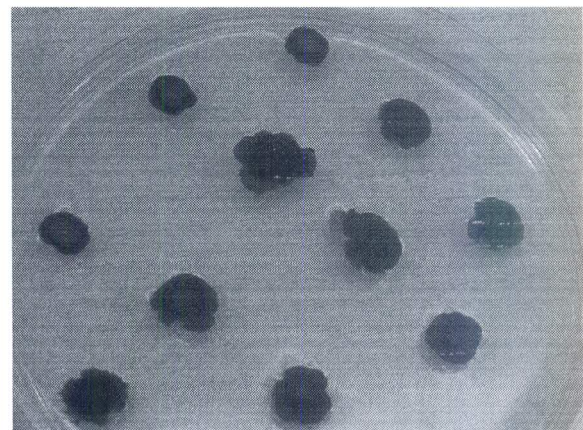
0% de glucosa



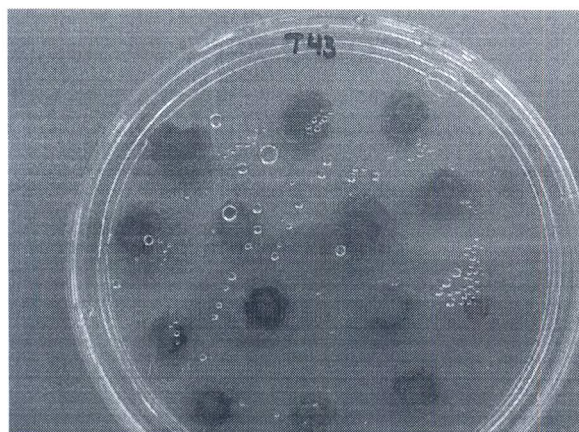
2% de glucosa



4% de Glucosa



6% de Glucosa



8% de Glucosa



3% de Sacarosa

Figura 7. Crecimiento de los explantes en los diferentes medios. Después de 2 semanas de incubación en glucosa y 2 en sacarosa como fuente de carbono.

La relación entre glucosa y hormonas vegetales es compleja pero recientemente se ha comenzado a elucidar. Se ha demostrado que procesos como la germinación, la expansión y enverdecimiento de los cotiledones, el desarrollo de brotes y la floración son inducidos por citocininas e inhibidos por auxinas. En un modelo en el que se establece la relación de la glucosa con estas hormonas, se propone que la glucosa inhibe los procesos antes mencionados, bloqueando de alguna forma el efecto de las citocininas y promoviendo el efecto inhibitor de la brotación de las auxinas. Más aún, se propone que el efecto señalizador de la glucosa estaría dado a través de la hexocinasa 1 (HXK1) (Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2002).

Se analizaron estadísticamente cada uno de los factores en los tratamientos probados, como son concentración de glucosa, BAP y AIA, así como sus interacciones en los diferentes niveles para determinar el papel de cada uno en la organogénesis. En los Cuadros 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se muestran las proporciones por factor y su interacción con otro factor, haciendo pruebas de hipótesis sobre el parámetro p de la distribución binomial. Evaluando el efecto de cada factor individual, la concentración óptima de glucosa fue de 2 % (47 % de brotación), para BAP de 1.0 mg.L⁻¹ (35 %) y AIA de 1.0 mg.L⁻¹ (24 %), observándose las frecuencias más altas de brotes por explante y diferentes estadísticamente (Cuadros 5, 6, y 7).

Cuadro 5. Análisis del efecto de diferentes concentraciones de glucosa en la frecuencia de explantes con brotación (% B).

Glucosa % (p/v)	% B
2	47 a ^z
4	8 b
6	1 c

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indican proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

Cuadro 6. Análisis del efecto de diferentes concentraciones de la hormona 6-Bencilaminopurina (BAP) en la frecuencia de explantes con brotación (% B).

BAP mg.L ⁻¹	% B
0	0.74 d ^z
0.1	15 c
1	35 a
2	24 b

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indican proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

Cuadro 7. Análisis del efecto de diferentes concentraciones de la hormona Ácido Indolacético (AIA) en la frecuencia de explantes con brotación (% B).

AIA mg.L ⁻¹	% B
0	11 b ²
0.1	24 a
1	21 a

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indican proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

Con respecto a las interacciones entre dos factores se observó que la interacción glucosa y BAP (2 % y 1 mg.L⁻¹), mostró mayor frecuencia de brotes por explante (75 %) que las interacciones glucosa y AIA (2 % y 1 mg.L⁻¹, 66 %) y BAP y AIA (1 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹, 53 %) (Cuadros 8, 9 y 10). Lo anterior muestra que, son más determinantes las interacciones glucosa-citocinina, glucosa-auxina que la interacción citocinina-auxina, lo cual es relevante, si se considera que bajo las técnicas estándar de cultivo *in vitro* es más importante la relación citocinina-auxina en lograr la respuesta morfogénica deseada.

Cuadro 8. Análisis del efecto de la interacción glucosa y la hormona BAP en la frecuencia de explantes con brotación (% B).

Glucosa % (p/v)	BAP mg.L ⁻¹	% B
2	0	2 d ²
2	0.1	46 b
2	1	75 a
2	2	64 a
4	0	0 d
4	0.1	0 d
4	1	26 c
4	2	8 c
6	0	0 d
6	0.1	0 d
6	1	4 d
6	2	0 d

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indican proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros *p* de la distribución binomial.

Cuadro 9. Análisis del efecto de la interacción glucosa y la hormona AIA en la frecuencia de explantes con brotación (% B).

Glucosa % (p/v)	AIA mg.L ⁻¹	% B
2	0	26 c ²
2	0.1	66 a
2	1	48 b
4	0	6 cd
4	0.1	5 de
4	1	15 c
6	0	1 e
6	0.1	1 e
6	1	0 f

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indican proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

Cuadro 10. Análisis del efecto de la interacción de las hormonas BAP y AIA en la frecuencia de explantes con brotación (% B).

BAP mg.L ⁻¹	AIA mg.L ⁻¹	% B
0	0	2 e ^z
0	0.1	0 e
0	1	0 e
1	0	15 d
1	0.1	37 ab
1	1	53 a
2	0	26 bcd
2	0.1	33 bc
2	1	13 d

²Valores con la misma letra dentro de cada columna indican proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a pruebas de hipótesis sobre parámetros p de la distribución binomial.

La explicación más probable para los resultados aquí reportados, es que la glucosa a la concentración del 2 %, a diferencia de la sacarosa, está alterando el balance endógeno hormonal de los explantes, así como la respuesta de los mismos a las hormonas aplicadas exógenamente, de una manera tal que favorece la diferenciación de brotes.

Aunque el protocolo aquí utilizado se considera como de organogénesis directa, es difícil que ocurra formación *de novo* de brotes directamente de cualquier tejido diferenciado de los segmentos internodales del tallo. Por lo general, se requiere primero que ocurra una fase de desdiferenciación que bajo cultivo *in vitro* consiste en la formación de un callo somero que ahora si se vuelve competente para formar brotes en presencia de citocininas. Los resultados aquí mostrados indican claramente que la glucosa es un factor importante en los protocolos de regeneración *in vitro*. Otros reportes han involucrado a la glucosa en incrementos en la morfogénesis por organogénesis o por embriogénesis somática en frijol ayocote, berenjena, avellana y té ginseng bajo cultivo *in vitro* (Tang, 2000; Yu y Reed, 1993; Genga y Allavena, 1990; Mukherjee, *et al.*, 1990). Será interesante demostrar si el tipo de respuesta determinada en este trabajo y en otros, se puede generalizar para otras especies, variedades y explantes empleados para la regeneración. Los resultados descritos en el presente trabajo son relevantes, ya que se ha demostrado que es posible lograr incrementos en la respuesta morfogénica de más del doble, considerando la aplicación de glucosa, adicionalmente a las auxinas y las citocininas.

LITERATURA CITADA

- Avonce, N., B. Leyman, J. Mascorro-Gallardo, P.A. Van Dijck, J.M. Thevelin y G. Iturriaga. 2004. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase *AtTPS1*

- genes is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- Bernier, G., A. Havelange, C. Houssa, A. Petitjean and P. Lejeune. 1993. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* 5: 1147-1155.
- Conover W., J. 1980. Practical nonparametric statistics. 2 ed. John Wiley and Sons. New York, USA. Pp. 95-142
- Genga, A. and A. Allavena. 1990. Factors affecting morphogenesis from immature cotyledons of *Phaseolus coccineus* L. *Plant Cel. Tiss. Org. Cult.* 27: 189-196.
- Infante, G. and G.P. Zárate. 1984. Métodos Estadísticos. Editorial Trillas. México, D.F. 643 p.
- Jang J., C. and J. Sheen. 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665-1679.
- Koch K., E. 1996 Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- Leyman, B., N. Avonce, M. Ramón, P. Van Dijck, G. Iturriaga and J.M. Thevelin. 2004. Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. *J. Biotech.* 121: 309-317.
- León, P. and J. Sheen. 2003. Sugar and hormone connections. *Trends in Plant Sci.* 8: 110-116.
- Moore, B., L. Zhou, F. Rolland, Q. Hall, W.H. Cheng, Y.X. Liu, I. Hwang, T. Jones and J. Sheen. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332-336.

- Mukkerjee, S., B. Rathinasbapathi and N. Gupta. 1990. Low sugar and osmotic requirements for shoot regeneration from leaf pieces of *Solanum melongena* L. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 25: 13-16.
- Roldan, M., C. Gómez-Mena, L. Ruíz-García, J. Salinas and J.M. Martínez-Zapater. 1999. Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. Plant J. 20: 581-590.
- Rolland, F., B. Moore and J. Sheen. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. Plant Cell 14, S185-S205.
- Sheen, J. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. Plant Cell 2: 1027-1038.
- Sheen, J., L. Zhou, and J.C. Jang. 1999. Sugar as signaling molecules. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 410-418.
- Smeekens, S. 1998. Sugar regulation of gene expression in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 230-234.
- Tang, W. 2000. High-frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and in vitro flowering of regenerated plantlets in *Panax ginseng*. Plant Cell Reports 19: 727-732
- Yu, S.M. 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. Plant Physiol. 121: 687-693.
- Yu X., Reed, B.M. 1993. Improved shoot multiplication of mature hazelnut (*Corylus avellana* L.) in vitro using glucose as a carbon source. Plant Cell Reports 12: 256-259.

5. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN POR AGROINFECCIÓN PARA CRISANTEMO (*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) cv. 'INDIANÁPOLIS'

RESUMEN

Con el propósito de contar con protocolo eficiente de transformación por agroinfección en crisantemo variedad Indianápolis, se evaluaron diferentes parámetros que se consideran clave en el proceso. La transformación se determinó con base a la expresión transitoria del gen reportero de la β -glucoronidasa (*GUS*) y *GUSint*, el cual proporcionó datos visibles y en corto tiempo. Para la transformación estable se utilizó el gen de selección *nptII* (neomicina fosfotransferasa) que confiere resistencia al antibiótico kanamicina. Los resultados mostraron que las mejores condiciones de transformación para esta variedad fueron utilizar la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, infectar explantes de tallo, realizar el cocultivo en el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) sin hormonas, inocular la bacteria por aplicación directa en la zona de respuesta organogénica del explante en volúmenes de 10 a 25 μ L de la suspensión bacteriana (densidad óptica de 0.5) y dar una fase de cocultivo de tres días. La selección de transformantes estables debe realizarse en medio MS con 15 mg.L⁻¹ de kanamicina, lo cual permitió obtener brotes transformados

establemente. Conjuntando los datos de estos experimentos, se desarrolló un protocolo de transformación para esta variedad que permitió introducir un gen de interés agronómico con una eficiencia de transformación de 3 %.

PALABRAS CLAVE: *Agrobacterium*, *GUS*, transgénicos.

SUMMARY

With the intention to have an efficient protocol of transformation by agroinfection in chrysanthemum cv. 'Indianapolis', different parameters were considered to be important in the process. The transformation process was determined upon expression of the reporter gene β -glucoronidase (*GUS*) and *GUSint*, which provided visible information and in short time. For the selection of transformants were used the gene *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) which confers resistance to antibiotic kanamycin. The results showed up that the best conditions of transformation are the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, to infect explantes of stem, the medium of co-cultivation was Murashige and Skoog (MS) (1962) without hormones, inoculated the bacteria for direct application in the zone of response organogenetic with volumes from 10 to 25 μ L of the bacterial suspension (optical density of 0.5) and to give a phase of co-cultivation of three days. The selection of transformants stable must be realized on medium MS by 15 mg.L^{-1} of kanamycin, which allowed to obtain stable transformants. Combining the information of these experiments, a protocol of

transformation was developed for this variety that allowed to introduce a gene of agronomic interest with an efficiency of transformation of 3 %.

KEY WORDS: *Agrobacterium*, GUS, transgenics.

INTRODUCCIÓN

El crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas de todo el mundo. En China el crisantemo es empleado principalmente como ornamental y su modificación por mejora genética tradicional data desde hace 2000 años. Su producción es importante en varios países europeos, como los Países Bajos, Gran Bretaña y Francia; así como en Colombia, Estados Unidos y Canadá (Teixeira da Silva, 2003b). En nuestro país, el Estado de México es la principal entidad productora de flores en el país. El crisantemo está entre las flores más cotizadas en todas sus variedades, ya que tiene una demanda muy alta en la entidad por ser una flor tradicional, como lo es la variedad Indianápolis en la región de Texcoco (SAGARPA, 2005 y 2006).

El desarrollo de sistemas de transformación genética para crisantemo ofrece la posibilidad de obtener variedades con características útiles de forma muy rápida, por ejemplo, resistencia a insectos y patógenos, incremento de la vida en florero, y modificaciones en el color de la flor (Draub *et al.*, 1997; Robinson & Firoozabady, 1993). El mejoramiento tradicional para obtener variedades resistentes a insectos o patógenos está limitado por las barreras de

incompatibilidad y los altos niveles de ploidia. Además, las cruzas sexuales poligénicas pueden causar desequilibrios en el delicado balance que determina el crecimiento uniforme y la sincronización en la floración características importantes en las flores (Dons *et al.*, 1991). La relevancia de aplicar la tecnología de ADN recombinante es que permite introducir genes de interés agronómico y que no producen efectos negativos (Sherman *et al.*, 1998).

Hay un número importante de reportes de transformación de crisantemo (Courtney-Gutterson *et al.*, 1993; Ledger *et al.*, 1991; Pavingerova *et al.*, 1994; Renou *et al.*, 1993; Seichi *et al.*, 1995; Urban *et al.*, 1994), sin embargo, los protocolos reportados muestran inconsistencias, poca repetibilidad y un alto nivel de especificidad de la variedad a la regeneración y transformación, que resulta en bajas eficiencias de transformación (de Jong *et al.*, 1993; Teixeira & Fukai, 2002a). En la práctica, cada variedad requiere su propio protocolo de regeneración y transformación eficientes si se desea poder introducir genes de interés agronómico. Una estrategia para desarrollar rápidamente un protocolo eficiente de transformación, ya sea por biobalística o por agroinfección, es emplear como primer paso un gen reportero como *GUS* para estudiar la expresión transitoria que permita visualizar y cuantificar la expresión al modificar cada factor importante en el proceso de transformación, antes de intentar la transformación estable con cualquier gen de interés (Teixeira & Fukai, 2002b). La diferencia entre expresión transitoria y estable se da en función del tiempo de evaluación después de la transformación. Mediciones del gen reportero entre dos a nueve días se considera transitoria y posterior a 20

días se dice que es estable (Boase *et al.*, 1998). El gen más utilizado para este propósito es el gen *GUS*, el cual codifica para la enzima β -glucoronidasa y su expresión se hace evidente por el típico color azul que adquiere la célula transformada en presencia del sustrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil glucorónido (X-gluc) (Naleway, 1992).

La presente investigación tuvo como objetivo establecer un protocolo de transformación genética de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev variedad Indianápolis) mediante *Agrobacterium tumefaciens* con el fin de introducir genes de interés agronómico para lo cual se evaluó la transformación estable con el gen *GUS* y *GUSint*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Fueron empleados esquejes sin enraizar de *Dendranthema grandiflorum* Kitam de la variedad 'Indianápolis' (variedad patentada por Yoder Brothers y propagada actualmente por el Ing. José Antonio Segura en la zona de influencia de la Universidad Autónoma Chapingo, Campus Chapingo). Para la desinfestación las hojas fueron cuidadosamente eliminadas para evitar daño en la epidermis del tallo. Una vez eliminadas las hojas, los tallos fueron colocados en solución jabonosa al 3 % durante tres minutos, etanol 70 % durante un minuto, solución de Plant Preservative Mixture (PPMTM) al 2 % durante cinco

minutos y finalmente hipoclorito de sodio (Cloro activo) 15 % (con Tween 20) por 10 minutos y enjuagar tres veces con agua esterilizada.

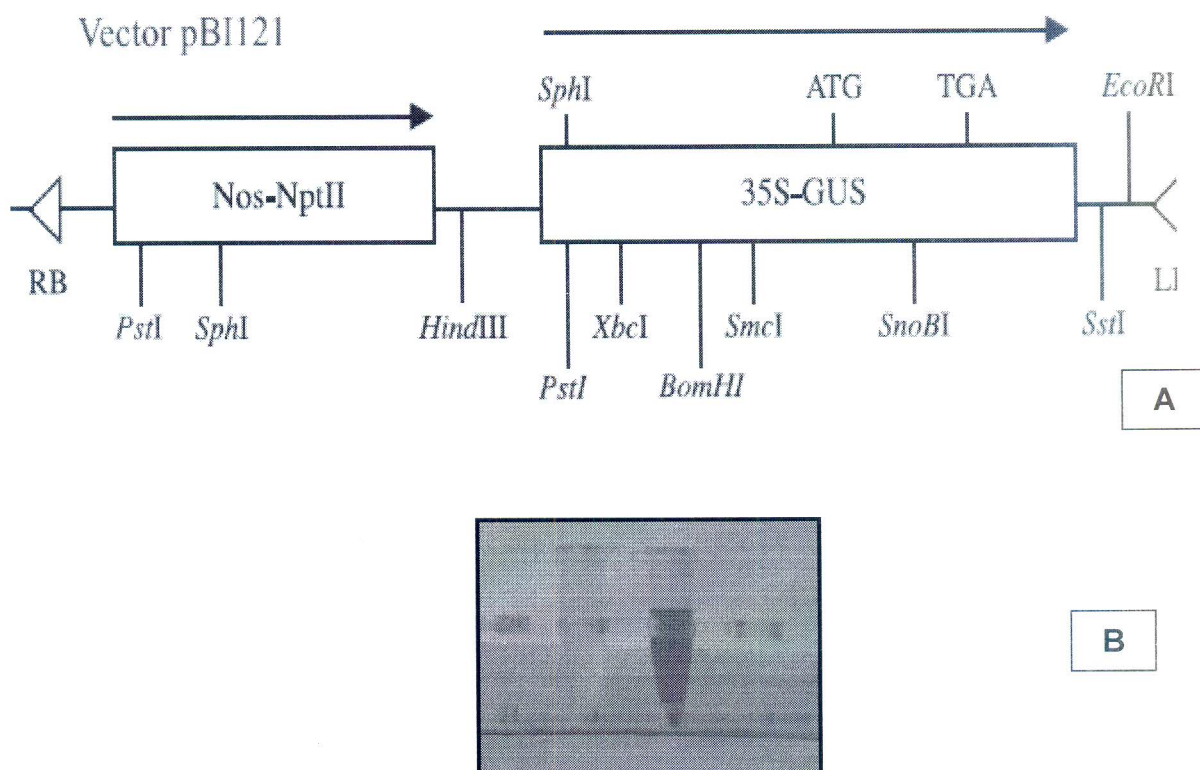


FIGURA 8. (A) Vector pBI121, (B) Efecto de GUSint en bacterias en vida libre: tinción con X-gluc de la cepa de *A. tumefaciens* LBA4404(p35SGUSint) (izq.) y LBA4404(pBI121) (der.).

Condiciones de transformación.

Los experimentos fueron desarrollados usando dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, una que portaba el plásmido pBI121 (Chen *et al.*, 2003) y otra que portaba el p35SGUSint (Figura 8; Vancanneyt *et al.*, 1990), y la cepa

de *A. tumefaciens* C58C1 (pBI121). Dichas cepas fueron cultivadas en medio LB (Luria-Bertani) con 50 mg.L⁻¹ de kanamicina y 100 mg.L⁻¹ de rifampicina durante 16-20 horas a 27 °C. El cultivo fue centrifugado a 4000 rpm y resuspendido en una solución de glucosa 10 mM adicionada con 100 mM de acetosiringona o en medio Murashige & Skoog (MS) (1962) a una densidad óptica de 0.4 a 0.5 (a 600 nm). Los explantes fueron cocultivados con la bacteria en el medio que contenía 2 % de glucosa y 0.6 % de agar. Después del cocultivo *Agrobacterium* se eliminó con una solución de 250 mg.L⁻¹ de ticarcilina y los explantes fueron colocados en el medio de inducción de brotes, el cual consistió en el medio MS con 1 mg.L⁻¹ de BAP, 1 mg.L⁻¹ de AIA, 2 % de glucosa, 250 mg.L⁻¹ de ticarcilina, 15 mg.L⁻¹ de kanamicina y 0.6 % de agar. En este medio se mantuvieron durante una semana y posteriormente fueron transferidos a medio fresco de inducción de brotes con 125 mg.L⁻¹ de ticarcilina y el resto de los ingredientes en las mismas concentraciones. Los explantes permanecieron en este medio hasta la formación de callo verde. Posteriormente se pasaron a un medio con citocinina (sin auxina) y con las mismas concentraciones anteriores de sales de MS, 3 % de sacarosa, kanamicina y ticarcilina hasta la formación de brotes. Las concentraciones de los reguladores de crecimiento, glucosa, sacarosa, kanamicina y ticarcilina para la variedad Indianapólis fueron establecidos en un trabajo previo (Valle *et al.*, 2008)) donde se evaluaron las respuestas a diferentes concentraciones. Los medios tanto para cocultivo como para inducción de brotes y enraizamiento fueron ajustados a un pH de 5.7 antes de someterlos a esterilización. Todos los cultivos fueron

desarrollados en una temperatura de 24 ± 1 °C (16 horas de fotoperíodo, 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, lámparas fluorescentes).

Cuadro 11. Comparación de frecuencias de la presencia de expresión estable del gen *GUS* en la transformación genética de crisantemo variedad Indianápolis.

Factor	Tratamiento	Frecuencia de GUS
Cepa	LBA4404 (pBI121)	0.39 a ^z
	C58C1 (pBI121)	0.1 b
Tipo de corte del explante	Circular	0.2 a
	Semicircular	0.2 a
Precultivo	Sin precultivo	0.31 a
	Con precultivo	0.07 b
Suspensión del cultivo bacteriano para cocultivo	MS	0.25 a
	MS y acetosiringona 100 mM	0.27 a
	Solución de glucosa 10 mM y acetosiringona 100 mM	0.17 a
	Solución de glucosa 10 mM	0.21 a
Medio para cocultivo	MS sin hormonas y acetosiringona	0.60 a
	MS sin hormonas	0.17 b
	MS con hormonas y acetosiringona	0.080 c
Inoculación de la bacteria	Inmersión	0 b
	Inoculación con micropipeta	0.23 a
Días de cocultivo	3	0.28 a
	5	0.05 b
Papel filtro en el medio de cocultivo	Si	0.20 a
	No	0.23 a

^zValores con la misma letra dentro de cada columna por cada factor indica proporciones estadísticamente iguales de acuerdo a una prueba de hipótesis de la distribución binomial ($p < 0.05$).

Optimización de los parámetros de Agroinfección.

Las condiciones establecidas como determinantes se basaron en un estudio exhaustivo realizado por Teixeira & Fukai (2002b) en dos variedades de crisantemo para optimizar el proceso de agroinfección (Cuadro 11).

La variable dependiente evaluada fue el porcentaje de explantes que manifestaron al menos un área azul creciendo en medio selectivo con kanamicina, después de 30 días de incubación posterior a la agroinfección.

Análisis histológico para la detección de la β -glucoronidasa.

La expresión de *GUS* se estimó mediante la determinación histoquímica con X-gluc (Jefferson *et al*, 1987), en explantes desarrollados en medio selectivo por al menos 30 días. El material vegetal fue incubado durante 12 a 24 horas a 37 °C en una solución de X-Gluc [50 mM Na_2HPO_4 + 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.1% Triton X-100 y X-Gluc 1 mg.mL⁻¹]. Posterior a la incubación los tejidos fueron decolorados con una solución de metanol y acetona en una proporción 3:1. La presencia, ubicación e intensidad de la reacción de GUS fue observada con un microscopio estereoscópico. Para evaluar la frecuencia de transformación, se estimó el porcentaje de explantes con reacción positiva a X-gluc, fuera esta moderada, media o intensa. La estimación en la frecuencia de expresión de

GUS se llevó a cabo analizando entre 8-32 repeticiones o explantes para cada factor analizado.

Extracción de ADN y análisis de PCR.

A partir de callos desarrollados durante 20 días de cultivo en medio selectivo el ADN fue extraído de acuerdo a Dellaporta *et al* (1983) y la presencia del gen *nptII* fue confirmada por PCR. Las pruebas de PCR se realizaron con volúmenes de 50 µL (volumen final) con Taq polimerasa (Gibco-BRL). La secuencia de los iniciadores de los genes *nptII* fueron NPTII-5' 5'-AGATGGATTGCACGCAGGTCC-3' y NPTII-3' 5'-GAAGAACTGGTCAAGAAGGCG-3', las secuencias amplifican un fragmento de 780 bp de la región codificante de *nptII*. Se empleó un termociclador PCR Sprint ThermoHybaid y las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo a 94 °C por 3 minutos, 40 ciclos de: 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto y finalmente 1 ciclo a 72 °C por 10 minutos.

Análisis Estadístico.

La agroinfección fue cuantificada por el porcentaje de explantes teñidos de azul, ya que la cuantificación de variables como puntos focales GUS (Puntos Focales de GUS, PFG) y Areas Teñidas de Azul (ATA) es muy difícil de medir (Teixeira *et al.* 2002b). Dada la naturaleza de los datos al no presentar una distribución normal y la presencia de respuesta nula o cero en algunos tratamientos se

aplicó una prueba no paramétrica de comparación de dos proporciones binomiales por pares de factores (Infante & Zárate, 1984).

RESULTADOS

Resistencia a Kanamicina

Los antibióticos son todavía el agente selectivo más común en los experimentos de transformación genética. Entre los más comunes están la kanamicina A y gentamicina (G-418). Sin embargo, la mayoría de los antibióticos tienen un efecto negativo en el crecimiento *in vitro* y en la morfogénesis (formación de brotes y raíces). Por esta razón, se debe establecer una concentración óptima de antibióticos que represente un nivel de selección óptimo para evitar el escape de falsos transformantes y que no inhiba totalmente los procesos de morfogénesis y desarrollo de la planta.

De acuerdo a las pruebas de susceptibilidad al antibiótico kanamicina, (datos no mostrados) se encontró que en la variedad Indianápolis una concentración de 15 mg.L⁻¹ de kanamicina, es la adecuada para hacer la selección, ya que se inhibe completamente la formación de callo, sin la oxidación total de tejido y se evita el escape de falsos transformantes.

Evaluación de los parámetros de agroinfección

Los resultados obtenidos en la optimización de los parámetros de agroinfección se muestran en la Cuadro 11. Las estimaciones de la expresión de GUS se efectuaron después de 20 días de la infección, por lo cual los datos obtenidos se consideraron como expresión estable.

Analizando cada uno de los factores, se encontró que el efecto de la cepa fue contrastante, siendo la cepa más adecuada para la variedad la LBA440, ya que fue la que permitió el desarrollo de callo y explantes con reacción GUS positiva. Después de determinar que la mejor cepa era la LBA4404, se decidió emplear el vector binario p35SGUS*int* (un intrón, que permite discriminar la expresión de genes procariotes de los eucariotes) en vez del pBI121, para eliminar la posibilidad de contabilizar falsos positivos por la presencia de la bacteria en la superficie de los explantes. En cuanto al efecto del tipo de corte del explante, el uso de un corte transversal y luego otro longitudinal, para obtener explantes semicirculares incrementó la transformación, no hay diferencia entre manejar uno u otro tipo de corte, considerando utilizar únicamente cortes transversales, ya que resultan de más fácil manejo y se ahorra tiempo, sobretodo cuando el número de explantes es muy grande. El factor precultivo, establecido por Teixeira (2002b) como importante para la sobrevivencia de los explantes y el incremento de la transformación, así como también para evitar la presencia de falsos positivos. Al analizar, el efecto del precultivo, se observó que éste redujo significativamente la transformación, y aun cuando hubo formación de callo al

inicio, éste dejó de crecer en el medio selectivo y se oxidó. En cuanto al efecto del medio de suspensión de la bacteria, no se mostró diferencia alguna en los tres tratamientos. En lo referente al medio para cocultivo, se establecen variaciones, desde usar únicamente medio MS sin hormonas, MS con hormonas, MS con hormonas y acetosiringona. Comparando estas variantes, se determinaron diferencias significativas entre usar uno u otro medio, siendo el mejor de los tratamientos el MS sin hormonas y con acetosiringona. Sin embargo, se observó oxidación en muchos de los explantes, por lo que concluimos que usar medio MS sin hormonas es recomendable. Otra fase importante en el cocultivo es la interacción entre la bacteria y el tejido vegetal, para lo cual se evaluó sumergir el tejido en el cultivo bacteriano durante 5 minutos o inocular con el cultivo bacteriano directamente. Comparando ambos métodos, se observó una clara diferencia entre ellos, resaltando que inocular directamente los explantes tiene un efecto positivo en la transformación. En cuanto al tiempo de cocultivo los resultados mostraron que existen diferencias entre usar tres y cinco días, siendo óptimo tres días de cocultivo para las condiciones aplicadas a la variedad Indianápolis. Otro factor más fué el uso de papel filtro (en el medio de cultivo), el cual mostró una clara diferencia entre usarlo o no usarlo, pero se observó que con papel filtro había mayor contaminación de los explantes. Por lo anterior, concluimos que para las condiciones de nuestros experimentos es mejor no usar el papel filtro.

Análisis de los transformantes

Como se determinó en materiales y métodos, los transformantes fueron evaluados en cuanto a la reacción GUS, resistencia a 15 mg.L⁻¹ de kanamicina y por la presencia del gen *nptII* determinado por PCR. En la Figura 9, se muestran los resultados para cada una de las pruebas.

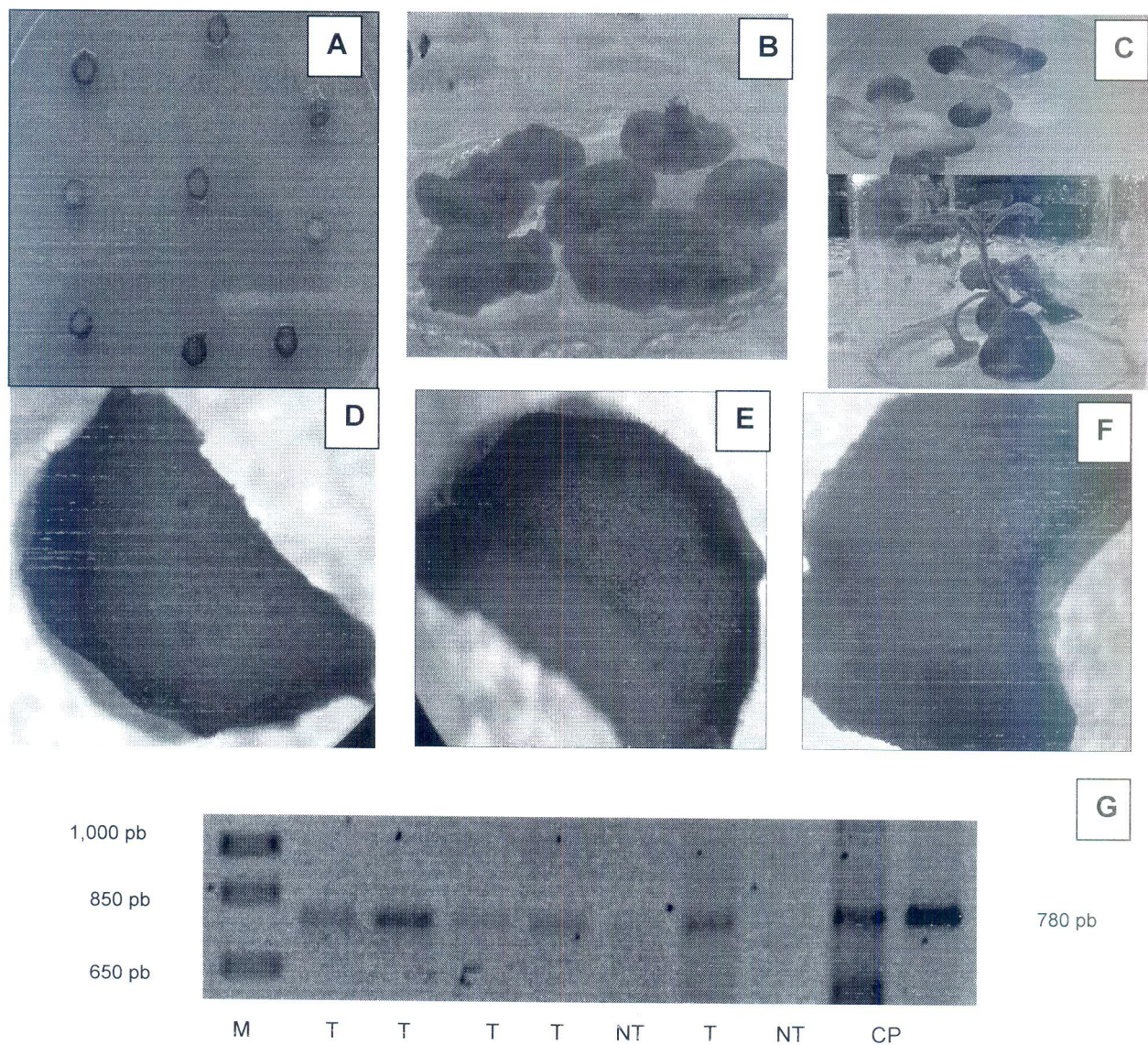


FIGURA 9. (A) Explantes no transformados desarrollados en medio selectivo a los ocho días de incubación, (B) Explantes con áreas transformadas desarrollados en medio selectivo a los 25 días de incubación, (C) Brotes no resistentes y resistentes a kanamicina desarrollados a los 45 días, (D) Reacción GUS negativa observada en microscopio estereoscópico 20X, (E,F) Reacción GUS positiva en callos de 20 días de incubación, (G) Detección del gen *nptII* mediante PCR en callos desarrollados durante 20 días: M, marcador de peso molecular; T, callos transgénicos; NT, callos no transgénicos; CP, control positivo (vector binario).

Protocolo de transformación estable

El protocolo basado en los parámetros establecidos mediante la transformación estable de crisantemo variedad Indianápolis es el siguiente:

- 1) Utilizar segmentos internodales de tallo de esquejes cultivados *ex vitro*, de 3 mm de longitud que se desinfectan como se describe en materiales y métodos.
- 2) Se prepara un cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* cepa LBA4404 incubado por unas 24 horas aproximadamente. Las bacterias se colectan por centrifugación y se resuspende la pastilla en una solución de glucosa 10 mM y acetosiringona 100 μ M a una densidad óptica $OD_{600} = 0.5$.
- 3) Se inocula el explante aplicando 20 μ L de la suspensión bacteriana en el corte expuesto que no está en contacto con el medio.
- 4) Los explantes inoculados se cocultivan en medio MS sin hormonas, suplementado con 2 % glucosa y sin papel filtro por tres días bajo las condiciones de incubación descritas antes.
- 5) Después, los explantes se lavan para eliminar el exceso de bacteria con una solución de ticarcilina 250 mg.L⁻¹ y se colocan en cajas Petri con medio

selectivo (MS, 1 mg.L⁻¹ BAP, 1 mg.L⁻¹ AIA, 2 % glucosa, 250 mg.L⁻¹ ticarcilina y 15 mg.L⁻¹ kanamicina. En este medio se incuban por una semana.

6) Posteriormente los explantes se transfieren a cajas Petri con medio MS con los mismos componentes indicados antes, pero reduciendo la ticarcilina a 125 mg.L⁻¹ (ya que a este nivel el crecimiento bacteriano es menos probable). En este medio se mantienen hasta que se forma un callo verde (dos semanas) en la parte superior que no está en contacto con el medio.

7) Seguida a esa etapa los explantes se pasan los a medio MS sin auxina, con 1 mg.L⁻¹ BAP, con las mismas concentraciones de los demás componentes y sustituyendo la glucosa por la sacarosa en una concentración del 3 %, hasta la formación de brotes diferenciados.

8) Los brotes diferenciados se transfieren a medio MS con los mismos componentes, sin hormonas y sacarosa al 3 % como fuente de carbono. Esta etapa es para permitir que los brotes tengan un tamaño adecuado para ser transferidos a medio para producción de raíces, esta etapa dura dos semanas.

9) Una vez que los brotes alcanza un tamaño de 3 cm, se pasan al medio para desarrollar raíces, el cual consiste en las sales MS al 50 %, 15 % de sacarosa, sin hormonas y con las mismas concentraciones de ticarcilina y kanamicina. Esta fase tarda un lapso de dos semanas.

Con este protocolo, se llevaron a cabo experimentos de transformación de crisantemo variedad Indianápolis con una construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* que codifica las enzimas involucradas en la biosíntesis de trehalosa, utilizando el vector p35S-BIF que porta el gen de selección *nptII*. De tres experimentos independientes en los que se agroinfectaron un total de 1093

explantos, se pudieron recuperar 33 brotes transgénicos independientes resistentes a kanamicina y capaces de formar raíces, lo cual dio una eficiencia de transformación de 3 %, estimada en base a los brotes transformados obtenidos. Las eficiencias de transformación en la literatura para crisantemo van desde 0 % a 35 % en diferentes variedades (Teixeira, 2003), donde no se reporta la variedad Indianópolis.

DISCUSION

La resistencia a antibióticos es una de las primeras etapas que deben considerarse cuando se trabaja con transformación genética. Por esta razón, se hicieron pruebas previas en diferentes niveles de concentración de kanamicina, para determinar el nivel exacto que permitiera seleccionar los transformantes. En la mayoría de los experimentos de transformación de crisantemo se ha observado que el nivel de selección es genotipo dependiente, empleando concentraciones por debajo de los 25 mg.L⁻¹ (Teixeira da Silva, 2003). En el caso de la variedad 'Indianópolis' se determinó que ese nivel óptimo de selección era 15 mg.L⁻¹, ya que con este nivel, la organogénesis no fue bloqueada.

En lo referente a la evaluación de los parámetros de agroinfección inicialmente se estableció el tiempo adecuado para hacer las evaluaciones de la expresión de GUS, el cual se determinó que lo ideal era entre 20 y 30 días de la infección, basado esto en lo que establece la literatura, por ejemplo, en las variedades Lineker y Shuhou-no-chikara, se encontró que la máxima expresión transitoria

en experimentos de agroinfección era una semana después de la infección, y al mes la expresión estable se reducía drásticamente (Teixeira & Fukai, 2002b). En nuestro caso, más que evaluar la expresión transitoria, medimos la expresión estable, la cual se considera después de 20 días. El medir la expresión estable del gen, permite asegurar que la reacción que se observa es propia de la especie transformada que de la bacteria que se utilizó como vector. En lo referente a los factores que intervienen en el proceso de transformación, como primer factor se decidió evaluar dos cepas bacteriana, debido a que varios grupos han reportado la influencia de variedad y la cepa de *A. tumefaciens* en la transformación (Kudo *et al.*, 2002). Nuestros resultados mostraron que la mejor cepa era la LBA4404 comparada a la C58C1, puesto que la primera permitió la formación de callo y obtención de brotes, mientras que la otra oxidaba los tejidos rápidamente. En cuanto al vector empleado, el p35SGUS_{int}, mostró ventajas muy superiores al pBI121, básicamente porque el primer vector contiene un intrón, que permite discriminar la expresión de genes procariotes de los eucariotes en una prueba transitoria, esto es, que la expresión que se observa del gen GUS, que es una coloración azul, se debe únicamente a las células vegetales transformadas, y no a la bacteria que puede estar aún en los tejidos y darnos reacciones falsas positivas, como solía dar el vector pBI121 (Vancanneyt *et al.*, 1990). El tipo de corte del explante, se evaluó debido a que en los trabajos realizados por Teixeira (2005), utilizaba cortes semicirculares, pero en la práctica el manejar este tipo de corte involucra tiempo durante el proceso, así que se decidió comparar entre hacer cortes circulares y semicirculares. Los resultados mostraron que para la variedad

'Indianápolis', no hubo diferencia entre manejar uno u otro tipo de corte. La posible explicación a lo anterior estaría sustentada en el análisis histológico que hace Kaul *et al.* (1990) en el cual se determinó que durante la organogénesis directa de segmentos de tallo de crisantemo, las células corticales son las primeras en dividirse, lo que da como resultado una masa compacta de células (meristemoides) rodeadas de paredes celulares delgadas. Después de 15 a 25 días, continúa la actividad meristemática en las capas subepidérmicas desarrollando protuberancias que rompen la epidermis y pueden observarse como pequeños nódulos en las superficies del explante. Esto significa, que de acuerdo a la estructura de las plantas dicotiledóneas, la zona cortical es la más externa y en contacto con la epidermis, al hacer un corte semicircular, se exponen los tejidos de la médula central, xilema, floema y endodermis, sin embargo, si es en las células corticales donde se da la división para generar brotes, no se explicaría la base histológica para emplear cortes semicirculares.

Referente al precultivo, Teixeira (2002b) establece que éste afecta de positivamente la sobrevivencia de los explantes e incrementa significativamente la transformación, así como también la presencia de falsos positivos. Contrariamente a lo observado por Teixeira, el precultivo, redujo la transformación. Si consideramos que la agroinfección como proceso tiene una etapa determinante donde se establece la interacción bacteria-planta, la cual se da por la liberación de sustancias químicas de la planta. En la naturaleza, *Agrobacterium* infecta una planta, cuando ésta sufre de heridas y libera sustancias fenólicas que inducen los genes de virulencia de la bacteria. Si existe una etapa de precultivo, en la que la bacteria no tiene contacto con el

tejido vegetal recientemente seccionado y se deja un lapso de tiempo antes de agroinfectar, los tejidos cicatrizan y aún cuando hay división celular activa, éstas células no liberarán las sustancias que se producen cuando hay daño celular. Por lo que, el uso de precultivo no tiene un sustento fisiológico para determinar su eficiencia. En cuanto al manejo del cultivo bacteriano para inocular, no se mostró diferencia alguna en los tres tratamientos establecidos. Los protocolos en general, especifican que el cultivo bacteriano se debe resuspender en medio MS, sin embargo, Teixeira (2000b) menciona que el uso de acetosiringona y glucosa incrementan significativamente la transformación, específicamente porque la acetosiringona induce la expresión de los genes *vir* de *Agrobacterium*, lo que facilita la infección de las células vegetales. Esta última explicación resulta convincente, y aún cuando no hubo diferencias entre los tres tratamientos, decidimos emplear el método de Teixeira, ya que, el hecho de emplear acetosiringona, asegura un incremento en la virulencia de la bacteria. La evaluación del medio de cocultivo, mostró claras diferencias entre ellos. El emplear MS con hormonas, pudiera tener el inconveniente de que las hormonas interactúan con el proceso de infección, reduciendo el éxito de obtener transformantes. El medio MS con acetosiringona, tuvo un efecto directo en los explantes, oxidándolos en su mayor parte y evitando la formación de callo. Finalmente el medio MS sin hormonas, resultó ser el más adecuado, sin efectos negativos y con mayor probabilidad de obtener transformantes. En lo referente a como inocular a la bacteria, la mayor parte de los trabajos sugieren sumergir los explantes en el cultivo bacteriano, pero Teixeira (2000b) introduce una variante, siendo esta la inoculación directa de los explantes en volúmenes

determinados del cultivo, al comparar ambos métodos, el que mejor dio resultados fue la inoculación directa. Una posible explicación a este efecto es el hecho de que la inoculación se aplica directamente a la zona en donde se produce el proceso de organogénesis (Figura 9E). En un trabajo realizado por Lowe, *et al.* (1993) quienes establecen que la organogénesis en segmentos de tallo ocurre en las células de la epidermis que no están en contacto con el medio, además de que el crecimiento bacteriano no es tan abundante comparado como cuando se sumerge todo el tejido (Figuras 9E, 9F y 9G), y de esta forma se elimina más fácilmente la bacteria. El tiempo de cocultivo también fue determinante para obtener resultados positivos, se estableció que 3 días fueron los óptimos. Lo anterior concuerda con los resultados de Kudo *et al.* (2002), quienes determinaron que períodos de cocultivo mayores a cuatro días resultan en una disminución en la actividad de GUS, debido a un sobrecrecimiento de la bacteria que daña los tejidos vegetales. Este último efecto fue el que más observamos, después de 4 días el tejido se oxida por el sobrecrecimiento de la bacteria, y cuando se trató de eliminar la bacteria con antibióticos para pasar los tejidos al medio selectivo, se observó mayores índices de contaminación. Teixeira (2005) indica que el papel filtro incrementó la efectividad de regeneración y agroinfección, ya que éste amortigua los efectos de sustancias que interfieren con tales procesos. No obstante, para nuestro caso, no se determinaron diferencias significativas entre usarlo o no, pero con papel hubo más contaminación de los explantes, por lo que finalmente se decidió no usarlo.

Una vez determinados los factores que nos aseguraron un mayor éxito en la transformación, fue posible analizar los transformantes mediante PCR el cual amplificó el fragmento del gen que es responsable de la resistencia al antibiótico kanamicina, esta se considera como una prueba determinante de la transformación y sobretodo de la inserción del gen en el genoma de la planta. En conclusión, logramos establecer los factores clave para la transformación genética de crisantemo vía agroinfección, utilizando la expresión estable del gen pGUSInt, el cual da resultados en poco tiempo, sin ser necesario llegar hasta la formación de brotes. La determinación de estos factores ha permitido la inserción de un gen de interés agronómico en crisantemo, con una eficiencia de transformación de 3.11 %.

LITERATURA CITADA

- Chen P., Y. C.K. Wang, S.C. Soong, and K.Y. TO. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Mol. Breeding* 11: 287-293.
- Courtney-Gutterson, N., E. Firoozabady, C. Lemieux, J. Nicholas, A. Morgan, K. Robinson, A. Otten and M. Akerboom. 1993. Production of genetically engineered color-modified chrysanthemum plants carrying a homologous chalcone synthase gene and their field performance. *Acta Hort.* 336: 57-62.

- Daub M., E., R.K. Jones and J.W. Moyer. 1997. Biotechnological approaches for virus resistance in floral crops, p. 335-351. *In*: R.L. Geneve, J.E. Preece, and S.A. Merkle (eds.). Biotechnology of ornamentals plants. CAB Intl., Wallingford, UK.
- De Jong, J., W. Rademaker and M.F. Van Wordragen. 1993. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 263-270.
- Dellaporta S., L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.
- Dons J., J.M., C. Mollema, W.J. Stickema and B. Visser. 1991. Routes to the development of disease resistant ornamentals, p. 387-417. *In*: J. Harding, F. Singh, and J.N.M. Mol (eds.). Genetics and breeding of ornamental species. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
- Infante, G. y G.P. Zárate. 1984. Métodos Estadísticos. Editorial Trillas. México, D.F. 643 p.
- Jefferson R., A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.
- Jerónimo C., B.E. 1991. Tesis de Licenciatura. Efecto de la iluminación interrumpida en variedades de crisantemo (*C. morifolium* R) en hidroponía bajo invernadero. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 110 p.

- Kaul, V., M.R. Miller, J.F. Hutchison and D. Richards. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendrathera grandiflora* Tzvelev (sin. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). Plant Cell Tissue Organ Cult. 21: 21-30.
- Kudo S., N. Shibata, Y. Kanno and M. Suzuki. 2002. Transformation of Chrysanthemum (*Dendrathera grandiflorum* Kitamura) via *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Hort. 572: 139-147.
- Ledger S., E., S.C. Deroles and N.K. Given. 1991. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Rep. 10: 195-199.
- Lowe J., M., M.R. Davey, J.B. Power and K.S. Blundy. 1993. A study of some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat). Plant Cell Tissue Organ Cult. 33: 171-180.
- Naleway J., J. 1992. Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrate. p. 61-76. In: GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter og gen expression. S.R. Gallagher (ed.). Academic Press Inc. San Diego, California, USA.
- Pavingerova, D., J. Dostal, R. Biskova and V. Benetka. 1994. Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Sci. 97: 95-101.
- Renou J., P., P. Briochard and R. Jalouzor. 1993. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. Plant Sci. 89: 185-197.

- Robinson K., E.P. and E. Firoozabady. 1993. Transformation of floriculture crops. *Sci. Hort.* 55: 83-99.
- SAGARPA. 2005. Anuario estadístico. www.sagarpa.gob.mx.
- SAGARPA. 2006. Anuario estadístico. www.sagarpa.gob.mx.
- Seiichi, F., J. De Jong and W. Rademaker. 1995. Efficient genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* (Ramat) Kitamura) using stem segments. *Breed. Sci.* 45: 179-184.
- Teixeira da Silva J., A. and S. Fukai. 2002a. Transgene expression following transformation of chrysanthemum by four gene introduction methods. *Propagation Of Ornamental Plants* 2: 28-37.
- Teixeira da Silva J., A. and S. Fukai. 2002b. Increasing Transient and Subsequent stable transgene expression in Chrysanthemum following optimization of particle bombardment and *Agroinfection* parameters. *Plant Biotech.* 19: 229-240.
- Teixeira da Silva J., A. 2003. *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenics biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 21: 715-766.
- Teixeira da Silva J., A. 2005. Effective and Comprehensive Chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflora*) regeneration and transformation protocols. *Biotechnology* 4: 94-107.
- Urban L., A., J.M. Sherman, J.W. Moyer and M.E. Daub. 1994. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Sci.* 98: 69-79.

Vancanneyt, G., R. Schmidt, A. O'Connor-Sánchez, L. Willmitzer and M. Rocha-Sosa. 1990. Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220: 245-250.

**6. OBTENCION DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CRISANTEMO
(*Dendranthema X grandiflorum* Kitam) QUE ACUMULAN TREHALOSA Y
TOLERANTES A ESTRÉS HÍDRICO**

RESUMEN

Varias líneas transgénicas independientes de crisantemo de la variedad 'Indianápolis' fueron obtenidas mediante agroinfección con la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, con una construcción bifuncional *ScTPS1-TPS2* con un promotor constitutivo *CaMV35S* capaz de sostener la síntesis de trehalosa. Las plantas transgénicas presentaron mayor contenido endógeno de trehalosa, así como cambios en la morfología vegetativa y floral y mayor acumulación de clorofila. Las plantas exhibieron tolerancia a sequía debido a una mayor capacidad de retención de agua, así como mayor capacidad para recuperarse después de someterse a estrés hídrico. La duración postcosecha de la flor fue menor cuanto mayor tolerancia a sequía mostraron las plantas, en comparación con la línea no transformada (NT), que mostró una mayor vida de flores después del corte, pero una mayor susceptibilidad al déficit hídrico.

PALABRAS CLAVE: Crisantemo, trehalosa, transgénicas, sequía, post-cosecha.

SUMMARY

Several independent transgenic lines of chrysanthemum of the variety 'Indianápolis' were obtained by means of agroinfection with the strain LBA4404 of *Agrobacterium tumefaciens* carrying a bifunctional construction ScTPS1-TPS2 with a constitutive promoter *CaMV35S* capable of supporting the synthesis of trehalose. The transgenic plants presented major endogenous content of trehalose, as well as changes in the vegetative and floral morphology and major accumulation of chlorophyll. The plants exhibited tolerance to drought due to a major capacity of water retention, as well as, major aptitude to recover after hydric stress. The duration post-harvest of the flower was minor major tolerance to drought they showed the plants, compared to not transformed line (NT), which showed a major vase lifet, but a major susceptibility to the water deficit.

KEY WORDS: chrysanthemum, trehalose, transgenic plants, hydric stress, post-harvest.

INTRODUCCIÓN

La trehalosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido; $C_{12}H_{22}O_{11}$; PM= 342.31) es un disacárido no reductor formado por dos moléculas de glucosa. El enlace α,α -1,1 conecta los dos extremos reductores de los residuos de glucosa

anulando su poder reductor (Paiva y Panek, 1996). Su biosíntesis se lleva a cabo a través de una vía que involucra dos enzimas: la trehalosa-6-fosfato sintasa que utiliza como sustratos glucosa-6P y UDP-glucosa para formar trehalosa-6-fosfato que es defosforilada por la trehalosa-6-fosfato fosfatasa para producir trehalosa. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ambas enzimas son codificadas por los genes *ScTPS1* y *ScTPS2*, y procariotes como *Escherichia coli* poseen los genes homólogos *otsA* y *otsB*, que codifican para las mismas enzimas (Elbein *et al.*, 2003).

Es común encontrar a la trehalosa en bacterias y hongos en ciertas etapas de su desarrollo y en cantidades considerables en organismos anhidrobiontes o criptobiontes (organismos que sobreviven a la desecación), como el tardígrado *Echiniscus blumi*, *Artemia salina* y la planta vascular inferior *Selaginella lepidophylla* (Crowe *et al.*, 1992). Estos organismos tienen en común la propiedad de sobrevivir en estado de casi total desecación, siendo capaces de soportar condiciones extremas de altas y bajas temperaturas, salinidad y radiación, para recuperar sus funciones vitales tan pronto como se rehidratan de nuevo (Crowe *et al.*, 1992).

Las propiedades fisicoquímicas de la trehalosa hacen que tenga amplias posibilidades de aplicación biotecnológica. Se ha demostrado que es capaz de proteger y estabilizar la estructura y la función de las enzimas y la integridad de las membranas biológicas bajo condiciones de estrés abiótico extremo como desecación, altas temperaturas, congelación, alta salinidad, oxidación y

radiación (Crowe *et al.*, 1984; Colaco *et al.*, 1992). Las proteínas mantienen mejor su actividad bajo estrés abiótico en presencia de trehalosa, ya que ésta reemplaza al agua formando una especie de cápsula alrededor de la proteína deshidratada protegiendo así su estructura terciaria y su actividad (Lins *et al.*, 2004). La capacidad de la trehalosa para proteger las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con éstas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos, evitando la fusión, la separación de fases y el rompimiento de las membranas (Crowe *et al.*, 1984). Las evidencias sugieren que la trehalosa retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trehalosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido (Crowe *et al.*, 2001).

En años recientes se ha demostrado que la trehalosa en las plantas está involucrada en procesos como el desarrollo del embrión (Eastmond *et al.*, 2002), el desarrollo vegetativo normal y la transición a la floración (Van Dijken *et al.*, 2004; Schluepmann *et al.*, 2003). Plantas transgénicas que acumulan trehalosa se vuelven tolerantes a estrés abiótico, incluyendo sequía, salinidad y heladas (Miranda *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2002; Holmstrom *et al.*, 1996). Estos efectos se deben en gran medida a que el intermediario trehalosa-6P ha demostrado ser una eficiente y ubicua molécula señalizadora en diferentes procesos, ya que induce genes relacionados con la adaptación al estrés (Avonce *et al.*, 2004) y también regula el metabolismo del carbono (Schluepmann *et al.*, 2003) y la fotosíntesis (Garg *et al.*, 2002). Se demostró que una mayor acumulación de trehalosa-6P indujo una mayor tasa

fotosintética, mientras que su disminución produjo el efecto contrario (Paul y Pellny, 2003; Paul *et al.*, 2001).

El crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas de todo el mundo. En China se emplea como ornamental y su modificación por mejora genética tradicional data desde hace 2000 años. La producción es importante en varios países europeos, como los Países Bajos, Gran Bretaña y Francia; así como en Colombia, Estados Unidos y Canadá donde es desde hace varios años un cultivo industrial (Teixeira da Silva, 2003b). Los crisantemos, tanto el estándar (un solo tallo) como los de ramillete (pompón y spider), tienen una larga vida postcosecha cuando se les maneja adecuadamente. Sin embargo, cuando hay dificultades en la absorción y el transporte del agua en el tallo, ocurre amarillamiento y marchitamiento prematuro de sus hojas y pétalos, disminuyendo la calidad del producto (Reid & Dodge, 2003).

La trehalosa puede contribuir a alargar la vida postcosecha de las flores, ya que plantas transgénicas que acumulan este azúcar, mejoran su estatus hídrico (Miranda *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2002). También se ha reportado que flores de tulipán y de gladiolos, retrasaron la senescencia cuando se les colocó en una solución 50-100 μ M de trehalosa. Este comportamiento se atribuyó a que la trehalosa mejoró la capacidad de retención de agua de las flores cortadas (Iwaya-Inoue y Takata, 2001; Otsubo y Iwaya-Inoue, 2000).

En este trabajo se reporta la obtención de plantas transgénicas de crisantemo que acumulan trehalosa de manera endógena, al sobreexpresar el gen quimérico 35S::ScTPS1-TPS2::NOS, y se evaluó la tolerancia al estrés hídrico y la vida postcosecha de sus flores una vez que son cortadas.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal.

Se utilizaron esquejes sin enraizar de *Dendrathera grandiflora* Kitam de la variedad 'Indianápolis' cultivados en el invernadero. Para la desinfestación las hojas fueron cuidadosamente eliminadas para evitar daño en la epidermis del tallo. Una vez eliminadas las hojas, los tallos se colocaron en solución de detergente al 3 % durante 3 minutos, etanol 70 % durante 1 minuto, solución de Plant Preservative Mixture (PPM™) al 2 % durante 5 minutos y finalmente hipoclorito de sodio 15 % con 0.1 mL de Tween 20, por 10 minutos. Al final el material se enjuagó tres veces con agua esterilizada. Finalmente, se cortaron secciones internodales de aproximadamente 2 mm de longitud.

Medios de cultivo y condiciones experimentales.

Para la transformación se empleó el medio de Murashige y Skoog (1962) (MS) sin hormonas con 20 g.L⁻¹ de glucosa. El medio selectivo para regeneración fue el medio MS con 1 mg.L⁻¹ de 6-bencilaminopurina-HCl (BAP) y 1 mg.L⁻¹ de

ácido indolacético (AIA), 20 g.L⁻¹ de glucosa, 250 mg.L⁻¹ de ticarcilina y 10 mg.L⁻¹ de kanamicina durante 1 semana. Posterior a la semana, los explantes se pasaron a medio MS con 1 mg.L⁻¹ de BAP y 1 mg.L⁻¹ de AIA, 20 g.L⁻¹ de glucosa, 125 mg.L⁻¹ de ticarcilina y 10 mg.L⁻¹ de kanamicina en el cual se mantuvieron por una semana, hasta la formación de callo y brotes adventicios. En esa etapa, fueron transferidos a medio MS con 1 mg.L⁻¹ de BAP, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 125 mg.L⁻¹ de ticarcilina y 15 mg.L⁻¹ de kanamicina, hasta la formación de brotes, lo cual requirió un promedio de 3 semanas. Una vez que los brotes tenían un tamaño de 1 cm fueron transferidos a medio MS sin hormonas, 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 125 mg.L⁻¹ de ticarcilina y 15 mg.L⁻¹ de kanamicina, para que alcanzaran 5 cm. Finalmente, estos brotes se llevaron a la etapa de enraizamiento en un medio con la mitad de sales del medio MS, 15 g.L⁻¹ de sacarosa, 125 mg.L⁻¹ de ticarcilina y 15 mg.L⁻¹ de kanamicina, las raíces se desarrollaron por espacio de dos semanas. Todos los cultivos se mantuvieron bajo una temperatura de 24 ± 1 °C (16 horas de fotoperíodo, 96 μmol.m⁻².s⁻¹, con lámparas fluorescentes).

Cepa de *Agrobacterium* y construcción.

La transformación se llevó a cabo con la cepa LBA4404, con el vector binario pBIN19::35S::ScTPS1-TPS2::NOS. La construcción es una fusión traduccional de los dos genes que en levadura catalizan la formación de trehalosa-6-fosfato como producto intermedio y trehalosa como producto final (Miranda *et al.*, 2007).

Transformación y selección de transformantes.

Secciones internodales de tallo se colocaron en el medio para cocultivo, y se inocularon en forma individual con un volumen de 15 a 20 μL de la suspensión bacteriana con una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, la cual contenía el cultivo bacteriano en una solución de glucosa 10 mM y acetosiringona 100 μM . Después de 3 días de cocultivo los explantes se transfirieron al medio selectivo y condiciones descritas en la sección de medios de cultivo y condiciones experimentales.

Adaptación de plantas en invernadero.

El agar fue cuidadosamente eliminado de las plantas regeneradas *in vitro* con sistemas radiculares bien desarrollados. Posteriormente se transfirieron a vasos de plástico transparente, que contenían agrolita molida esterilizada como sustrato, se humedeció el sustrato con agua esterilizada. Las plantas se colocaron en el sustrato cubriendo la parte radical con RADIX[®] en polvo como enraizador. Se tapó el vaso con otro vaso de plástico y se selló completamente con cinta adhesiva. Las plantas se mantuvieron bajo estas condiciones durante dos semanas en presencia de luz continua. Después de ese período, se hicieron perforaciones en el vaso superior para entrada de aire y se agregó agua. Una vez que las plantas alcanzaron una altura de 12 cm de alto se colocaron en macetas, cuyo sustrato fue una mezcla de 'peat moss' y agrolita (1:1). En el invernadero, las plantas se sometieron a dos horas de luz artificial

con focos de 100 W en la medianoche para mantener el estado vegetativo. Las plantas se fertilizaron cada 8 días con el compuesto 19-19-19 (N, P y K). Bajo estas condiciones se mantuvieron por cinco semanas. La floración se indujo modificando el régimen de luz, al pasar las plantas a un invernadero con iluminación natural del invernadero (12 horas de luz y 12 de oscuridad).

Para los ensayos fisiológicos, las plantas adaptadas a las condiciones del invernadero, se dejaron crecer durante 6 semanas, para luego eliminar la yema apical y permitir el desarrollo de las yemas axilares las cuales luego fueron escindidas para emplearlas como esquejes y propagarlos en macetas individuales.

Análisis molecular (PCR).

El ADN del tejido fue aislado de acuerdo al protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). Se llevaron a cabo ensayos de PCR para la detección de un fragmento del gen *nptII*, que forma parte del ADN-T en las plantas transformadas. Para tal efecto se utilizaron los siguientes iniciadores: 5'-AGA TGG ATT GCA CGC AGG TTC-3' ('forward') y 5'-GAA GAA CTC GTC AAG AAG GCG-3' ('reverse'), que amplifica un fragmento de 780 pb. La reacción de PCR fue llevada a cabo en volúmenes de 50 µL con la siguiente mezcla de reacción: amortiguador PCR con MgCl₂ (1.5 µM), 5 µL; dNTPs (0.4 µM), 2 µL; iniciador 1 (0.4 µM), 2 µL; iniciador 2 (0.4 µM), 2 µL; ADN templado (100 ng), 1 µL; Taq ADN polimerasa

(1 unidad), 2 μ l; H₂O desionizada esterilizada, 36 μ l. El programa de la amplificación fue de 94 °C por 3 minutos, 1 ciclo, y luego 40 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 56 °C, 1 minuto y 72 °C, 1 minuto. Finalmente se aplicaron 72 °C por 10 minutos y se llevó a cabo en un termociclador Hybaid. Se emplearon 10 μ L de la reacción para analizar en un gel de agarosa al 1.5 %. El gel se documentó en un sistema EDAS 290 de Kodak.

Detección de trehalosa por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

La extracción y cuantificación de trehalosa, se realizó a partir de las líneas transgénicas de cada construcción más su respectivo testigo (plantas no transformadas). Para la cuantificación de trehalosa por CLAE se utilizó una columna para análisis de carbohidratos Agilent Zorbax®, con un flujo de 1 ml.minuto⁻¹ a una temperatura de 30 °C, utilizando como fase móvil una mezcla previamente filtrada y sonificada con acetonitrilo: Agua (grado CLAE) en proporciones de 65:35. El cromatógrafo empleado fue un modelo KS801 de la marca de Waters®, (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), equipado con un sistema de distribución de disolventes (bomba 600E) y un detector de UV con rearreglo de diodos Waters 410®, integrado a un equipo de computo. El procesamiento y manejo de los datos cromatográficos se hizo a través del programa Millennium 2000 (Waters). Para la cuantificación de trehalosa, las muestras se compararon con los siguientes estándares: 5 μ g.mL⁻¹

10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. La extracción y cuantificación de trehalosa, se realizó a partir de las líneas transgénicas de cada construcción más su respectivo testigo (planta sin transformar).

Detección de clorofila.

La medición de la clorofila se realizó por el método de Ross (1974). Se hizo la extracción del pigmento a partir de un gramo de material vegetal, con acetona al 80 % y se midió la absorbancia a 645, 652 y 663 nm.

Medición de niveles de desecación.

Se escindieron cinco hojas de plantas completas desarrolladas *in vitro*, y se dejaron secar dentro de una cámara de flujo laminar para estimar la pérdida de agua en función del tiempo. Se tomaron lecturas del peso fresco de las hojas cada 10 minutos, durante un período de 80 minutos.

Contenido relativo de agua (CRA).

En tres plantas de cada línea, se cortó una hoja de la base, en la misma posición para cada planta muestreada. Se registró el peso fresco (PF) y luego el material vegetal se sumergió en agua destilada por 24 horas, al cabo de la cual se secó y se obtuvo el peso húmedo (PH). Luego se secó a 65 °C por 24 horas

para obtener el peso seco (PS). El contenido relativo de agua se obtuvo con la fórmula: $CRA = (PF-PS)/(PH-PS)$.

Ensayo de recuperación después de someter a estrés hídrico.

Plantas de 5 semanas de edad, cultivadas bajo condiciones de invernadero se privaron de agua durante 20, 22 y 27 días. Posterior a esos días se regaron hasta saturación y se registró su recuperación a las 24 horas.

Duración de las flores después del corte.

Una vez que las plantas de la misma edad en el invernadero, florecieron, se cortaron y colocaron en agua con cloranfenicol 50 μ M (Inoue & Takata, 2001) para evitar la contaminación bacteriana y con ello la obstrucción de los conductos vasculares. Se evaluó el tiempo que las flores duraron en la solución antes de marchitarse, utilizando una escala de senescencia con 4 estadios definidos en la variedad no transformada (Figura 10).

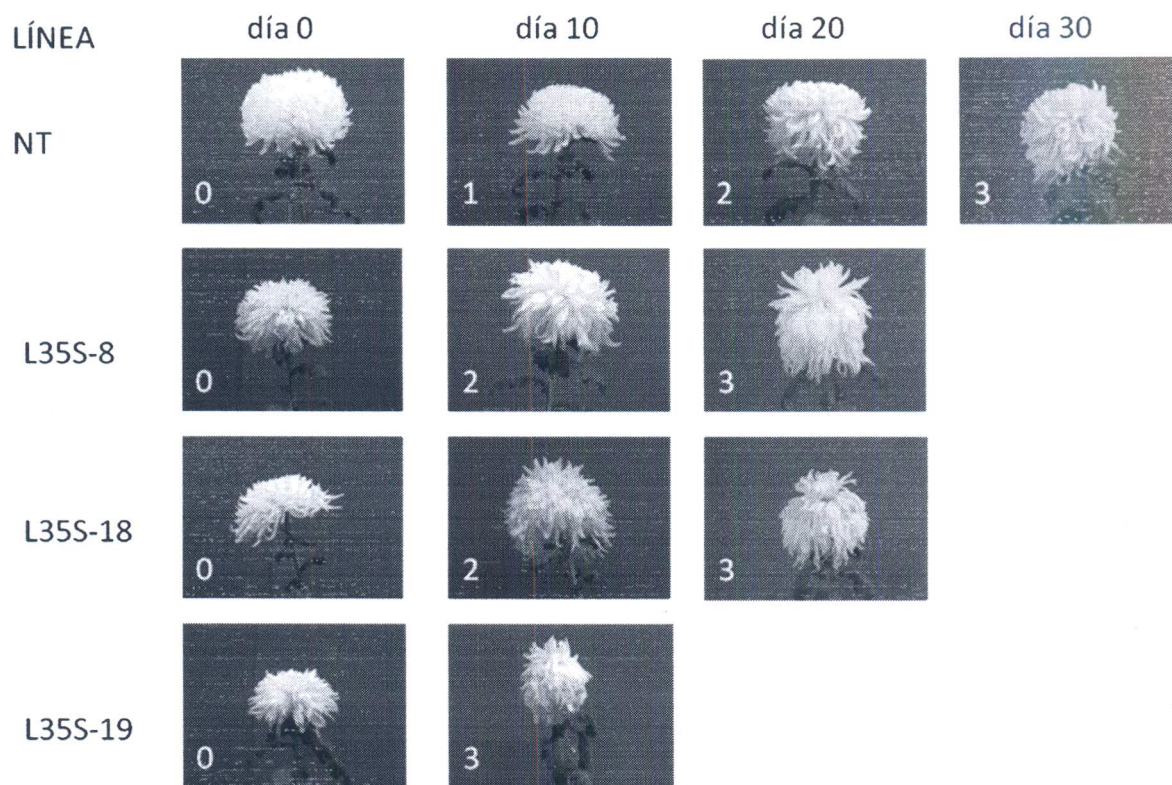


Figura 10. Comportamiento de las flores producidas por las líneas transgénicas que acumulan trehalosa y las no transgénicas (NT). El número anotado en la esquina inferior izquierda corresponde a la calificación de senescencia asignado en la escala 0 a 3. Los cuatro estadios se muestran con la línea NT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas transformadas acumulan más trehalosa y clorofila.

De tres experimentos independientes en los que se agroinfectaron un total de 1093 explantes, fueron recuperadas 33 líneas transgénicas independientes resistentes a 15 mg.L^{-1} de kanamicina y capaces de formar raíces, lo cual dió una eficiencia de transformación del 3 % (Figura 11). Todas las plantas

resistentes a kanamicina fueron posteriormente analizadas por PCR para comprobar la presencia del gen *nptII* (Figura 12). Las plantas transgénicas creciendo *in vitro* mostraron algunas diferencias morfológicas en comparación con las no transgénicas (NT), como color verde más intenso, entrenudos más cortos, hojas lanceoladas y menor altura (Figura 11). Sin embargo, cuando las plantas se adaptaron a las condiciones *ex vitro* (con excepción de la morfología de la flor), el aspecto vegetativo de las plantas transgénicas se fue tornando similar a la NT, con excepción de una de tres líneas utilizadas para experimentos posteriores (Figura 13) (Cuadro 12). Se determinó el contenido de trehalosa de una submuestra de las plantas transformadas y se identificaron algunas líneas que acumularon mucha más trehalosa que las plantas NT (150 contra 20 ng trehalosa por mg peso fresco) (Figura 14). Asumiendo que el color verde más intenso de las líneas transgénicas pudiera deberse a una mayor actividad fotosintética, se determinó el contenido de clorofila en una muestra de las plantas, encontrándose que hubo una relación positiva entre la acumulación de trehalosa y el contenido de clorofila (Figura 15). Se ha reportado previamente que plantas transgénicas de arroz que sobre expresan la construcción bifuncional *otsA-otsB*, acumulan más trehalosa y muestran una mayor capacidad fotosintética por unidad de área foliar, lo cual se atribuye más a la acumulación de trehalosa (Garg *et al.*, 2002) que del intermediario trehalosa-6-P como ha sido propuesto (Paul y Pelny, 2003).

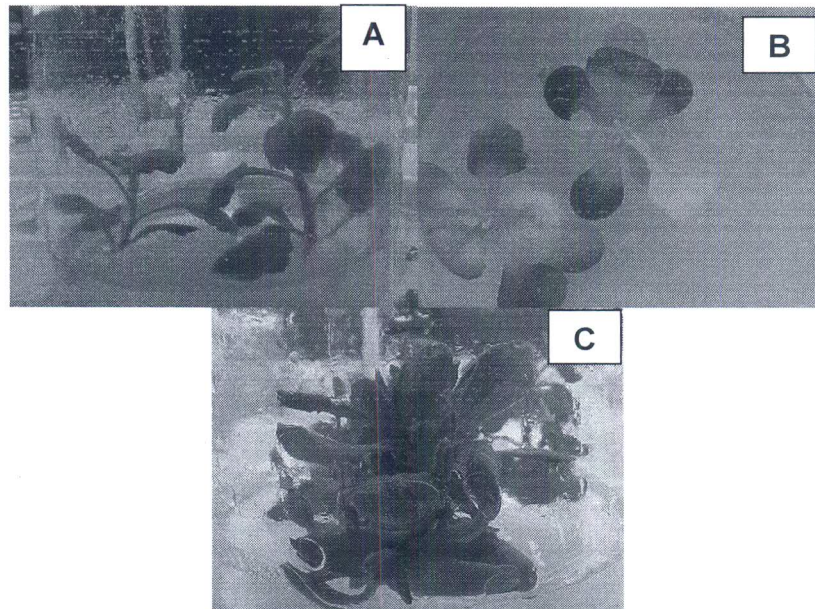


Figura 11. Plantas de crisantemo. (A) no transgénicas desarrolladas en medio no selectivo, (B) no transgénicas desarrolladas en medio selectivo, (C) transgénica en medio selectivo.

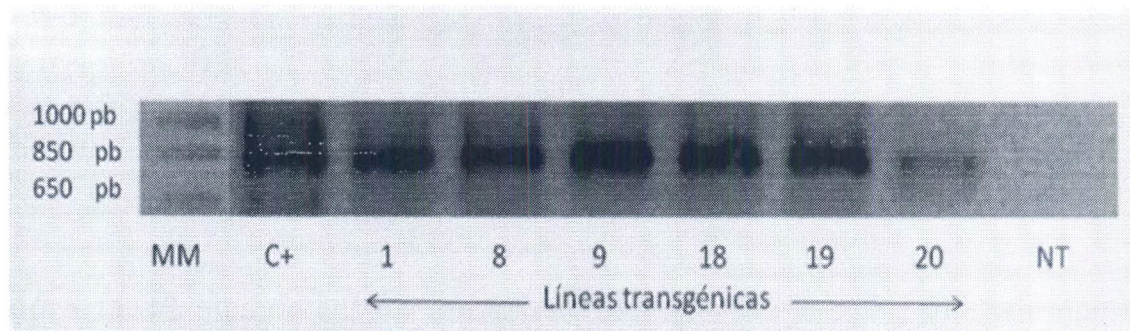


Figura 12. Amplificación por PCR de un fragmento de 780 pb del gen *nptII*, empleado como gen de selección al hacer la transformación genética. En el control positivo (C+) se amplificó el fragmento de *Arabidopsis* transformada con el vector pBI121 que también lleva el gen *nptII*.



Figura 13. Plantas de crisantemo transgénicas y no transgénica (NT), de seis semanas de crecimiento en maceta y bajo condiciones de invernadero.

Cuadro 12. Características morfológicas de líneas transgénicas de crisantemo cv. 'Indianápolis' que acumulan trehalosa y plantas no transformadas (NT).

	NT	Li-8	Li-18	Li-19
Altura	78.1 $\pm$ 4.2	63.5 $\pm$ 3.2	67.7 $\pm$ 8.0	62.3 $\pm$ 3.9
No. entrenudos	38.7 $\pm$ 2.7	29.5 $\pm$ 1.7	30.9 $\pm$ 1.8	33 $\pm$ 2.7
Floración (d)	61.5 $\pm$ 0.9	62.4 $\pm$ 1.1	62.2 $\pm$ 1.2	61.7 $\pm$ 1.0
Diámetro flor	12.6 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.9	11.4 $\pm$ 0.9	10.4 $\pm$ 0.5

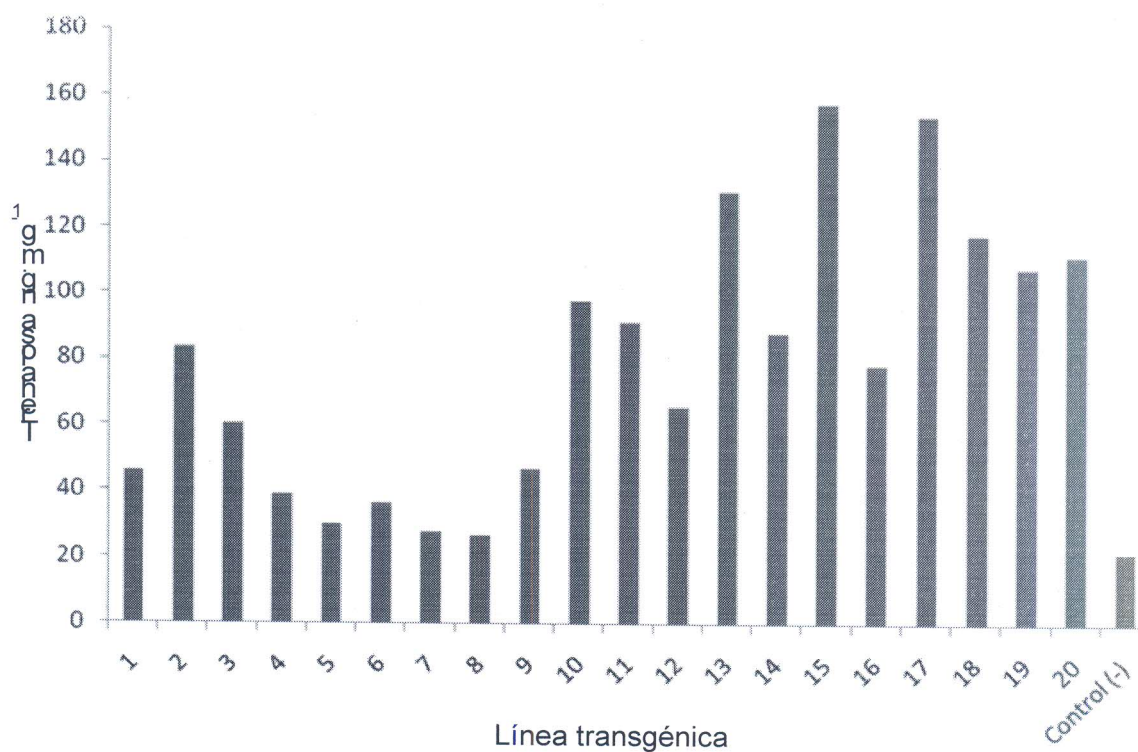


Figura 14. Contenido de trehalosa en 20 líneas transgénicas analizadas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. El Control (-) son plantas no transgénicas.

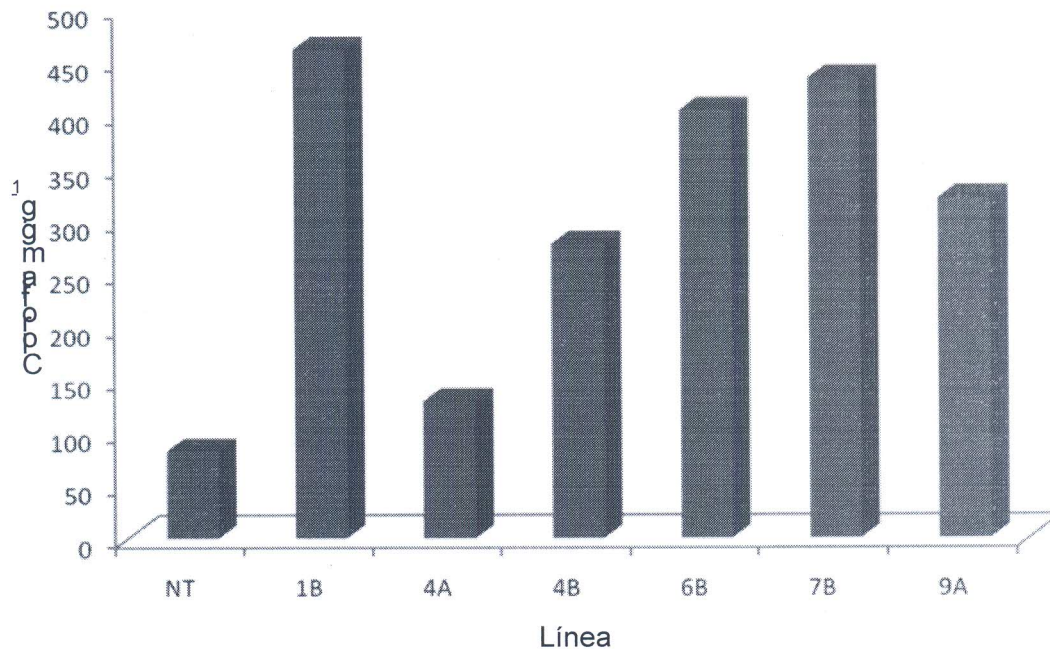


Figura 15: Contenido de clorofila en seis líneas transgénicas y una no transgénica.

Las plantas transformadas son tolerantes a estrés hídrico.

Para probar este fenotipo, primero se hizo un experimento de desecación de hojas de algunas líneas transgénicas, en comparación con la variedad NT. Como se aprecia en la Figura 16, todas las líneas transgénicas retienen más agua que la NT, incluyendo las líneas que acumulan poca trehalosa. Al tomar una muestra de cada línea se observó que no hubo cambios morfológicos en la raíz de las líneas transgénicas y la variedad NT (Figura 13).

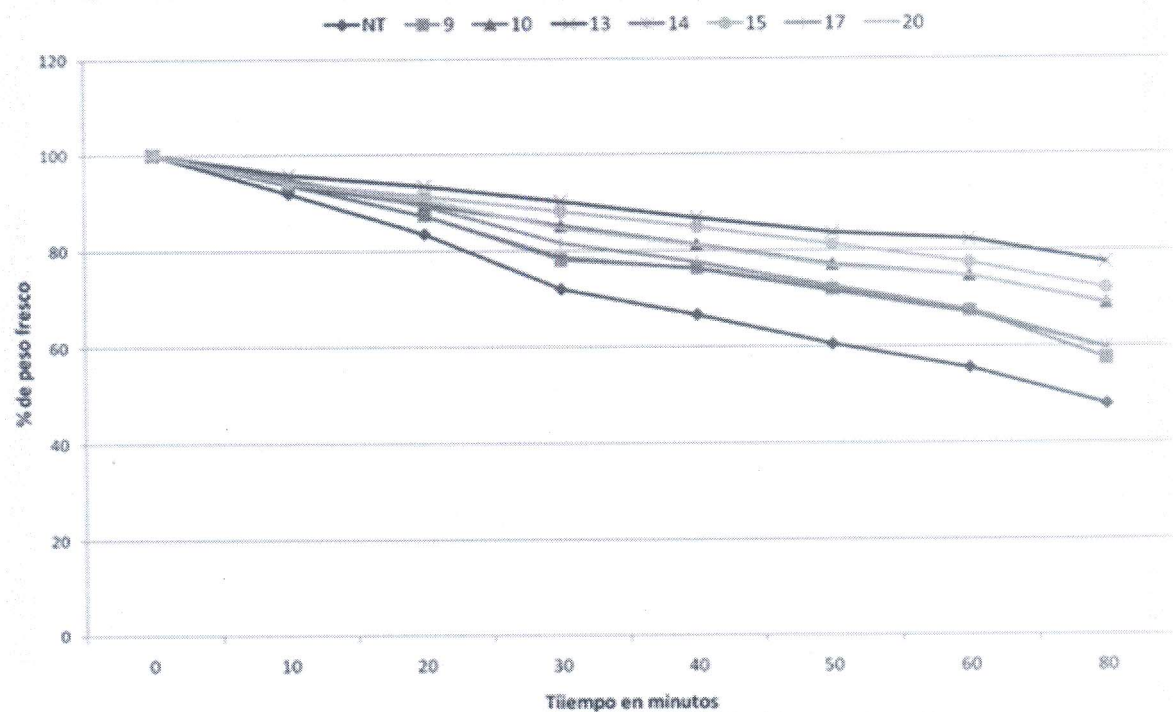


Figura 16. Efecto del contenido de trehalosa en la pérdida del peso fresco.

A los 15 días se tomaron muestras de tejido para determinar el contenido relativo de agua (CRA) (Figura 17). Las plantas transgénicas poseen un mejor estatus hídrico, demostrado al medir el CRA en plantas enteras sometidas a sequía.

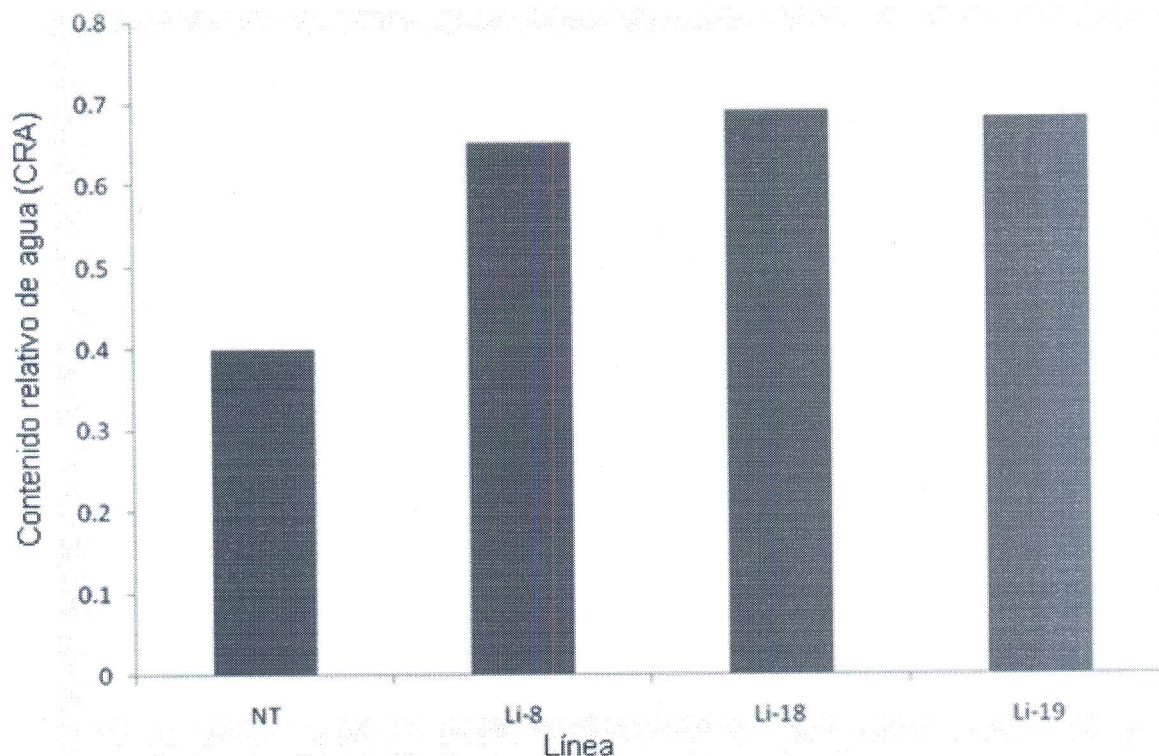


Figura 17. Contenido relativo de agua (CRA) en plantas transgénicas y no transgénicas (NT) de 8 semanas de edad, después de 15 días sin riego.

Se tomaron muestras de plantas a los 20, 22 y 27 días. Las plantas se irrigaron hasta capacidad de campo y luego se registró la recuperación de las plantas a las 24 horas. La variedad NT no toleró el estrés hídrico de 20 días, mientras que las líneas 35S-18 y 35S-19, toleraron hasta 22 días sin regar. La línea 35S-19 se pudo recuperar hasta 27 días después de ser sometida a sequía (Figura 18). Las plantas transgénicas mostraron mayor tolerancia a la sequía que las NT. Esto se atribuye a la acumulación de trehalosa, pero no parece ser que a mayor trehalosa, mayor tolerancia a sequía, pues las líneas 35S-18 y 35S-19 contienen igual cantidad de trehalosa endógena, pero la segunda fue más

tolerante que la primera. Estos resultados coinciden con lo reportado previamente en plantas de *Arabidopsis thaliana* y arroz sometidas durante 20 días a estrés hídrico (Miranda *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2002). Además del posible efecto osmoprotector de la trehalosa, se ha demostrado que la sobreexpresión de *ScTPS1-TPS2*, e incluso de sólo *TPS1*, produce un fenotipo de tolerancia a sequía, presumiblemente por la activación de genes que en la planta contribuyen a su adaptación al estrés abiótico. Posiblemente este efecto esté dado más por el intermediario trehalosa-6P que por la trehalosa misma (Miranda *et al.*, 2007; Avonce *et al.*, 2004; Garg *et al.*, 2002). Previamente se había reportado la obtención de líneas transgénicas de crisantemo tolerantes a sequía y salinidad al sobreexpresar el factor de transcripción *AtDREB1A*. El incremento en la tolerancia se atribuyó entre otros factores, a una mayor acumulación de prolina y a la trans activación y mayor actividad de la superóxido dismutasa (Bo *et al.*, 2006).

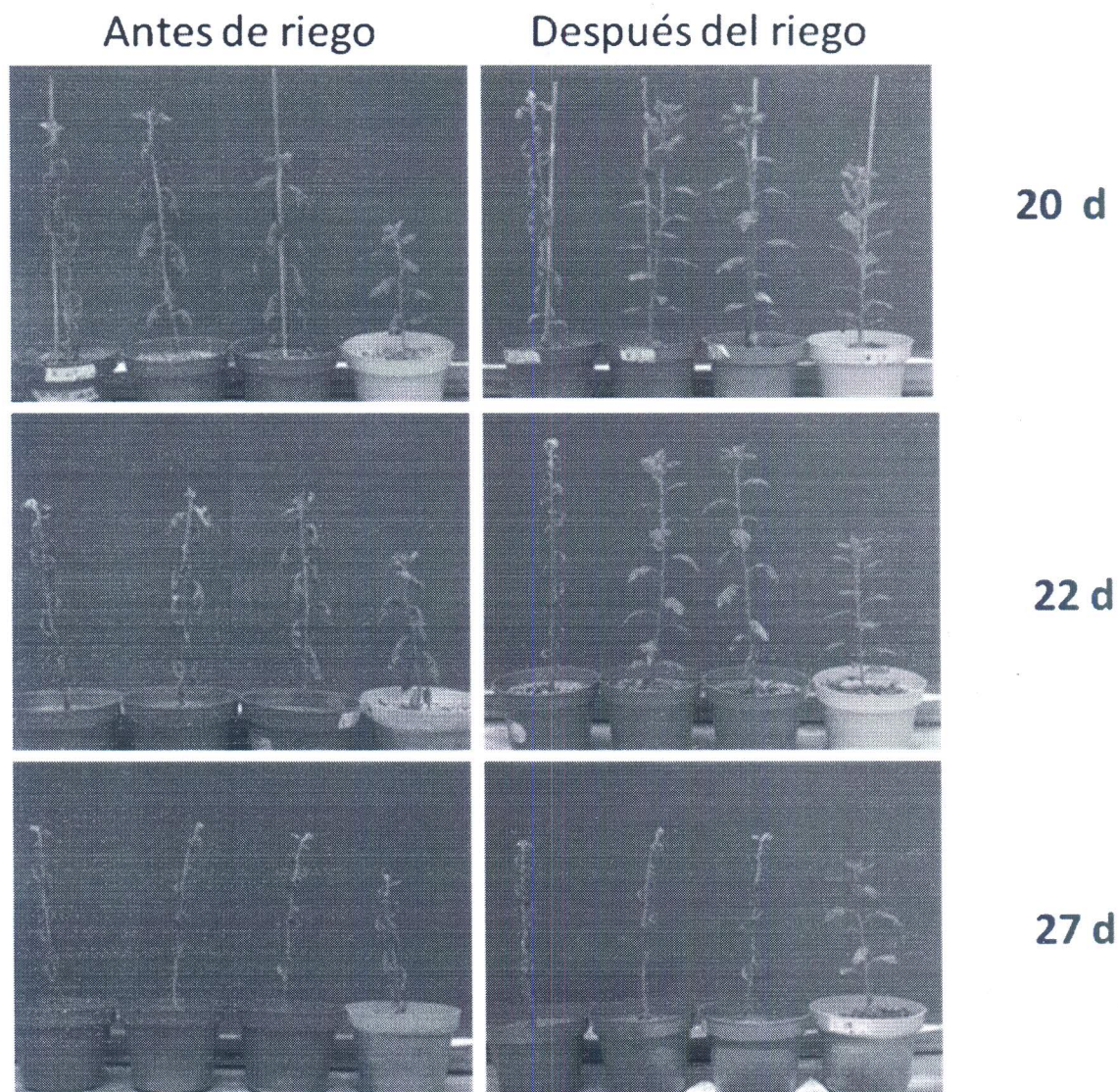


Figura 18. Experimentos de desecación y recuperación a las 24 horas después de irrigar las plantas hasta capacidad de campo. Las líneas transgénicas toleran más la sequía en comparación con la NT, pero la línea 35S-19 muestra mayor tolerancia. Se indican el número de días que las plantas se dejaron sin irrigar (De izquierda a derecha: NT, 35S-8, 35S-18, 35S-19).

Las plantas que acumulan trehalosa senescen más pronto.

Las líneas transgénicas que acumulan trehalosa senescieron más rápido que la variedad original NT. También fue notorio, que la línea más tolerante a la sequía (35S-19), tuvo una menor vida postcosecha (Figura 10). Este resultado no deja de ser sorprendente, pues previamente se había reportado que la aplicación exógena de trehalosa mejora la capacidad de retención de agua de las plantas y con su vida en el florero (Iwaya-Inoue y Takata, 2001; Otsubo y Iwaya-Inoue, 2000). También se ha reportado que la acumulación endógena de trehalosa y del intermediario trehalosa-6P, incrementa la tasa fotosintética y altera el contenido de carbohidratos, incrementando ligeramente el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa, en comparación con plantas no transformadas (Garg *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el contenido endógeno de trehalosa-6P y de trehalosa, afecta el metabolismo de carbohidratos. Es posible que tanto la fotosíntesis como la glicolisis se vean afectadas en las plantas transformadas con niveles alterados de estos compuestos (Schluepmann *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en este trabajo parecen confirmar lo anterior, aportando información adicional, pues pareciera que hay una conexión también con el proceso de senescencia. En las plantas, la senescencia está regulada más que nada por el contenido endógeno de citocininas y etileno. Mientras que las citocininas retrasan este proceso, el etileno lo acelera (Rolland *et al.*, 2002). Pareciera que al incrementar el metabolismo de la trehalosa, se inhibe el efecto de las citocininas y se refuerza el efecto del etileno. Demostrar la conexión entre el metabolismo de la trehalosa y la señalización mediada por estas

hormonas vegetales requerirá de experimentación básica adicional, como se ha hecho para el caso de la glucosa (Paul *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2002). En este trabajo se ha demostrado que mejorar el estatus hídrico no necesariamente alarga la vida post cosecha en las flores. Es posible, sin embargo, que plantas que acumulen más trehalosa si puedan alargar la vida en el florero si se utiliza un promotor no constitutivo para controlar la expresión de la construcción *ScTPS1-TPS2*, como el promotor *Rd29A* de *A. thaliana*, que se induce por sequía, ABA y frío (Kasuga *et al.*, 1999; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993), ya que regular el contenido endógeno de trehalosa a lo largo del ciclo de vida de la planta permitirá mejorar su efecto en la post cosecha, pero perturbando al mínimo la fisiología de la planta antes del corte de la flor.

LITERATURA CITADA

- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Thevelein, JM., Iturriaga, G. 2005. The Arabidopsis trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- Bo, H., Zheng, T., Nan, M.A., Jianke, L., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Junping, G. 2006. Heterologous expression of the *AtDREB1A* gene in chrysanthemum increases drought and salt stress tolerance. *Science in China Series C: Life Sciences* 49: 436-445.

- Colaco, C.; Sen, S.; Thangavelu, M.; Pinder, S.; Roser, B. 1992. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Bio/Technol.* 10: 1007-1111.
- Crowe, J., Crowe, L., Chapman, D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism. The role of trehalose. *Science* 223: 209-217.
- Crowe, J., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-599.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, J., Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Eastmond, P.J., van Dijken, A.J.H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A.F., Dickinson, H.G., Jones, J.D.G., Smeekens, S.C., Graham, I.A. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant Journal* 29: 225-235.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13: 17R-27R.
- Fukai S. 2003. *Dendrathera* species as chrysanthemum genetic resources. *Acta Horti.* 620: 167-174.
- Garg, A.K., Kim, J., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.S., Kochian, L.V., Wu, R.J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 15898-15903.
- Goddjin, O.J.M.; van Dun, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 315-319.

- Holmstrom, K.O., Mantyla, E., Welin, B., Mandal, A., Palva, E.T., Tunnela, O.E., Londesborough, J. 1996. Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683-684.
- Iwaya, I., Takata, M. 2001. Trehalose plus chloranphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *HortSci.* 36: 946-950.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* 17: 287-291.
- Lins, R.D.; Pereira, C.S.; Hunenberger, P.H. 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins* 55: 177-186.
- Luo, Y., W.M. Li y W. Wang. 2007. Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. *Environ. Exp. Bot.* 63: 378-384.
- Miranda, J.E., N. Avonce, R. Suárez, J.M. Thevelein, P. Van Dijck y G. Iturriaga. 2007. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1411-1421.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor *HXK1* in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332-36.
- Otsubo, M., Iwaya-Inoue, M. 2000. Trehalose delays senescence in cut gladiolus spikes. *HortSci.* 35: 1107-110.

- Paiva, C.L., Panek, A.D. 1996. Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 293-314.
- Paul, M., Peliny, T., Goddijn, O. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends in Plant Sci.* 6: 197-200.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D. and Zhang, Y. 2007. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-41.
- Penna, S. 2003. Building stress tolerance through over-producing trehalose in transgenic plants. *Trends Plant Sci.* 8: 355-356.
- Reid, M.S. y Dodge, L.. 2003. *Crisantemo: Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha*. Department of Enviromental Horticultura. University of California. Davis, CA. USA. Pp 1-4.
- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: S185-S205.
- Ross, W.C. 1974. *Plant Physiology Laboratory Manual*. Wadsworth Publishing Company Inc., Belmont, California, USA: 250 p.
- Schluepmann, H.; Pellny, T.; van Dijken, A.; Smeekens, S.; Paul, M. 2003. Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11: 6849-6854.
- Teixeira da Silva, J.A. (2003). *Chrysanthemum*: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 21: 715-766.

- Van Dijken, A.J.H., Schluepmann, H., Smeekens, S.C.M. 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol.* 135: 969-977.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

7.1. Regeneración eficiente de la variedad 'Indianápolis'.

Se evaluaron seis variedades de crisantemo en su capacidad para regenerar brotes por organogénesis directa a partir de segmentos internodales de tallo. Son variedades cultivadas en el área de influencia de la UACH y son la 'Indianápolis', 'Texana', 'Puma', 'Shosmy', 'Eleonora' y 'Hartmann'. De éstas, únicamente 'Indianápolis' y 'Texana' tuvieron porcentajes de regeneración mayores a 50 % (Valle-Sandoval *et al.*, 2008). Confirmando con ésto la influencia del genotipo en la eficiencia de la multiplicación *in vitro* de crisantemo. En las etapas sucesivas de la investigación, se decidió trabajar con la variedad 'Indianápolis', ya que mostró un mayor porcentaje (75 %) de regeneración y una producción de más de 3 brotes por explante en el medio de Murashige y Skoog (MS) con 2 mg L⁻¹ de la citocinina Bencilaminopurina (BAP) y 1 mg L⁻¹ de la auxina Acido Indolacético (AIA), utilizando como explante secciones de tallo.

Se evaluó la glucosa como posible agente de selección durante la transformación genética, ya que se ha reportado que las semillas son capaces de germinar y los explantes de tabaco de emitir brotes en un medio con glucosa

como fuente de carbono, cuando se transforman con el gen *AtTPS1* (Leyman *et al.*, 2006). La germinación de las semillas y la formación de brotes en explantes no transformados son fuertemente inhibidos por la glucosa al 6 %. Aunque se observó que la inhibición en el desarrollo y la respuesta morfogénética de los explantes de crisantemo se daba a partir de 6 % de glucosa en el medio, también se determinó que al 2 % de glucosa el efecto es contrario, ya que hubo un efecto estimulante sobre la emisión de brotes de los explantes (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación). No se continuó explorando el efecto inhibitorio de la glucosa y su posible uso como agente selectivo en crisantemo, pero si se analizó con más detalle el efecto de la glucosa sobre la organogénesis directa. Se encontró que la eficiencia de regeneración o de brotación (EB) prácticamente se duplicó en la variedad 'Indianapolis' al combinar la ganancia en el % de explantes con brotes (% B) y el número de brotes por explante (NB). Esta respuesta sólo se logró cuando se aplicó transitoriamente la glucosa, ya que después de dos o tres semanas se comenzaron a desarrollar pequeños brotes que tuvieron que transferirse a un medio con 3 % de sacarosa para que se desarrollen normalmente (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación). La glucosa ejerce gran cantidad de efectos en el desarrollo de las plantas, lo cual no es raro, ya que se ha demostrado que este azúcar interactúa en una red compleja de señalización con los reguladores vegetales más importantes, como el ABA, el etileno, las auxinas y las citocininas (Leon y Sheen, 2003; Moore *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2002). La glucosa inhibe la germinación, el desarrollo de la plántula y la floración al contrarrestar el efecto de las citocininas y estimular el efecto

inhibitorio de las auxinas sobre los procesos mencionados (Rolland et al., 2002). Los datos reportados en este trabajo indican que hubo mayor interacción entre glucosa-citocininas que entre glucosa-auxinas (Valle Sandoval *et al.*, 2008; en preparación). El efecto de la glucosa observado en este trabajo es relevante como para considerarlo como una contribución importante en el desarrollo de protocolos más eficientes para la regeneración por organogénesis directa de crisantemo. Muchos protocolos de transformación genética fallan debido a la carencia de un protocolo de regeneración eficiente de plantas *in vitro*. Sería interesante probar si el efecto observado se extiende a otras variedades de crisantemo, a otras especies e incluso a otras vías de respuesta morfogénica como la embriogénesis somática y la organogénesis indirecta. Algunos reportes parecen indicar que este podría ser el caso (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación).

7.2. Desarrollo de un protocolo de transformación por agroinfección.

Para tratar de tener éxito en la transformación de la variedad 'Indianápolis' de crisantemo, en este trabajo se procedió primero a establecer los parámetros más eficientes para la agroinfección. Esto se llevó a cabo mediante experimentos de expresión transitoria con el gen *GUS* y *GUSint* (el gen *GUS* con un intrón). Los resultados mostraron que las mejores condiciones de transformación para esta variedad son utilizar la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, infectar explantes de segmentos circulares o

semicirculares de tallo, realizar el medio de cocultivo en MS sin hormonas, inocular la bacteria por aplicación directa en la zona de respuesta organogenética del explante en volúmenes de 10 a 25 μL de la suspensión bacteriana y dar una fase de cocultivo de tres días; la selección de transformantes estables debe realizarse en medio MS con 15 mg.L^{-1} de kanamicina, lo cual permite seleccionar los brotes transformados. Conjuntando los resultados de estos experimentos, se estableció un protocolo de transformación con una eficiencia de 3 % (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; sometido para su publicación). Se han reportado eficiencias de transformación bastante variables en crisantemo. La eficiencia de transformación normalmente se calcula dividiendo el número de explantes transformados, entre el número de explantes agroinfectados o bombardeados por 100. Por ejemplo, la variedad 'Fashion Yellow' pudo transformarse a una eficiencia de hasta 99 %. Sin embargo otras variedades muestran ser bastante reticentes a la transformación, como la variedad Garland, donde se reportó una eficiencia menor al 0.001 % y para la 'Moneymaker', la eficiencia fue de 0.1 a 8 % en reportes diferentes (Teixeira da Silva, 2003). Recapitulando la experiencia para transformar diferentes variedades y especies, parece ser que uno de los aspectos más críticos es el contar con un protocolo de regeneración eficiente antes de optimizar los parámetros de la agroinfección o de la biobalística. Cualquier mejora en la eficiencia de regeneración, incidirá positivamente en las posibilidades de obtener transformantes.

7.3. Obtención y evaluación de plantas transgénicas que acumulan trehalosa.

Una vez optimizados los parámetros para la transformación por expresión transitoria utilizando el gen reportero *GUS*, se procedió a realizar experimentos de transformación estable con los genes quiméricos *35S::ScTPS1-TPS2::NOS* y *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*. Con la primera construcción, y utilizando una presión de selección de 15 mg.L⁻¹ de kanamicina, se obtuvieron 33 líneas transformadas independientes con raíces a partir, de 1093 explantes infectados, lo cual dio una eficiencia de transformación del 3 %. Mientras se mantuvieron *in vitro*, las plantas de las líneas transformadas mostraron algunas anomalías, como entrenudos cortos, menor altura, hojas más lanceoladas y color verde más intenso que las plantas no transformadas (NT) (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación). Las plantas transformadas fueron primero analizadas por PCR, amplificando un fragmento de 780 pb del gen de selección *nptII*, encontrándose que todas las líneas seleccionadas *in vitro* eran auténticos transformantes. Para caracterizar bioquímica y molecularmente a las plantas transformadas, se determinó por CLAE, el contenido de trehalosa de 20 de las 33 líneas, encontrándose que la mayoría exhibió un contenido mayor al detectado en la línea no transformada. Los eventos más sobresalientes mostraron alrededor de 150 ng.mg⁻¹ de peso fresco, en contraste por 20 ng.mg⁻¹ detectados en la línea no transformada. Para determinar con mayor detalle el color verde más intenso mostrado por las plantas transgénicas, se determinó el contenido de clorofila total en algunas de las líneas transformadas, encontrándose que éstas tenían

más clorofila cuando su contenido de trehalosa era mayor, siendo este menor en la línea no transgénica (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación). En general, hasta aquí, los resultados confirman que la construcción bifuncional es eficiente para sostener la biosíntesis endógena de trehalosa y su acumulación a niveles mucho mayores que en las plantas no transformadas, como había sido demostrado previamente con la misma construcción (Miranda *et al.*, 2007). No se consideró indispensable llevar a cabo análisis southern blot, northern blot y western blot, ya que la determinación de la trehalosa acumulada fue el mejor criterio. Un dato interesante en este trabajo, es el haber corroborado que la mayor acumulación de trehalosa se correlaciona con una mayor acumulación de clorofila y es probable que con una mayor tasa fotosintética (aunque este dato tendría que confirmarse con las líneas transgénicas obtenidas), como previamente había sido reportado mediante estimaciones de la actividad del fotosistema II (Garg *et al.*, 2002). Otros autores han propuesto que el intermediario trehalosa-6-P es importante en la regulación del metabolismo del carbono y la fotosíntesis, ya que su presencia puede reflejar la disponibilidad de hexosas fosfatos, UDPG y sacarosa. Plantas que se crecen *in vitro* en presencia de sacarosa, incrementan los niveles de trehalosa-6-P hasta 27 veces en tres horas (Lunn *et al.*, 2006). También, se ha determinado que plantas transformadas que expresan el gen *otsA* y que acumulan trehalosa-6P, muestran una mayor tasa fotosintética. Al contrario, cuando se expresa sólo *otsB*, la tasa fotosintética es menor. Se propone entonces que este intermediario es un regulador importante de la fotosíntesis en las plantas y

constituye una de las claves para poder manipular este proceso e incrementar la productividad de las plantas (Paul *et al.*, 2001; Paul y Pellny, 2003).

7.4. Las plantas transformadas son tolerantes a sequía.

Un fenotipo de importancia agronómica asociado a la acumulación endógena de la trehalosa, es la tolerancia al estrés abiótico (sequia, salinidad, heladas y altas temperaturas) (Miranda *et al.*, 2007). Se hicieron determinaciones de la tolerancia a sequía de las plantas transformadas de crisantemo, por la relación que guarda el estatus hídrico de las flores cortadas con la vida post cosecha de éstas (Otsubo e Iwaya-Inoue, 2000; Iwaya-Inoue y Takata, 2001; Teixeira da Silva, 2004). En general, se encontró que las plantas transformadas muestran un estatus hídrico más favorable, como se demostró con experimentos de pérdida de humedad en hojas cortadas. Después de 80 minutos, la línea transgénica con mejor comportamiento había perdido sólo un 20 % de humedad, mientras que la línea no transformada había perdido más del 50 % del peso fresco. Los experimentos de sequía y recuperación después del riego también mostraron que la mejor línea transgénica fue capaz de soportar hasta 27 días sin riego, mientras que la planta no transformada no pudo recuperarse después de los 20 días sin riego. Las tres líneas transgénicas probadas mostraron un contenido relativo de agua de alrededor del 65 %, contra 45 % de la no transformada a los 15 días sin irrigación. La mayor tolerancia a la desecación se debió a la acumulación de trehalosa y su efecto osmoprotector, así como tal vez a la activación de algunos genes que permiten a las plantas

adaptarse a la falta de agua (Avonce *et al.*, 2004; Miranda *et al.*, 2007). No se detectaron cambios morfológicos que pudieran explicar esta mayor tolerancia, como podría ser un sistema radical más desarrollado.

7.5. Caracterización de la vida post cosecha de las flores cortadas.

Las plantas se mantuvieron bajo un fotoperíodo no inductivo (interrumpiendo la obscuridad a medianoche por dos horas), por cinco semanas, después de lo cual se pasaron a un fotoperíodo inductivo. Tanto las plantas transgénicas como la no transgénica comenzaron a formar el botón floral a los 61 ó 62 días, es decir no hubo diferencia en esta variable. Se ha reportado que la actividad de TPS1 es necesaria para que ocurra la transición a la floración en *Arabidopsis* (Van Dijken *et al.*, 2004). En plantas de tabaco transformadas con la misma construcción bifuncional, se observó que éstas plantas adelantaban la floración, e incluso podían florecer *in vitro* (Melchor-López, 2007). En maíz, la mutante de TPP (que metaboliza trehalosa-6P) produce el fenotipo *RAMOSA3*, con una inflorescencia femenina ramificada y completamente anormal (Satho-Nagasawa *et al.*, 2006). La morfología de las flores transformadas si se vio afectada, ya que presentó un aspecto diferente, con los pétalos más abiertos (normalmente los pétalos están soldados formando estructuras tubulares), y la flor tuvo un diámetro ligeramente menor con menor volumen y menos compacta (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación).

Las plantas transformadas tuvieron una menor duración en postcosecha que la planta no transformada. Incluso, la línea que tuvo una mayor tolerancia a la desecación, mostró una senescencia mucho más acelerada, pues a los 10 días estaba con el máximo grado de senescencia, mismo que en la línea NT se alcanzó hasta los 30 días (Valle-Sandoval *et al.*, 2008; en preparación).

Aunque no se logró alargar la vida postcosecha de las flores producidas por las plantas transformadas con la construcción *35S::ScTPS1-TPS2::NOS*, los datos obtenidos no dejan de ser interesantes, ya que, se demostró que una mayor tolerancia a la desecación no necesariamente está asociada a una mayor vida postcosecha de las flores.

El retardo o aceleración de la senescencia en las plantas está controlado por diversos factores, jugando un papel importante las citocininas (que retardan la senescencia) y el etileno (que la aceleran). La explicación más pertinente para interpretar los resultados obtenidos, es que la trehalosa (o la trehalosa-6P) está interaccionando a través de vías hasta ahora desconocidas con una u otra hormona o con ambas. Es muy probable que la senescencia acelerada esté siendo causada por el uso un promotor constitutivo y de expresión ectópica *35S(CaMV)*.

Hasta ahora se han generado más de 20 líneas transgénicas con el gen quimérico *Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*, mismas que están bajo evaluación molecular bioquímica y fisiológica. Tenemos la hipótesis de que la mayoría de

los efectos indeseables por la acumulación constitutiva de la trehalosa, se mitiguen o controlen con el uso de este promotor inducible. El promotor *Rd29A* se induce por sequía, ABA y frío (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Dado que las flores de corte se almacenan a bajas temperaturas para su transporte, esto podría tener el efecto de inducir la acumulación de trehalosa en la etapa final de la flor, cuando las alteraciones que pudiera llevar a cabo en la fisiología y la morfología de la planta podrían ser mínimas, con una alta probabilidad que finalmente se pueda observar un efecto positivo sobre la vida post cosecha de las flores debido a la acumulación endógena de trehalosa.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1) Se pudieron regenerar plantas de las variedades 'Indianápolis' y 'Texana' mediante organogénesis directa a partir de segmentos internodales.
- 2) La aplicación transitoria de glucosa en la fase de inducción de brotes pudo duplicar la eficiencia de emisión de brotes en la variedad 'Indianápolis'.
- 3) Se desarrolló un protocolo reproducible de transformación por agroinfección para la variedad Indianápolis.

4) Se pudieron producir líneas transgénicas que acumulan trehalosa con el gen quimérico *35S::ScTPS1-TPS2::NOS* con el siguiente fenotipo:

a) Alteraciones en el desarrollo vegetativo que se atenuaron a medida que las plantas se desarrollaron.

b) Los días para la inducción de la floración no se vieron afectados en las plantas transgénicas, pero si la morfología de la flor, que en general fue de menor volumen y menos compacta.

c) Tolerancia a estrés hídrico notable en comparación con la línea NT.

d) Senescencia más acelerada, atribuible al promotor utilizado.

PERSPECTIVAS

Se espera que con las plantas transgénicas generadas con el gen quimérico con un promotor inducible (*Rd29A::ScTPS1-TPS2::NOS*), se eliminen o atenúen los efectos indeseables observados en las plantas transgénicas obtenidas con el promotor 35S. Estas plantas se encuentran bajo evaluación molecular, bioquímica y fisiológica.

8. LITERATURA CITADA

- Albertorio F, Chapa VA, Chen X, Díaz AJ, Cremer PS. 2007. The α,α -(1-1) linkage of trehalose is key to anhydrobiotic preservation. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 10567-10574.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J.O., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., and Iturriaga, G. 2004. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 136: 3649-3659.
- Bartels, D., and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Cri. Rev. Plant Sci.* 24: 23-58.
- Bajaj, S., J. Targolli, L. Liu, T. David Ho and R. Wu. 1999. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Mol. Breed.* 5: 493-503.
- Baud S, Graham IA. 2006. A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild type and mutant embryos of *Arabidopsis* using in situ histochemistry. *Plant J.* 46: 115-169.
- Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A. 1998. Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* 273: 33311-33319.
- Blázquez MA, Santos E, Flores C-L, Martínez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C. 1998. Isolation and molecular characterisation of the

- Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. Plant J. 13: 685-689.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., and Weretilneck, E. 2000. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, eds. Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R. (American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD); pp: 1158-1249.
- Brumfiel G. 2004. Cell biology: just add water. Nature 428: 14-15.
- Clegg, J.S. 2001. Cryptobiosis a peculiar state of biological organization. Comp. Biochem. Physiol. 128: 613-624.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. and Crowe, L.M. 1992. Anhydrobiosis. Annu. Rev. Physiol. 54: 579-599.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. Annu. Rev. physiol. 60: 73-103.
- Datta, S.K. 2002. Recent developments in transgenics for abiotic stress tolerance in rice. JIRCAS Working Rep.: 43-53.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., and Carroll, D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiol. 13: 17R-27R.
- Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF. 2002. Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. Plant J. 29: 223-235.
- Garg, A.K., J. Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y. S. Choi, L. V. Kochian and R.J. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 15898-15903.

- Goddijn OJM, Verwoerd TC, Voogd E, Krutwagen RWHH, de Graaf PTHM. 1997. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.* 113: 181-190.
- Goddijn, O.J.M. and K. van Dun. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 315-319.
- Gomez LD, Baud S, Gilday A, Li Y, Graham I. 2006. Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J.* 46: 69-84.
- Holmstrom, K. O., E. Mantyla, B. Welin, A. Mandal, E.T. Palva, O.E. Tunnela and J. Londesborough. 1996. Drought tolerance in tobacco. *Nature* 379: 683-684.
- Iwaya,-Inoue., M. and Takata, M. 2001. Trehalose plus Chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers. *Hortscience* 36: 946-950.
- Jang, I.C., Oh, S.J., Seo, J.S., Choi, B.W., Song, S.I., Kim, H.C., Kim, S.Y., Seo, S.H., Choi, D.Y., Nahn, H.B., and Kim, J.K. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.
- Kofranek, A. 1988. Crisantemo de corte. En: *Introducción a la floricultura*. R.A. Larson (ed.) AGT Editor. 3-42.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P. 2005. Trehalose-6-phosphate regulates starch synthesis via post-

- translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 11118-11123.
- Leyman B, van Dijck P, Thevelein JM. 2001. An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. Trends Plant Sci. 6: 510-513.
- Londesborough J, Vuorio OE. 1993. Purification of trehalose synthase from baker's yeast. Its temperature-dependent activation by fructose-6-phosphate and inhibition by phosphate. Eur. J. biochem. 216: 841-848.
- Lunn JE. 2007. Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. Funct. Plant Biol. 34: 550-563.
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon, Y, Morcuende R. 2006. Sugar-induced increases in trehalose-6-phosphate are correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. Biochem J. 397: 139-148.
- Mascorro-Gallardo, J.O., Avonce, N., Iturriaga, G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. Revista Chapingo Serie Horticultura 11: 193-202.
- Matthew, J.P., Pellny, T., Goddijn, O. 2001. Enhancing photosynthesis with sugar signals. Trends in Plant Sci. 6: 197-200.
- Matthew, J.P., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Zhang, Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling. Annu. Rev. Plant Biol. 59: 417-441.
- Meeteren, van U., Gelder van A., and Ieperen van Wim. 2005. Effect of growth conditions on post harvest rehydration ability of cut chrysanthemum flowers. Acta Hort. 669: 287-295.

- Merzendorfer H, Zimoch L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206: 393-412.
- Meyer RC, Steinfath M, Lisec J, Becher M, Wituka-Wall H. 2007. The metabolic signature related to high plant growth rate in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 104: 4759-4764.
- Miranda, J.A., Avonce, N., Suárez, R., Thevelein, J.M., van Dijck, P, Iturriaga, G. 2007. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1411-1421.
- Naleway, J.J. 1992. Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrate. p. 61-76. In: *GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter gen expression*. S.R. Gallagher (ed.). Academic Press Inc. San Diego, California, USA.
- Otsubo, M. and M. Iwaya. 2000. Trehalose Delays Senescence in Cut Gladiolus Spikes. *Hortscience* 35: 1107-1110.
- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluepmann H, Smeekens S. 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E.coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotech J*, 2: 71-82.
- Paul, M.J., Pellny, T.K. 2003. Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54: 539-547.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D. and Zhang, Y. 2007. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-41.

- Pillai V. and Zulkifli L. 2000. Somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium* generated through petal cultures. J. Trop. Agric. Food Sci. 28: 115-120.
- Pilon-Smits, E.A.H., N. Terry, T. Sears, H. Kim, A. Zayed, S. Hwang, K. van Dun, E. Voogd, T.C. Verwoerd, R.W.H., H. Krutwagen and O.J.M. Goddijn. 1998. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. J. Plant Physiol. 152: 525-532.
- Prasad, R.N., A.K. Sharma, H.C. Chaturvedi. 1983. Clonal multiplication of *Chrysanthemum morifolium* "Otome zakura" in long term culture. Bangladesh J. Bot. 12: 96-102.
- Ramakumar S, Tunnacliffe A. 2006. Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. FEMS Yeast Res. 6: 902-913.
- Reid, M.S. and L. Dogde. 2003. Crisantemo: Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha. [En línea]: www.rics.ucdavis.edu/postharvest2/ProduceFacts/Espanol/Crisantemo.html
- Rout, G.R. and P. Das. 1997. Recent trends in the biotechnology of chrysanthemum: a critical review. Sci.Hortic. 81: 201-228.
- Rout, G.R., A. Mohapatra, S. Mojan. 2006. Tissue culture pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotech. Adv. 24: 531-560.

- Satho-Nagasawa, N., Nagasawa N., Malcomber, S., Sakai, H., and Jackson, D. 2006. A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature* 441: 227-230.
- Schiraldi C, Lernia ID, Rosa MD. 2002. Trehalose production: exploiting novel approaches. *Trends Biotechnol.* 20:420-425.
- Schluepmann, H., T. Pellny, A. van Dijken, S. Smeekeens and M. Paul. 2003. Trehalose-6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11: 6849-6854.
- Teixeira, S.J.A. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotech. Adv.* 21: 715-766.
- Teixeira, S.J.A. 2004. Ornamental cut flowers: postharvest technology and physiology. *Prop. Ornam. Plants* 4: 19-41
- Teixeira, S.J.A. 2004. Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 79: 1-18.
- Van Dijken, A.J.H., Schluepmann, H., Smeekeens, S.C.M. 2004. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol.* 135: 969-977.
- Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A. 1998. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast *tps2* mutant. *Plant J.* 13: 673-683.

- Wills, R., B. McGlasson, D. Graham, D. Joyce. 1998. Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales. 2ª. Edi. Editorial Acribia. Zaragoza, España: 238 pp.
- Wolkers WF, Looper SA, Fontanilla RA, Tsvetkova NM, Tablin F, Crowe JH. 2003. Temperature dependence of fluid phase endocytosis coincides with membrane properties of pig platelets. Biochem. Biophys. Acta 1612: 154-163.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1994. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell 6: 251-264.
- Young, S.S., Chil D.C., Man, J.K., Chun H.L., Jun H.K., Sik J.C. and Geun Y.C. 2003. Plant regeneration from leaf explants and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). Act. Hort. 625: 403-409.