



***In vitro* regeneration and genetic transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* var. micromargara)**

Regeneración *in vitro* y transformación genética del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. micromargara)

Yuritza N. Cruz¹, Francisco Chi-Sánchez¹, Alberto Uc-Vázquez¹, Ana Ramos-Díaz¹ y Julia Cano-Sosa^{1*}.

¹Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC., Unidad Sureste. Parque científico y Tecnológico de Yucatán. Km. 5.5 Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto. Cp. 97302, Mexico. *jcano@ciatej.mx

ABSTRACT

The chrysanthemum stands as one of the main ornamental plants of high commercial demand due to a wide range of flower colors and shapes achieved by genetic breeding. Therefore, it is necessary to establish efficient *in vitro* culture protocols to achieve genetic transformation of ornamental plants successfully.

The objective of this study was to establish an *in vitro* plant regeneration and genetic transformation system of plants in order to change the color of chrysanthemum var. Micromargara petals.

The concentration of 15 g/l was the most suitable for *in vitro* regeneration of plants, obtaining a greater number of leaves and shoot length compared with 0 and 30 g/l sucrose. The plants obtained *in vitro* were acclimatized and induced to flower.

The flavonoid 3'-hydroxylase gene (*f3'h*) amplification by RT-PCR in chrysanthemum flower buds presented a 98% similarity to sequences reported in chrysanthemum. Chrysanthemum plants were inoculated with vector pEuMV-YP: ΔAV1: *f3'h* by biolistics. Plasmid sequencing presented a 99% similarity with *Pepper golden mosaic virus*-Tamaulipas strain.

Keywords: chrysanthemum, *f3'h* gene, genetic transformation, *in vitro* culture.

RESUMEN

El crisantemo se encuentra entre las principales plantas ornamentales de alta demanda comercial debido a una amplia variedad en color y forma de las inflorescencias que se han logrado mediante el mejoramiento genético. Por lo que es necesario establecer protocolos eficientes del cultivo *in vitro* para lograr la transformación genética de plantas ornamentales con éxito. El objetivo del presente estudio fue establecer un sistema de multiplicación *in*

in vitro y transformación genética de plantas para la modificación de la coloración de pétalos del crisantemo var. Micromargara. Se obtuvo que la concentración de 15 g/l de sacarosa fue la más adecuada para la regeneración *in vitro* de las plantas, obteniendo mayor número de hojas y longitud de brotes en comparación con 0 y 30 g/l de sacarosa. Las plantas obtenidas *in vitro* fueron aclimatadas e inducidas a floración. La amplificación del gen flavonoide 3'-hidroxilasa (*f3'h*) en botones florales de crisantemo var. Micromargara mediante RT-PCR presentó un 98 % de similitud con secuencias reportadas en crisantemo. Plantas de crisantemo fueron inoculadas con el vector pEuMV-YP: Δ AV1:*f3'h* mediante biobalística. El plásmido secuenciado presentó un 99% de similitud con *Pepper golden mosaic virus*-Tamaulipas strain.

Palabras clave: crisantemo, cultivo *in vitro*, gen *f3'h*, transformación genética.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* es una herramienta útil para la producción del crisantemo a gran escala y además es fundamental para la generación de nuevos cultivares (Teixeira da Silva *et al.*, 2003) en los sistemas de transformación genética. El crisantemo es considerado el segundo cultivo florícola con mayor importancia económica a nivel mundial, comercializado como planta en maceta y flor de corte debido a su amplio rango de color y forma de la inflorescencia (Teixeira da Silva, 2003). Los programas de mejoramiento se han enfocado en modificar diversas características incluyendo el color de la flor, el tamaño y la forma (Rout *et al.*, 2006). La transformación genética ha sido ampliamente explotada por los investigadores para la producción de plantas genéticamente modificadas y en la mayoría de los programas de fitomejoradores (Jovel & Ramirez, 2002). Se ha demostrado que al silenciar un gen en la ruta de la biosíntesis de los pigmentos puede originar variaciones de coloración en las flores (Noda *et al.*, 2013). Se puede mencionar que el silenciamiento de genes es un sofisticado sistema de defensa mediante el cual las plantas disparan, en respuesta a infecciones localizadas de virus fitopatógenos un mecanismo de degradación de ARN viral (Jovel & Ramirez, 2002). Algunos de los vectores que se han utilizados para el silenciamiento de genes son *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV) (Li *et al.*, 2014), *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Tuttle *et al.*, 2008), *Cotton Leaf crumple virus* (CLCrV) para el silenciamiento en algodón (Tuttle *et al.*, 2012) y el *Bean Pod mottle virus* (BPMV) para el silenciamiento de soya (Pflieger *et al.*, 2014), *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula (EuMV-YP; Villanueva-Alonzo *et al.* 2013). EuMV-YP es un virus en la cual se ha aislado en la Península de Yucatán y a partir de este se origina el vector *pEuMV-YP: Δ AV1:*f3'h** el cual se ha utilizado para silenciar genes en diversas plantas como *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum*, *A. thaliana* (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue establecer un sistema de multiplicación *in vitro* y transformación genética de plantas para la modificación de la coloración de pétalos del crisantemo que expresan el gen *f3'h*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron explantes nodales de 10 mm de longitud, obtenidos de plantas de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* var. Micromargara) establecidas *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación y Mejoramiento Genético del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste.

2.2 Regeneración de plantas

Los explantes nodales fueron sembrados en medio de cultivo, el cual consistía de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 4.4 μ M de BAP, 2.2 g L⁻¹ de gelrite, y 0, 15 o 30 g/l de sacarosa durante 105 días en cuarto de cultivo con una temperatura de 24 $\pm$ 1°C y bajo fotoperiodo de 16/8 horas (luz/oscuridad).

Se realizó un diseño completamente aleatorizado de un solo factor (concentración de sacarosa) con tres niveles (0, 15 y 30 g L⁻¹) y 50 réplicas para cada tratamiento. Las variables morfológicas evaluadas de las plantas fueron: número de hojas, número de brotes, longitud (promedio) de brotes (mm), número de raíces y longitud (promedio) de raíces (mm) por explante. Para el análisis estadístico de los datos registrados se utilizó un ANOVA (una vía) con un 95 % de confianza ($\alpha = 0,05$), empleando el programa estadístico Statgraphic Centurion XVI versión 16.1.11.

Las plantas obtenidas *in vitro* fueron sembradas en sustrato *Sphagnum* (peat moss, Sunshine®) y aclimatadas en condiciones de sombra durante 100 días para ser trasplantadas en macetas e inducir a floración.

2.3 Infección de plantas

Las plantas de crisantemo de 12 cm de altura con presencia de brotes vegetativos, fueron inoculadas con el vector pEuMV-YP: Δ AV1 (testigo negativo) o pEuMV-YP: Δ AV1:*f3'h* (para silenciar *f3'h*) (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Para confirmar la infección se realizó la extracción de ADN a partir de hojas de plantas inoculadas mediante la metodología de DNazol. La calidad del ADN se evaluó mediante espectrofotometría. La detección del vector se realizó por medio de PCR usando los oligos 5'-GACACCAGGACACCAGCAAT-3' y 5'-TTTGGAACATCGCACTGAG-3' con las condiciones de amplificación de: 94°C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, y 72°C por 30 seg; y un ciclo de 72 °C por 10 min (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013).

2.4 Amplificación del gen *f3'h* en botones florales de crisantemo

El silenciamiento fue comprobado por la detección de los transcritos del gen *f3'h* por medio de PCR tiempo real de cDNA obtenido de ARN de botones florales de plantas inoculadas. La detección se realizó usando los oligos: 5'-TGGAGAAAATCTGGCATCACAC-3' y 5'-GGAACCTAGTTGTACCAC CAC-3', bajo las condiciones 95°C durante 3 min,

posteriormente 35 ciclos: 94°C durante 1 min, 58 °C durante 2 min y 72°C durante 30 seg, por ultimo una fase a 72°C por 7 min; utilizando a la actina como gen de referencia.

3. RESULTADOS

3.1 Regeneración de plantas de crisantemo var. Micromargara

La regeneración de plantas de crisantemo var. Micromargara se muestra en la figura 1. El tratamiento de 15 g/l de sacarosa resultó en plantas más vigorosas de crisantemo debido a que generó el mayor número de hojas (58) y longitud de brotes (10.94 mm) (Figura 2). El medio con el tratamiento de 0 g/l de sacarosa produjo resultados significativamente menores a los 105 días del cultivo *in vitro*. La concentración de 15 g/l de sacarosa favoreció más que la de 30 g/l al crecimiento y desarrollo de las hojas y longitud de brotes de los explantes sembrados.

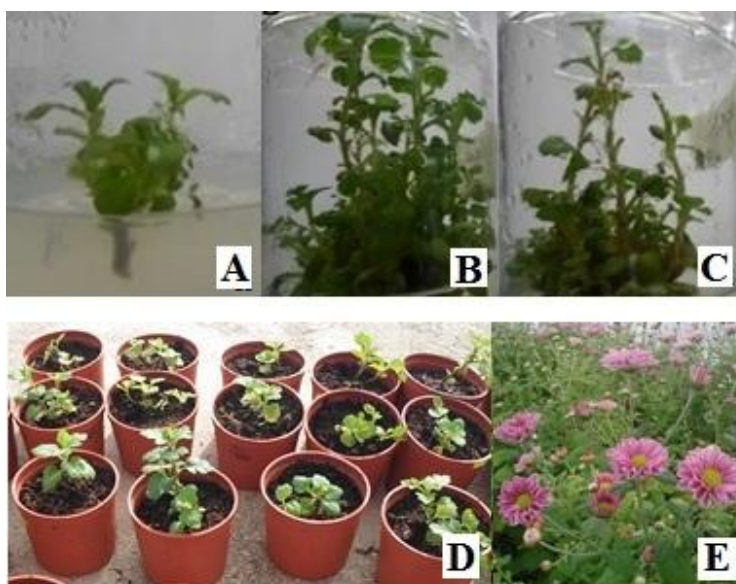


Fig. 1. Regeneración del crisantemo var. Micromargara. Plantas obtenidas *in vitro* con tratamiento (A) 0, (B) 15, y (C) 30 g/l de sacarosa. Trasplante de plantas enraizadas a macetas con peat moss (D) y su floración (E).

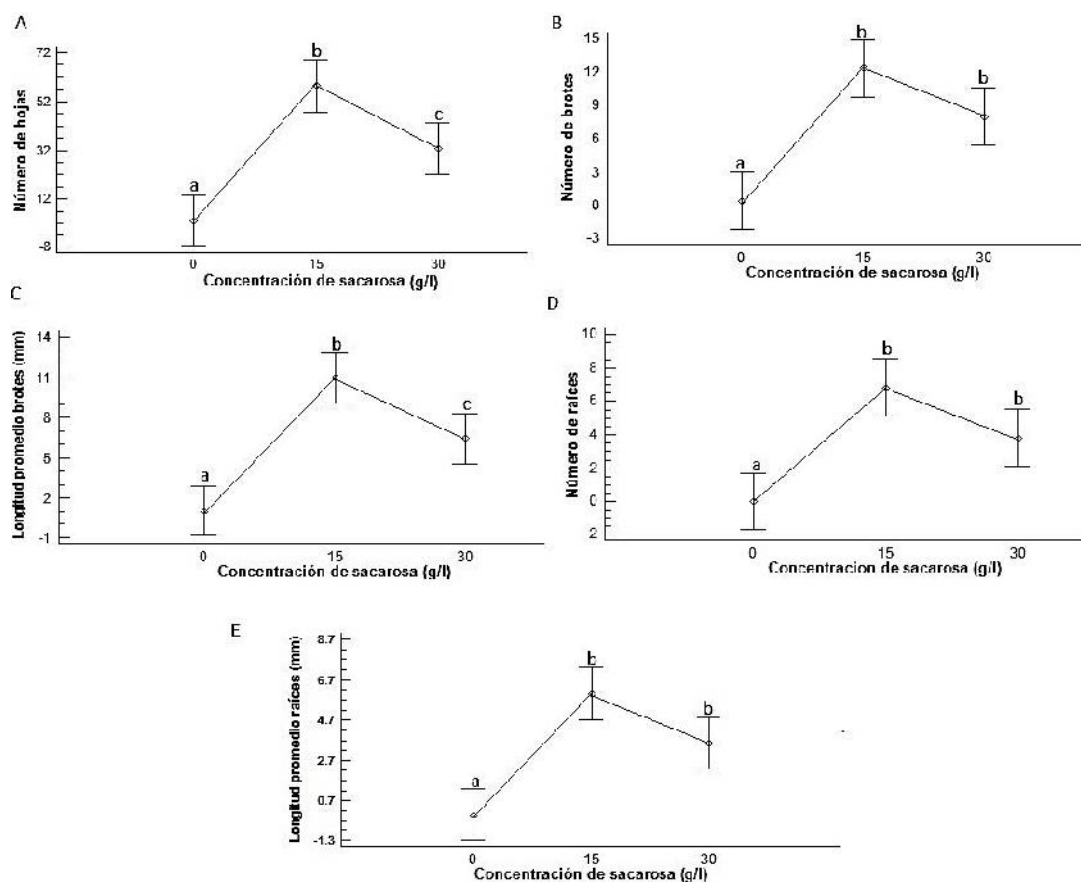


Fig. 2. Gráfica de medias de intervalo LSD para A: número de hojas, B: número de brotes, C: longitud promedio de brotes de crisantemo, D: número de raíces y E: longitud promedio raíces en plantas de crisantemo en tres concentraciones de sacarosa a los 105 días de cultivo *in vitro*. Letras diferentes denotan diferencias significativas de acuerdo con el test de Fisher LSD ($p < 0.05$).

3.2 Amplificación del gen *f3'h* en botones florales de crisantemo

Para detectar el silenciamiento de la expresión del gen *f3'h* fue necesario establecer una metodología de detección por PCR-tiempo real (sección metodología) en donde se evaluó la presencia de transcritos en botones florales de crisantemo, la especificidad de la amplificación se demostró en el análisis de la curva de desnaturalización. En la figura 3, se puede observar que la curva de desnaturalización para la amplificación de *f3'h*, en donde se aprecia un solo pico correspondiente a la secuencia del fragmento deseado.

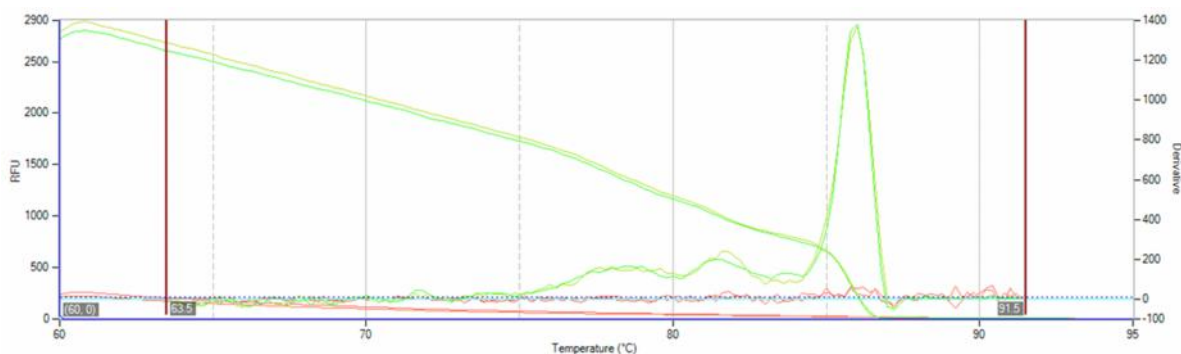


Fig. 3. Análisis de la curva de desnaturalización para la amplificación del fragmento de f3'h, por PCR-tiempo real.

3.3 Confirmación de la infección del vector pEuMV-YP:ΔAV1:f3'h

Para la detección del ADN viral fue necesario la extracción de ADN a partir de hojas bombardeadas y no bombardeadas por el método de DNazol (Figura 2), de las cuales se obtuvo en la mayoría de la extracción de ADN de buena calidad mediante la espectrofotometría a una relación de 1.8 a 2 en una absorbancia de A_{260} nm/ A_{280} nm. Las cuales fueron observadas en un gel de agarosa al 1% teñidas con Bromuro de Etidio (Figura 4).

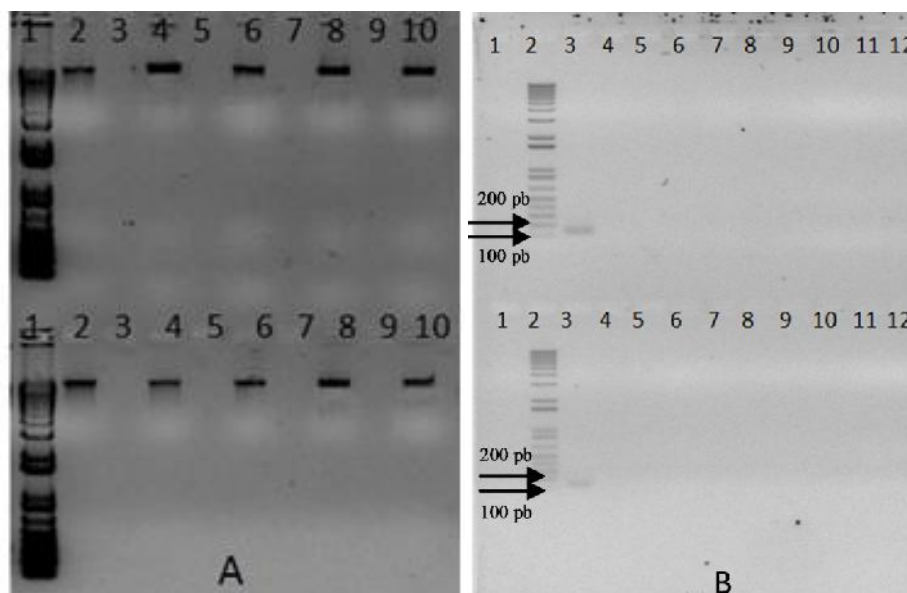


Fig. 4. Gel de agarosa al 1%, parte superior ADN de hojas bombardeadas y la parte inferior ADN de hojas no bombardeadas con 5 repeticiones cada una en plantas de crisantemo con el vector pEuMV-YP:ΔAV1:f3'h (A). Vector de silenciamiento del gen f3'h (pEuMV-YP:ΔAV1-f3'h) (B). En el gel se puede observar las flechas que señala a la banda entre 200 y 100 pb, el cual corresponde al gen del componente B en plásmido como control positivo.

4. DISCUSIONES

En el presente estudio se pudo demostrar que la adición de sacarosa en el medio de cultivo fue esencial para el crecimiento y desarrollo de brotes, hojas y raíces de plantas de crisantemo var. Micromargara obtenidos *in vitro*. La sacarosa presenta una función esencial en la regulación de procesos metabólicos y además existen evidencias que sugieren que este azúcar participa como una molécula señalizadora en los procesos de desarrollo de las plantas (Tognetti *et al.*, 2013). La sacarosa en la concentración de 15 g/l, fue más adecuado que el tratamiento de 30 g/l, para el desarrollo de hojas y longitud de brotes de plantas de crisantemo var. Micromargara. Los resultados obtenidos no coinciden con los alcanzados por Mohamed (2013) quien reportó un mayor número de hojas y longitud de brotes en plántulas de crisantemo cv. Chesapea en medio de cultivo con 3% de sacarosa que la concentración de 1.5 %. Dicha diferencia puede deberse a que se trata de otra variedad de crisantemo. En el trabajo de George *et al.* (2008) mencionan que la concentración de sacarosa para inducir la morfogénesis o el crecimiento de las plantas *in vitro*, varía entre diferentes genotipos incluso entre aquellos cercanamente relacionados.

Estudios filogenéticos F3'H realizados por Seitz *et al.*, (2015) mencionan que se encuentran ampliamente relacionados dentro de tres sub-familia Asteroideae, Cichorioideae y Carduoideae de las Asteraceae, reportando que *Chrysanthemum x morifolium* presenta F3'H (Asteroideae), en este estudio la secuencia obtenida del fragmento amplificado presento un 98 % de similitud con plantas de *Chrysanthemum x morifolium* reportados en la base de datos de la NCBI.

El gen *flavonoide 3'-hidroxilasa* (*f3'h*) se expresa en plantas de crisantemo por lo tanto se acumula Cianidina derivados de antocianinas en sus inflorescencias que aparecen de color rosa/rojo (Brugliera *et al.*, 2013). Sin embargo, la ausencia de la producción y acumulación de antocianinas basadas en delfinidina es debido a la ausencia del gen *flavonoide 3',5'-hidroxilasa* (*f3',5'h*), por lo que es difícil producir el color púrpura, violeta o azul en flores de crisantemo por métodos convencionales de mejoramiento ya que no está presente en las especies del género *Dendranthema* (Noda *et al.*, 2013).

Hernández-Zepeda *et al.*, 2007 reporta que la sintomatología que induce EuMV-YP puede variar en ocho especies de plantas como *Cucurbita maxima* cv. *Big Max* (Cucurbitaceae), *Euphorbia heterophylla* (Euphorbiaceae), *Phaseolus vulgaris* cv. Top Crop (Fabaceae), *Gossypium hirsutum* cv. Delta y *Malva parviflora* (Malvaceae) y *Capsicum annuum* cv. Anaheim, *Datura stramonium* y *Lycopersicon esculentum* cv. Humaya (Solanaceae) que representan a cinco familias de plantas, las cuales fueron inoculadas mediante la técnica de Biobalística con EuMV-YP, plantas como *C. máxima*, *G. hirsutum*, y *M. parviflora* no presentaron la síntomas por EuMV-YP, sin embargo en plantas de *E. heterophylla* y *C. annum* se obtuvo un 100% de plantas con síntomas. En este estudio plantas de crisantemo *Dendranthema grandiflora* var. Micromargara perteneciente a la familia Asteraceae se comprobó que no se presentó sintomatología y aunque si la infección del vector pEuMV-YP:ΔAV1:*f3'h* se verifico mediante pruebas moleculares.

Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013 modificaron a EuMV-YP aislado en la Península de Yucatán, creando un vector con la capacidad de silenciar genes mediante VIGS, el cual es

utilizado para silenciar el gen *NPR1* y Magnesio Quelatasa (*ChlI*) en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Capsicum annum* mediante la inoculación por Biobalística, en este estudio plantas de crisantemo que fueron inoculadas con el vector pEuMV-YP:ΔAV1:ƒ3´h no fue detectado por pruebas moléculas, sin embargo el plásmido secuenciado presento un 99 % de similitud con *Pepper golden mosaic virus*-Tamaulipas strain.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo SEP-CONACyT para el desarrollo del proyecto: Estudios moleculares y bioquímicos para la modificación de la ruta de biosíntesis de las antocianinas en crisantemo (*D. grandiflorum* Tzvelev). Clave: 104606. Al CONACyT por las becas otorgadas No. 371166 y No. No. 301747. Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco por las facilidades para realizar el presente trabajo. Los vectores de silenciamiento, fueron gentilmente donados por el Dr. Hernán Villanueva Alonso del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la UADY, y por el Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Brugliera F., Tao G. Q., Tems U., Kalc G., Mouradova E., Price K. & Mason J. G. 2013. Violet/Blue chrysanthemums-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant and Cell Physiology*, 54(10): 1696–1710.

Hernández-Zepeda C., Idris A. M., Carnevali G., Brown J. K. & Moreno-Valenzuela, O. 2007. Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the Squash leaf curl virus clade. *Plant Pathology*, 56(5): 763–770.

Huang C., Xie Y. & Zhou X. 2009. Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. *Plant Biotechnology Journal*, 7(3): 254–265.

Jovel J. & Ramirez P. 2002. Silenciamiento de genes virales : el contraataque de las plantas frente a infecciones de virus fitopatógenos. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 2, 66(66): 49–61.

George E.F., Hall M.A. and Deklerk G.J. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd Edition on. Springer, 1:1-504.

Li F., Huang C., Li Z. & Zhou X. 2014. Suppression of RNA Silencing by a Plant DNA Virus Satellite Requires a Host Calmodulin-Like Protein to Repress RDR6 Expression. *PLoS Pathogens*, 10(2): 11–14.

Mohamed, M.A.H. 2013. Effect of natural ventilation and sucrose concentration on chrysanthemum micropropagation. *In*: 1 st Assiut International Conference of Horticulture, Assiut, Egypt.

Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.

Noda N., Aida R., Kishimoto S., Ishiguro K., Fukuchi M., Tanaka Y. & Ohmiya A. 2013. Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant and Cell Physiology*. 54(10): 1684-1695.

Pflieger S., Blanchet S., Meziadi C., Richard M., Thareau V., Mary F. & Geffroy V. 2014. The “one-step” Bean pod mottle virus (BPMV)-derived vector is a functional genomics tool for efficient overexpression of heterologous protein, virus-induced gene silencing and genetic mapping of BPMV R-gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology*, 14(1): 232.

Rout G., Mohapatra A. & Mohan S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. 24(6): 531-560.

Seitz C., Ameres S., Schlangen K., Forkmann G. & Halbwirth H. 2015. Multiple evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase. *Planta*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Teixeira da Silva J. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances*. 21(8): 715-766.

Tognetti J. A., Pontis H. G., Martínez-Noël G. M. 2013. Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signal Behav.* 8(3):e23316.

Tuttle J. R., Idris M., Brown J. K., Haigler C. H. & Robertson D. 2008. Geminivirus-mediated gene silencing from Cotton leaf crumple virus is enhanced by low temperature in cotton. *Plant Physiology*, 148(1): 41–50.

Tuttle J., Haigler C. H. & Robertson D. 2012. Method: low-cost delivery of the cotton leaf crumple virus-induced gene silencing system. *Plant Methods*, 8(1): 27.

Villanueva-Alonzo H. J., Us-Cama, R. Y., López-Ochoa L. A., Robertson D., Guerra-Peraza O., Minero-García Y. & Moreno-Valenzuela O. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters*, 35(5): 811–823.