

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

INFORME FINAL DEL PROYECTO N° 111-A3-038

“ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES PARA
LA REGENERACIÓN *IN VITRO* DEL AYOTE (*Cucurbita moschata*)”

Presentado por:

Marta Valdez Melara

Pilar Ramírez Fonseca

Andrés Gatica Arias

Registrado en B.D.

28 FEB. 2008

Por: OK Cruz

1472-07



Diciembre 2007

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO:

1.1 NÚMERO DEL PROYECTO: 111-A3-038

1.2 NOMBRE DEL PROYECTO: “Establecimiento de cultivos celulares para la regeneración *in vitro* del ayote (*Cucurbita moschata*)”.

1.3 UNIDAD RESPONSABLE: Escuela de Biología.

1.4 INVESTIGADORA PRINCIPAL: Dra. Marta F. Valdez Melara

Unidad Académica: Escuela de Biología

Tiempo de dedicación: 2 h semanales

1.5 OTROS INVESTIGADORES

Investigadora Asociada: Dra. Pilar Ramírez Fonseca

Unidad Académica: Escuela de Biología y CIBCM

Tiempo de dedicación: 5 h semanales

Investigador Asociado: M.Sc. Andrés Gatica Arias

Unidad Académica: Escuela de Biología

Tiempo de dedicación: 7 h semanales

1.6. VIGENCIA: del 01 Enero 2003 al 14 Diciembre 2007.

2. GRADO DE AVANCE DEL PROYECTO

2.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar la metodología y los protocolos experimentales para la regeneración de plantas en condiciones de cultivo *in vitro*, a partir de tejidos somáticos en varios genotipos de ayote (*Cucurbita moschata*) de Costa Rica, para la aplicación ulterior de técnicas biotecnológicas de mejoramiento genético.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (AÑOS 2003-2004):

- Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos embriogénicos de varias accesiones de ayote de Costa Rica.
- Desarrollar un sistema que permita la regeneración de plantas fértiles de ayote, a partir de embriones somáticos.
- Evaluar la capacidad morfogénica de varios genotipos (accesiones) costarricenses de ayote, en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (AÑOS 2005-2006):

- Confirmar el éxito de la metodología de embriogénesis somática y la capacidad de regeneración de plantas en genotipos comerciales y del banco de germoplasma del CATIE.
- Evaluar las características agronómicas y la fertilidad de las plantas generadas por embriogénesis somática, que fueron transferidas al campo, al alcanzar la madurez sexual.
- Desarrollar una metodología para la transformación genética de variedades de ayote, utilizando genes marcadores como el gen *bar* y el gen reportero *uidA* (*GUS*) por medio del método de bombardeo con micropartículas (biobalística).

2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (AÑOS 2006-2007):

- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la transformación genética del ayote, que permitan la transferencia ulterior de genes foráneos de interés agronómico a su genoma, tales como genes de origen viral.
- Realizar ensayos de expresión transitoria y estable de los genes reporteros y marcadores de selección en las líneas de callos transformadas.
- Comprobar la presencia del gen *bar*, el cual confiere resistencia al herbicida Basta™, utilizando técnicas moleculares.
- Determinar la tolerancia natural de las plantas no transformadas a distintas concentraciones (0, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 % v/v) del herbicida Basta™.
- Evaluar las características agronómicas y la fertilidad de las plantas transformadas con los genes *bar* y *uidA*.

3. RESUMEN DE LOS AVANCES EN LOS LOGROS DE LOS OBJETIVOS Y LAS ACTIVIDADES

Objetivo programado	Actividad(es) asociada(s) al objetivo	% avance de las actividades	Duración planteada para la actividad	Resultados obtenidos
1. Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos embriogénicos de varias accesiones de ayote de Costa Rica.		100 %	Enero 2003 a junio 2004	Procedimiento para la inducción de callos embriogénicos en ayote.
2. Desarrollar un sistema que permita la regeneración de plantas fértiles de ayote a partir de embriones somáticos.	<p>Obtención de plántulas regeneradas a partir de los callos obtenidos en la primera etapa de la investigación.</p> <p>Traslado de las plantas obtenidas a condiciones de invernadero y campo para evaluación agronómica.</p>	100 %	Junio 2004 a junio 2005.	Procedimiento para la regeneración y aclimatación de <i>vitroplantas</i> .
3. Evaluar la capacidad morfogénica de varios genotipos (accesiones) costarricenses de ayote, en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas.	<p>Evaluación de genotipos comerciales de ayote.</p> <p>Evaluación de genotipos de la zona de Guanacaste (de fincas privadas).</p> <p>Evaluación de genotipos proveídos por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).</p>	100 %	Enero 2004 a marzo 2006	Procedimiento para la inducción de callos embriogénicos en varias accesiones ayote.

<p>4. Desarrollar una metodología para la transformación genética de variedades de ayote, utilizando genes marcadores como el gen <i>bar</i> y el gen reportero <i>GUS</i>, por medio del método de bombardeo con micropartículas (biobalística).</p>	<p>Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la transformación genética del ayote, que permitan la transferencia ulterior de genes foráneos de interés agronómico a su genoma, tales como genes de origen viral.</p>	100 %	<p>Enero 2005 a diciembre 2007</p>	<p>Procedimiento para la transformación genética de callos y segmentos de cotiledón de ayote.</p>
	<p>Realizar ensayos de expresión transitoria y estable de los genes reporteros y marcadores de selección en las líneas de callos transformadas.</p>	100 %		<p>Procedimiento para la identificación de los genes <i>bar</i> y <i>uidA</i>.</p>
	<p>Comprobar la presencia del gen <i>bar</i>, el cual confiere resistencia al herbicida Basta™, utilizando técnicas moleculares.</p>	100%		

4. DESCRIPCIÓN DEL AVANCE DE LAS ACTIVIDADES.

Objetivo 1. Desarrollar los procedimientos experimentales para la inducción de callos embriogénicos de varias accesiones de ayote de Costa Rica. Se cumplió en un 100%.

Enero 2003 a diciembre 2003: Los resultados se presentaron en los informes anteriores.

El mejor medio de cultivo para la inducción de callos a partir de cotiledones de plantas juveniles de ayote fue el MS suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D. El porcentaje de callogénesis con este tratamiento fue de 83.5 % . Es decir de cada 100 explantes sembrados, 83.5 produjeron callos. Consecuentemente, este medio ha sido escogido para la generación de callos que son sometidos a los experimentos de regeneración de plantas.

Segunda etapa: enero – junio 2004: Los resultados se presentaron en los informes anteriores. En esta etapa:

- Se confirmó el éxito de la metodología de cultivo *in vitro* y regeneración de plantas con la evaluación de otros genotipos de ayote que fueron cultivados para el incremento de semilla.
- Se evaluó la capacidad morfogénica de varios genotipos con una nueva serie de tratamientos, que incluyen el uso de la auxina de síntesis 2, 4, 5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) combinado con BAP. Se logró inducir algunos callos, pero sin capacidad morfogénica. Resultados presentados en los informes anteriores.
- Se obtuvieron plántulas regeneradas a partir de los callos obtenidos en la primera etapa de la investigación, que fueron evaluadas en condiciones de campo. Los resultados de esta etapa se presentaron en el segundo informe.

Objetivo 2. Desarrollar un sistema que permita la regeneración de plantas fértiles de ayote. Se cumplió en un 100%.

Junio 2004 a junio 2005: Comprendió las siguientes actividades:

- Obtención de plántulas regeneradas a partir de los callos obtenidos en la primera etapa de la investigación.
- Traslado de las plantas obtenidas en la investigación a condiciones de invernadero y campo para evaluación agronómica.

Las plántulas regeneradas fueron sembradas en el campo, en una finca privada, en San Ramón, crecieron en muy buenas condiciones. Todas fueron fértiles y produjeron frutos y semillas viables.

Objetivo 3. Evaluar la capacidad morfológica de varios genotipos de ayote, en relación con su capacidad para la callogénesis y la regeneración de plantas. Se cumplió en un 100%.

Enero 2004 – Marzo 2006. Los resultados se presentaron en los informes anteriores. Esta etapa comprendió las siguientes actividades:

- Evaluación de genotipos comerciales de ayote.
- Evaluación de genotipos de la zona de Guanacaste (de fincas privadas).
- Evaluación de genotipos proveídos por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

De los 20 genotipos del CATIE examinados, 7 mostraron capacidad de regeneración de plantas y 2 generaron brotes. Estos genotipos, fueron seleccionados por los expertos de CATIE, de manera que fueran muy diferentes entre sí y representativos de la amplia variabilidad genética de la especie, que incluye silvestres y cultivados. Nosotros no conocemos su verdadera identidad, para efecto de tener una mayor objetividad y aleatoriedad en esta investigación.

De manera general, estos resultados confirman el éxito de la metodología de embriogénesis somática, desarrollada en este proyecto de investigación, y la capacidad de regeneración de plantas en genotipos comerciales y del banco de germoplasma del CATIE. Una investigación ulterior de microscopía electrónica para confirmar y optimizar el proceso embriogénico de este procedimiento experimental en esta especie, sería de sumo interés científico y aplicado para la biotecnología del ayote.

Se puede entonces concluir que el procedimiento experimental adecuado para la regeneración *in vitro* de plantas de ayote, válida para un gran número de genotipos, consiste en:

- Inducción de callos embriogénicos a partir de cotiledones, en medio MS suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D durante 16 semanas.
- Los callos se transfirieron luego a medio de maduración de embriones somáticos. Este medio es un MS suplementado con 0.5 mg/L de AIA (ácido indolacético) y de 0.5 mg/L de kinetina, durante 4 semanas o hasta que aparecen los puntos verdes.
- Transferencia de los embriones somáticos maduros a medio de cultivo de regeneración, que consiste en un MS al 50 %, sin reguladores de crecimiento. A las 4 semanas de cultivo se observan las plántulas pequeñas, pero bien diferenciadas, que continuaron su desarrollo hasta que alcanzaron un tamaño de unos 20 cm de altura.
- Las plantas se aclimataron progresivamente a condiciones de invernadero y se transfirieron a macetas con suelo autoclavado, y luego a condiciones de campo para su crecimiento y maduración sexual.

Objetivo 4. Desarrollar una metodología para la transformación genética de variedades de ayote, utilizando genes marcadores como el gen *bar* y el gen reportero *uidA*, por medio del método de bombardeo con micropartículas (biobalística). Se cumplió en un 100%.

Enero 2005 – Diciembre 2007: Comprendió las siguientes actividades:

- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la transformación genética del ayote, que permitan la transferencia ulterior de genes foráneos de interés agronómico a su genoma, tales como genes de origen viral.
- Realizar ensayos de expresión transitoria y estable de los genes reporteros y marcadores de selección en las líneas de callos transformadas.
- Comprobar la presencia del gen *bar*, el cual confiere resistencia al herbicida Basta TM, utilizando técnicas moleculares.

Metodología

Para esta investigación se utilizó el método de bombardeo de micropartículas o biobalística, mediante el uso del acelerador de partículas (“pistola de genes”) de baja presión, conocida como “Particle Inflow Gun” (PIG) y la pistola de genes PDS-1000 He de Bio-Rad.

Inducción de brotación y efecto del ultrasonido en cotiledones de *C. moschata*

Se siguió la metodología establecida por Anantha-krishnan *et al.* (2003) para cotiledones de calabaza. Se colocaron las semillas de ayote de la variedad “Sello de Oro” a germinar en placas Petri con medio de germinación (sales minerales MS reducidas a la mitad, vitaminas del MS, 30 gl⁻¹ de sacarosa, y 3 gl⁻¹ de Gelrite) durante 9 días. Los explantes utilizados fueron segmentos de cotiledones, de alrededor de un centímetro de longitud y con aproximadamente 1 mm de hipocótilo. Se llevaron a cabo tres tratamientos:

1. US-BAP: Se extrajeron los cotiledones y se les trató con ultrasonido por dos minutos en vial (25mmx80mm) con agua destilada estéril. Seguidamente se colocaron 5 explantes en placas Petri con medio de inducción a organogénesis (sales minerales MS reducidas a la mitad, vitaminas del MS, 30 gl⁻¹ de sacarosa, 3 gl⁻¹ de Gelrite y 1 mg⁻¹ de BAP).
2. BAP: Los explantes de cotiledón se colocaron directamente en el medio de inducción a organogénesis.
3. Control: Los explantes de cotiledón se colocaron directamente en medio de germinación.

Los brotes obtenidos en cada tratamiento se subcultivaron en frascos Gerber con medio de elongación de brotes (sales minerales MS reducidas a la mitad, vitaminas del MS, 30 gl⁻¹ de sacarosa, 3 gl⁻¹ de Gelrite, 1 mg⁻¹ de AG₃ y 0.1 mg⁻¹ de BAP).

Vector de transformación

Se utilizó el plásmido pDM803 y el plásmido pCAMBIA 1301-BAR. Ambos plásmidos poseen el gen marcador *bar* y el gen reportero *uidA* (GUS). En el plásmido pDM803 el gen *bar* esta bajo el control del promotor de la Ubiquitina I del maíz (Christensen *et al.* 1992) y de la secuencia de terminación *nos* (Bevan *et al.* 1983). Por otro lado, en el plásmido pCAMBIA 1301-BAR, los genes *bar* y *uidA* están bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor.

El gen *bar* codifica para la enzima fosfinotricina acetil-transferasa (PAT) (Thomson *et al.* 1987). El gen *bar* contrarresta el efecto inhibitor de la fosfinotricina (PPT) sobre la glutamina sintetasa en las células vegetales, previniendo la acumulación de amoníaco y por ende la muerte celular. Así, la expresión de ese gen foráneo, permite la selección las células vegetales en un medio que contiene PPT (Spencer *et al.* 1990). Para efectos de selección visual del material transformado se utilizará el gen reportero *uidA* (GUS) que codifica para la enzima β -glucuronidasa (Jefferson *et al.* 1987). Esa enzima es una exohidrolasa que cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de β -glucurónidos. El gen *uidA* (GUS) es de gran utilidad para estudios de expresión de los genes foráneos. Su expresión en los tejidos puede ser fácilmente detectada mediante un ensayo histoquímico, en el cual se coloca una muestra de tejido en un sustrato adecuado (solución reveladora X-gluc). La enzima degrada el sustrato y como resultado se genera una coloración azul en los tejidos transformados que contienen el gen (Gallagher 1992, Vasil y Thorpe 1994). Estos genes servirán para la identificación y selección ulterior del material transgénico.

Preparación de microproyectiles

La preparación de las partículas de oro recubiertas con el ADN se realizó como lo describe Valdez *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Para ello, se mezclaron los componentes en el siguiente orden: 50 μ L de la solución de las partículas de oro (sonicadas previamente), 5 μ L de ADN, 50 μ L de CaCl_2 (2.5 M), y 20 μ L de espermidina (0.1 M). Luego la mezcla se sonicó brevemente, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 segundos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado ("pellet") se resuspendió en 250 μ L de etanol al 100%. Después de otra breve sonicación, se centrifugó por segunda ocasión, se procedió a eliminar el sobrenadante y a resuspender el precipitado en 65 μ L de etanol al 100%, seguido de una última sonicación.

Curva de calibración al PPT

Los cotiledones y callos embriogénicos se cultivaron en el medio MS de callogénesis (MS + 3% sacarosa +0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.3% Gelrite, pH 5.6) complementado con distintas concentraciones de PPT (0, 1, 2, 3, 4, y 10 mg l^{-1}). Con el objetivo de determinar la tolerancia natural del PPT en tejidos no transformados, se realizó una serie de experimentos control (negativo) con las mismas concentraciones de PPT, empleadas en los experimentos con el material bombardeado.

Preparación del material vegetal antes y después del bombardeo

El material vegetal (segmentos de cotiledón y callos embriogénicos) se cultivaron en el medio osmótico (MS + 3% sacarosa + manitol 0.4 M + 0.3% Gelrite, pH 5.6) 4 horas antes y 16 horas después del bombardeo, esto con el objetivo de mejorar la eficiencia de regeneración de los callos sometidos al bombardeo. Con el fin de determinar las mejores condiciones físicas para la transformación, al utilizar la pistola PIG se evaluaron cuatro distancias desde el portador de los microproyectiles hasta el tejido vegetal (9, 12, 15 y 18 cm) y dos presiones del gas Helio (100 y 200 psi). Por otro lado, con la pistola de genes PDS-1000 He se evaluaron dos distancias desde el portador de los microproyectiles hasta el tejido vegetal (6 y 12 cm) y tres presiones del gas Helio (1100, 1350 y 1550 psi).

Después del bombardeo, el material vegetal se subcultivó en medio de callogénesis (MS + 3% sacarosa + 0.5 mg⁻¹ 2,4-D + 0.3% Gelrite, pH 5.6) sin agente selectivo durante un periodo de una a dos semanas, con el fin de permitir la recuperación celular. Luego, el material vegetal bombardeado se cultivó en el medio de selección (MS + 3% sacarosa + 0.5 mg⁻¹ 2,4-D + 2 mg⁻¹ PPT + 0.3% Gelrite, pH 5.6)

Luego de dos a tres meses de selección del material vegetal bombardeado, se ha evaluado la eficiencia de los diversos tratamientos con PPT. De esta manera se trata de identificar las líneas celulares resistentes (no necrosadas) y por ende, supuestamente transformadas.

Posteriormente, el material supuestamente resistente se colocó en medio de regeneración suplementado con la concentración de PPT que resulte ser más eficiente durante la selección del material vegetal transformado. Las plantas regeneradas supuestamente transformadas de manera estable serán rociadas en los próximos meses con varias concentraciones (0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 % (v/v) del herbicida Basta TM, para identificar las líneas resistentes. Con el objetivo de determinar la tolerancia natural al Basta TM, de las plantas no transformadas se realizó una serie de experimentos control (negativo).

Análisis de la expresión transitoria del gen GUS

Luego de 48 horas después del bombardeo se tomó una muestra de tejido y se colocó en contacto con un sustrato que contiene la solución reveladora X-GLUC (5-bromo-4-cloro-3-indoliyl-D-glucoronido). Las muestras se incubaron por varias horas a una temperatura de 37°C en la oscuridad. Si el gen se insertó en la célula, se sintetizará la enzima β-glucuronidasa, que degradará al sustrato de revelación X-gluc en los productos ácido glucurónico y CICR-indico. El CICR-indico es un precipitado azul insoluble, que produce una coloración azulada en las regiones del tejido donde se expresa el gen *uidA* (GUS) y ésta se observa en forma de puntos, conocidos como *foci*. El número de puntos azules se cuantificó con ayuda de un estereoscopio. Cuando se visualiza una coloración azul homogénea e intensa en todo el tejido del material vegetal bombardeado, se puede considerar que se dio una integración estable del gen GUS. Su expresión estable será examinada durante todo el proceso de callogénesis y de regeneración del material aparentemente transformado.

Confirmación de la integración nuclear de los transgenes por PCR

Se seleccionó las plántulas de ayote que presenten reacciones GUS positivas y que resistan a las aplicaciones del herbicida Basta™ y se realizó una extracción genómica de ADN, utilizando el protocolo descrito por Dellaporta (ver Anexo 1). Posteriormente, se comprobó la integración del gen *bar* en el genoma del ayote mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el iniciador para amplificar el gen *bar* 5'GTCTGCACCATGGTCAACC-3' y 5'GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'.

Para lo anterior, en un volumen de reacción de 50 µl, se añadió 1 µl de ADN (50-100 ng/ µl), 1.5 µl dNTPs (10mM), 5 µl de buffer de PCR10X, 1.5 µl de cada uno de los iniciadores (10 µM), 0.5 µl Taq ADN polimerasa y 39 µl de agua estéril ultrapura. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación en un termociclador PTC 100 (MJ Research, Inc.): desnaturalización inicial de 4 minutos a 94° C, 30 ciclos de desnaturalización de 1 min. a 94° C, hibridación de 30 segundos a 56° C, extensión de 1 minuto a 72° C y extensión final de 5 minutos a 72° C. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% en TBE 1X. Asimismo, se incluyeron controles negativos (plantas de ayote no transformadas).

Análisis estadístico

Se utilizaró elementos de la estadística descriptiva: porcentajes, promedios, desviación estándar, análisis de varianza, para evaluar la eficiencia de la transformación de los callos embriogénicos (número de *foci* observados) y por evaluación visual durante la callogénesis, de la resistencia del material vegetal al agente selectivo incorporado en el medio. De la misma manera, se evaluó la eficiencia de regeneración del material transformado.

Resultados

Inducción de brotación y efecto del ultrasonido en cotiledones de *C. moschata*

Se observó la formación de brotes en los tratamientos evaluados a la primera semana de cultivo (Figura 1). En la mayoría de los casos se observó la formación de brotes pequeños sin que se pudiera distinguir el desarrollo de hojas (Figura 1A). A partir de la segunda semana de cultivo, se evidenció la aparición de hojas y la diferenciación de brotes múltiples (Figura 1A y B). Los explantes que poseían brotes con más de una hoja (Figura 1D) se transfirieron al medio de elongación.

Al cultivar los explantes de cotiledón directamente en un medio MS con 1 mg l⁻¹ de BAP se presentó la mayor producción de brotes por explante (Figura 2). Además, se obtuvo el mayor porcentaje de explantes que reaccionaron produciendo brotes, en cualquiera de las semanas después de iniciado el cultivo (Cuadro 1).

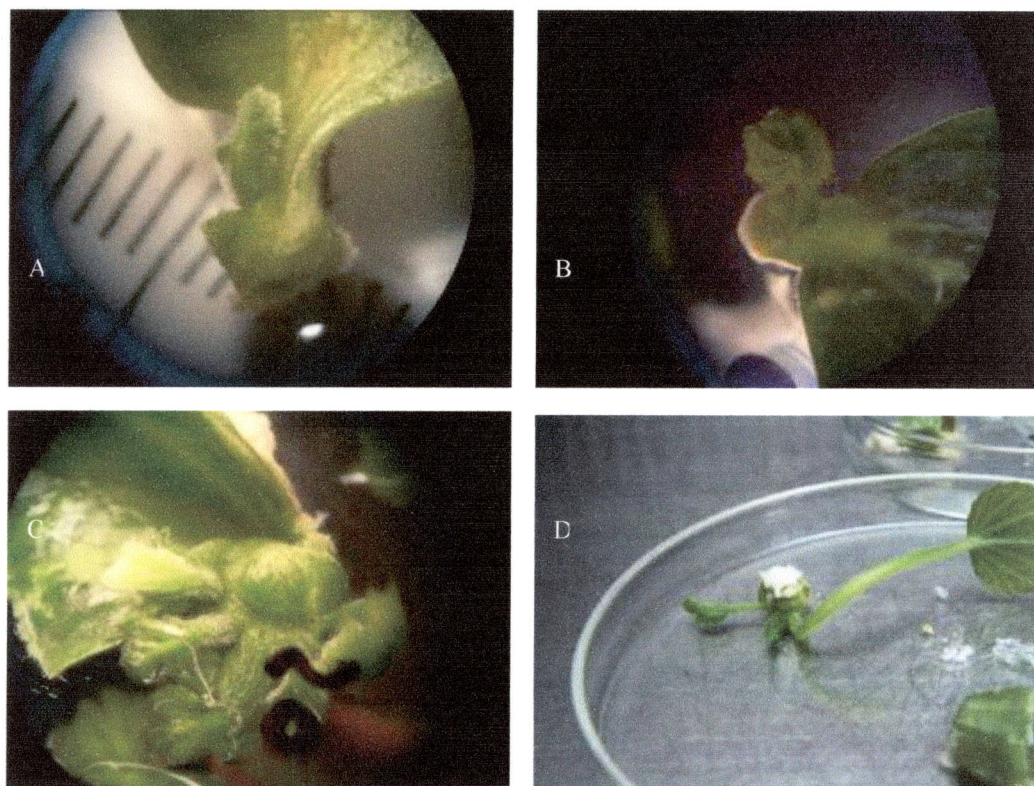


Figura 1. Formación de brotes en cotiledones de *C. moschata*. **A** y **B**. Inducción de brotes en la primera semana en medio de organogénesis. **C**. Múltiples brotes de un solo explante. **D**. Brote listo para subcultivar en medio de desarrollo.

La aplicación de dos minutos de ultrasonido antes de transferir los explantes a un recipiente con medio de inducción de organogénesis, afectó considerablemente el número de explantes que produjeron brotes y la utilización de este pretratamiento registró el porcentaje de formación de brotes más bajo durante las primeras cuatro semanas de cultivo. Independientemente del tratamiento empleado, el mayor porcentaje de explantes con brotes se obtuvo entre la segunda y tercera semana de cultivo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto del tratamiento de ultrasonido en el porcentaje de explantes con brotes durante las 5 semanas de cultivo.

Tratamiento	Semanas después de iniciado el cultivo				
	1	2	3	4	5
US-BAP	11,1	64,4	68,9	55,6	53,3
BAP	95,6	97,8	97,8	73,3	48,9
Control	82,9	91,4	91,4	85,7	37,1

En el cuadro 2, se muestra la producción de hojas por brote durante cinco semanas de cultivo. Los resultados muestran un efecto negativo de la aplicación de ultrasonido en el número de hojas por brote, con un promedio máximo de 3.7 a las cinco semanas. Los mayores valores se observaron en el control y el tratamiento 1 con una media de 5 y 6.8 hojas por brote. Los valores más altos para el número de hojas por brote se obtuvieron para el tratamiento 2, con 16 y 17 hojas por brote en la cuarta y quinta semana de cultivo, por otro lado, los valores más bajos se obtuvieron en los controles.

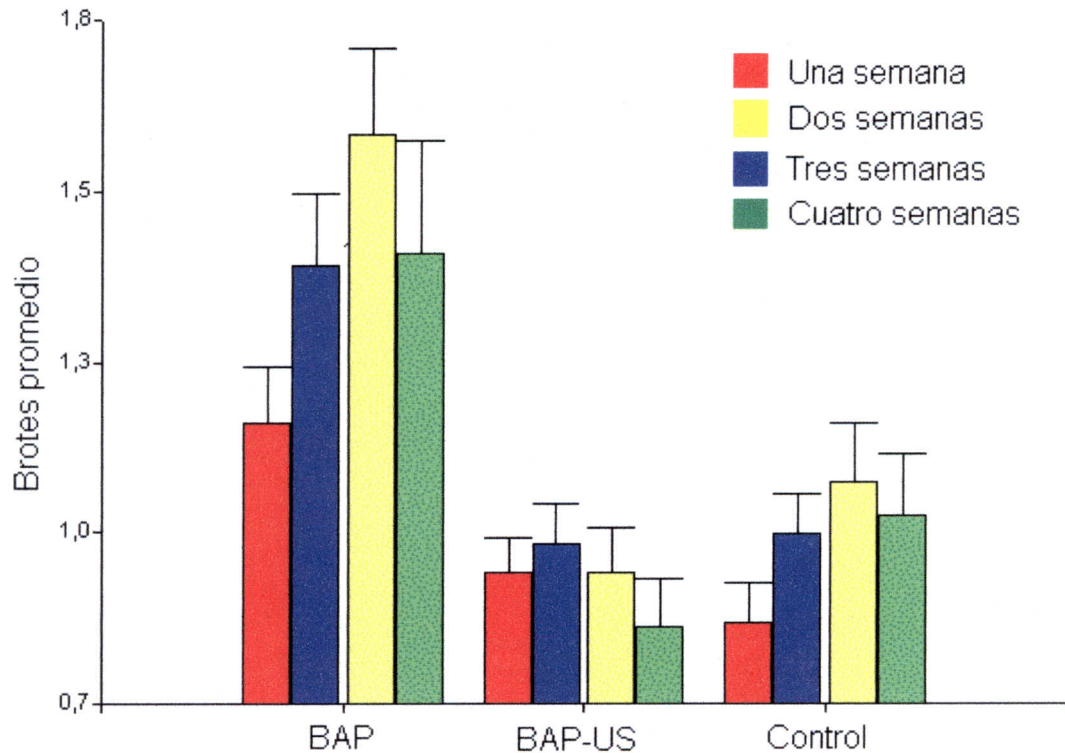


Figura 2. Número promedio de brotes obtenidos a partir de los cotiledones de *C. moschata* en medio de inducción a organogénesis durante la primeras cuatro semanas desde el inicio del cultivo. Las barras de error corresponden al error estándar.

En conclusión, en el tratamiento 2 (sin aplicación de un pretratamiento con ultrasonido) se obtuvieron los mejores resultados en la inducción de organogénesis (mayor frecuencia de obtención de brotes múltiples, mayor porcentaje de explantes produciendo brotes y mayor número de hojas por brote).

Cuadro 2. Promedio de hojas por brote a lo largo de cinco semanas en cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	Variable	n	Promedio de hojas por brote	Desviación estándar	Mínimo de hojas por brote	Máximo de hojas por brote
US-BAP	Semana 1	5	1	0,71	0	2
US-BAP	Semana 2	29	1,76	2,01	0	11
US-BAP	Semana 3	31	2,16	2,47	0	13
US-BAP	Semana 4	25	2,98	2,31	1	10
US-BAP	Semana 5	24	3,67	3,35	0	14
BAP	Semana 1	43	0,02	0,15	0	1
BAP	Semana 2	44	2,06	1,42	0	6
BAP	Semana 3	44	3,78	2,66	0	13
BAP	Semana 4	33	4,98	3,35	0	16
BAP	Semana 5	22	6,8	4,16	1	17
Control	Semana 1	29	0,31	0,47	0	1
Control	Semana 2	32	1,08	1,02	0	3
Control	Semana 3	32	1,81	1,66	0	7
Control	Semana 4	30	2,71	2,34	0	10
Control	Semana 5	13	5,03	3,63	0	12

Efecto del herbicida Glufosinato de amonio (fosfinotricina- PPT) sobre explantes no bombardeados

Se evaluó el efecto de la adición del PPT sobre el crecimiento e inducción de callo embriogénico en cotiledones de ayote. Para ello se utilizaron cinco concentraciones de PPT: 0, 1, 2, 3, 4 10 mg^l⁻¹ en medio de cultivo para la inducción de calogénesis. Los cotiledones fueron más sensibles a la presencia de PPT en el medio de selección. En este caso, en los cotiledones se inhibió el desarrollo de callos en todos los tratamientos. Esto se evidencia en el reducido o nulo crecimiento de tejidos en los bordes del explante y en un aumento de la coloración café, indicadora de una necrosis en todo el fragmento del cotiledón. Los controles por su parte, presentaron crecimiento en los bordes y mantuvieron su coloración normal. Consecuentemente, se ha escogido la concentración de 2 mg^l⁻¹ de PPT en el medio de selección, para los experimentos subsecuentes de transformación genética del ayote (Figura 3 y 4).

A diferencia de los cotiledones, los callos embriogénicos control resultaron ser muy resistentes al PPT con las concentraciones de PPT utilizadas (4, 6, 8 y 10 mg^l⁻¹). No se observaron diferencias evidentes entre los callos embriogénicos en las distintas concentraciones y el control después de un mes de selección, ya que estos continuaron con el crecimiento normal y mantuvieron su coloración crema claro, es decir, no fueron afectados por el PPT.

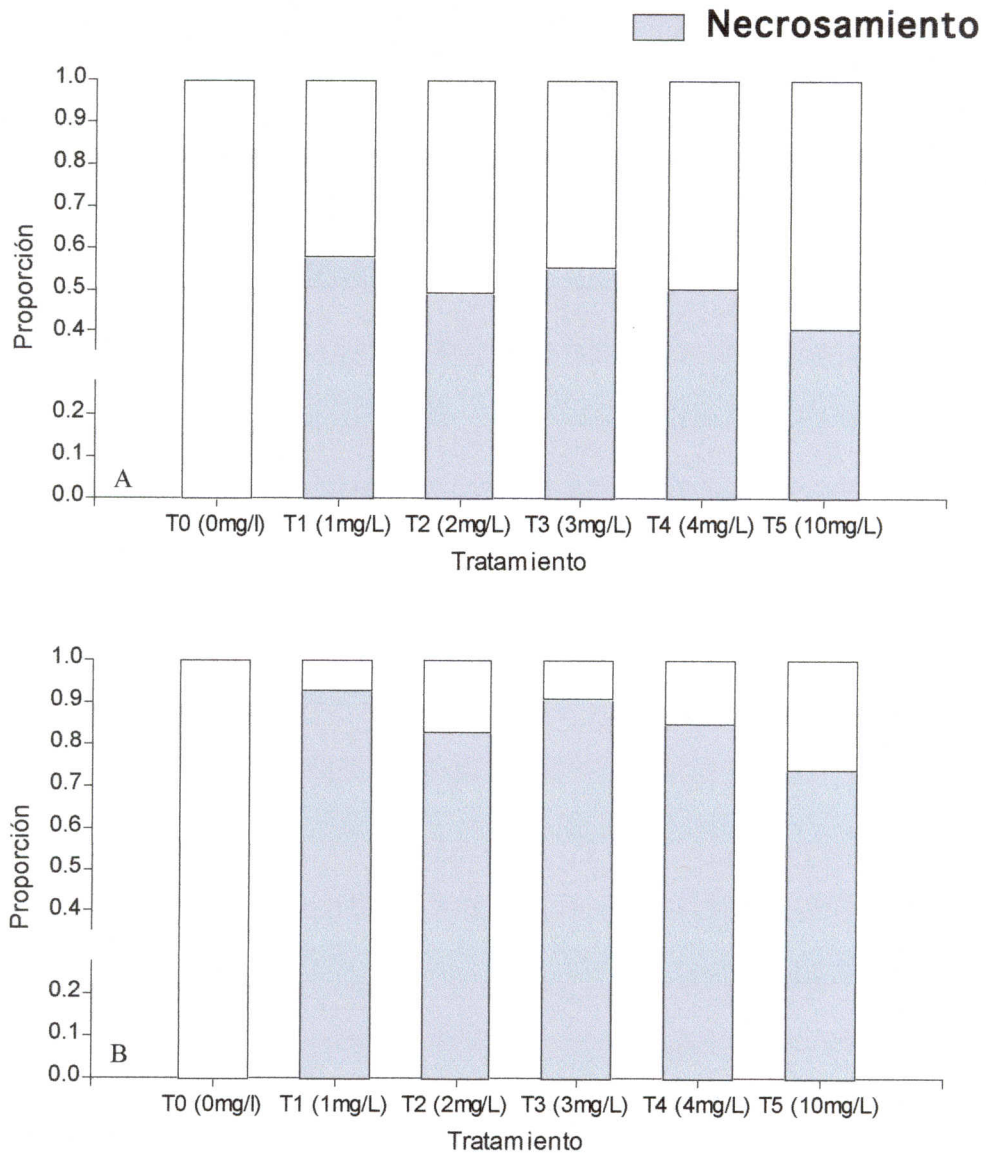


Figura 3. Proporción de necrosamiento de los cotiledones de ayote después de 15 días (A) y 22 días (B) de cultivo en los tratamientos con PPT.

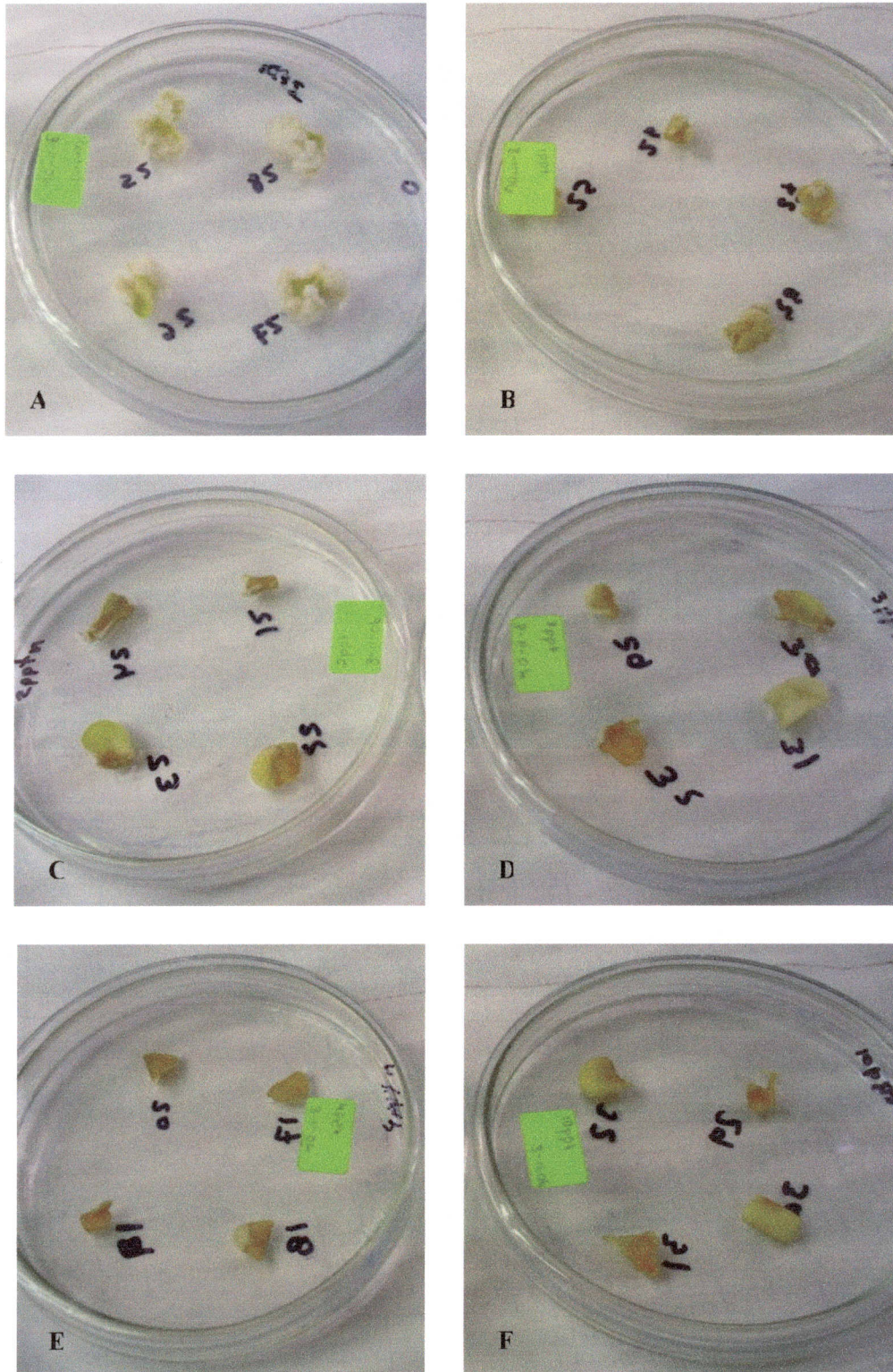


Figura 4. Efecto de las diferentes concentraciones de PPT en el crecimiento e inducción de callos embriogénicos en cotiledones después de 15 días de cultivo en (A) 0 mg l^{-1} (B) 1 mg l^{-1} (C) 2 mg l^{-1} (D) 3 mg l^{-1} (E) 4 mg l^{-1} (F) 10 mg l^{-1} PPT.

Selección de la altura y presión de bombardeo

Con la pistola de genes PIG, los resultados de la expresión transitoria del gen *uidA* muestran que la altura de bombardeo tiene un mayor efecto que la presión de disparo sobre la cantidad de puntos azules observados. Se determinó que la mejor altura de bombardeo se encuentra entre los 12 y 15 cm independientemente de la presión suministrada (100, 150, o 200 PSI) (Figura 5). Cuando se aumenta la distancia entre los proyectiles de ADN y el tejido blanco a 18 cm se observa una reducción importante, principalmente a presiones de 100 y 200 PSI. A menores distancias se da una pérdida de material debida a que los explantes son expulsados fuera de la placa Petri en la que se encuentran, debido al excesivo impacto de los microproyectiles y de la presión de gas Helio, y con esto se aumenta la probabilidad de contaminación de los tejidos.

Además, se incrementó a 200 PSI la presión utilizada para los bombardeos con esta pistola, con la cual se obtuvo un mayor número de puntos en los explantes con respecto a la presión de 100 PSI. (Figura 6A y 6C).

Con la pistola PDS-1000/HeTM, se ensayaron tres presiones diferentes de bombardeo para determinar la adecuada según el tejido blanco: 1100, 1350 y 1550 psi. La presión de 1100 psi fue la mejor cuando se bombardeaban explantes de cotiledón con promedios de 83.3 y 62 puntos por fragmento en la prueba de revelación GUS (Figura 6B). Se utilizó solo 6 cm de altura desde el tejido blanco hasta el cargador. En el caso de callos embriogénicos, la mejor presión de bombardeo fue 1550 psi con la altura de 12 cm, pues se logró observar expresión GUS en 3 de los 10 platos Petri con callos bombardeados (48, 33 y 20 foci respectivamente) (Figura 6D) (Cuadro 3). Por el contrario, al utilizar 1100 psi y 6 cm, solamente se observó expresión transitoria del gen GUS en uno de los diez platos Petri con callos embriogénicos bombardeados (Cuadro 3).

Expresión transitoria del gen GUS

Cuando se utilizó la pistola PDS-1000/He el 100% de los fragmentos empleados en la prueba de revelación GUS dieron positivo. El máximo de puntos observados en una sola de las muestras fue alrededor de 250 puntos azules y el valor mínimo fue de 2 puntos visibles con el estereoscopio. Por otro lado, al utilizar la PIG como pistola de genes el porcentaje de positivos estuvo entre 5 y 40% en los ensayos realizados, con un máximo de alrededor de 250 puntos observados y un mínimo de 0. Asimismo, el mayor promedio de foci por fragmento de cotiledón y callo embriogénico bombardeado se obtuvo al utilizar la pistola PDS-1000/He (Cuadro 3).

Independientemente de la pistola de genes utilizada, las mejores visualizaciones (número de *foci* azules) se obtuvieron con los fragmentos de cotiledones. Sin embargo, su expresión no ha sido semejante en todos los ensayos realizados. El conteo de los *foci*, da un rango que varía entre 0 y más de 250 puntos por muestra, con un promedio que va desde 6.3 a 83.3 puntos por muestra (Cuadro 3). Cuando se utilizaron callos embriogénicos, hubo muy poca expresión GUS. En un experimento se observaron sólo 20 *foci* y en los otros experimentos, se observó 200 puntos azules por muestra. En la figura 7, se muestran secciones de los cotiledones de ayote que evidencian el rango de puntos azules (*foci*) observados después de la prueba de revelación GUS.

Cuadro 3 Resumen de los últimos cuatro bombardeos

Código del bombardeo	Pistola de genes	Altura utilizada (cm)	Presión (PSI)	Tipo de Explante	Número de Explantes bombardeados	Promedio de foci	Máximo de foci	Mínimo de foci	Selección
XVIII	PDS-1000	6	1350	Callo	5	0	-	-	En evaluación
		6	1100	Callo	5	40 *	200	0	
		6	1350	Cotiledón	40	32.2	72	2	
		6	1100	Cotiledón	40	83.3	250	2	
XIX	PIG	15	200	Callo	10	3.3 *	33	0	
		15	200	Cotiledón	80	38.1	250	0	
XX	PIG	15	200	Cotiledón	80	6.3	24	0	
XXI	PDS-1000	12	1550	Callo	10	10.1 **	48	20	
		6	1100	Cotiledón	80	62	250	6	

* Solo un callo dio positivo en la prueba de GUS

** Tres callos dieron positivo a la prueba de GUS0

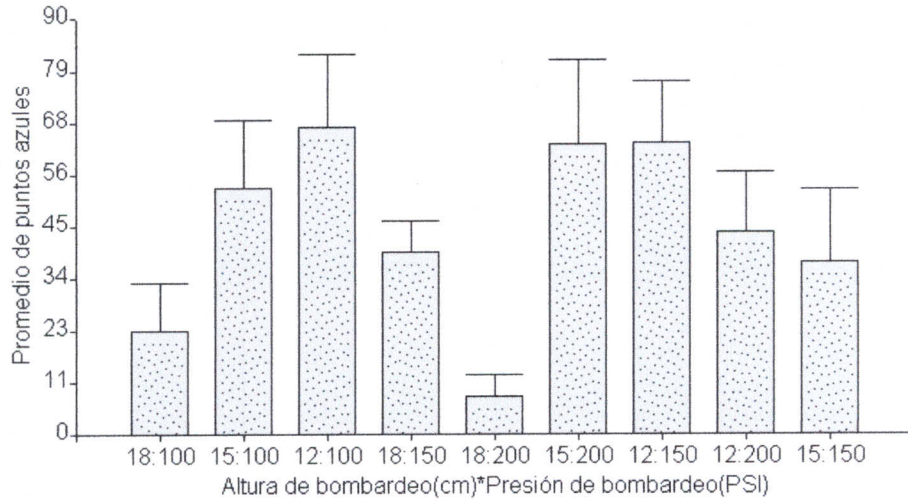


Figura 5. Efecto de la distancia entre el cargador y el tejido blanco, en el número de puntos azules observado en cotiledones bombardeados con la FIG. Las barras corresponden al error estándar de la media.

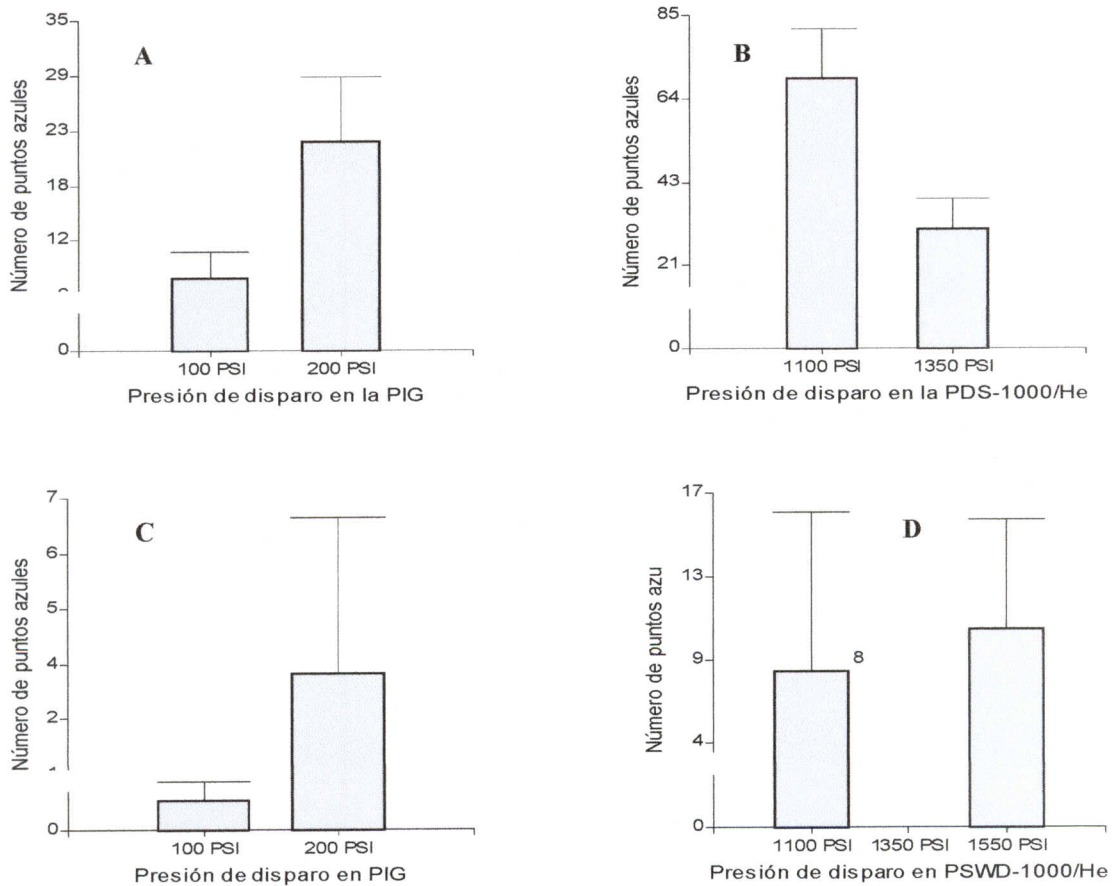


Figura 6. Efecto de la presión de disparo en el número de puntos azules observado en cotiledones (A-B) y en callos embriogénicos (C-D). Las barras de error corresponden al error estándar.

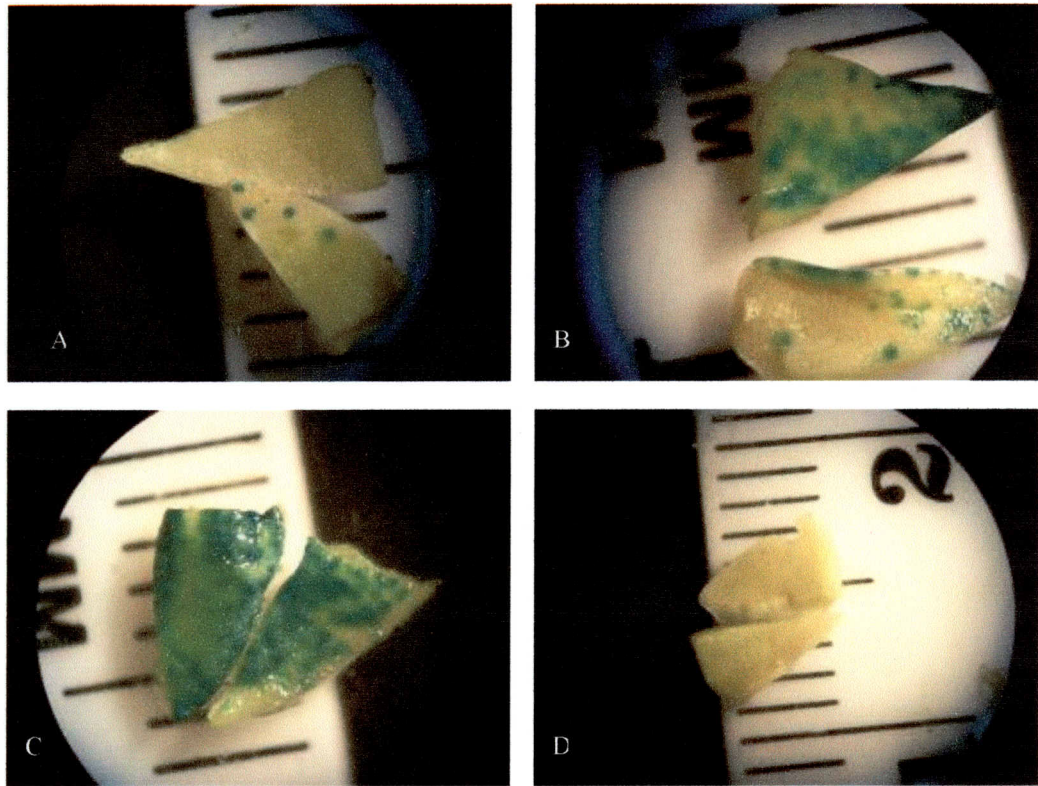


Figura 7. Fragmentos de cotiledones bombardeados después de la prueba de expresión transitoria del gen *uidA*. **A-C** Variación en la expresión transitoria del gen *gus*. **D**. Control no bombardeado.

Formación de brotes en explantes bombardeados

En la figura 8, se presenta el número promedio de brotes por cotiledón bombardeado en cada una de las combinaciones de altura y presión a las cuatro semanas después del bombardeo. Se puede notar una disminución significativa del número de brotes producidos, al utilizar como parámetros una altura de bombardeo de 12 cm en combinación con 100, 150 y 200 PSI. Al utilizar 12 cm se logró obtener un promedio de alrededor de 0.5 brotes por explante. Esto se puede deber al daño mecánico producido por el oro recubierto con el plásmido, en la región proximal del cotiledón donde se forman los brotes, ya que a menor distancia hay mayor violencia en el impacto. Por su parte, al usar una altura de 15 cm o superior el daño se puede reducir y tener un efecto menos adverso en el desarrollo de brotes. En la figura 8, se observa que a alturas de 15 y 18 cm, el promedio de brotes por explante es mayor que al emplear 12 cm. Cuando se utilizó una altura de 15 cm, el promedio de brotes por explante se acercó a 1, pero aún es inferior a los resultados mostrados en la figura 1, en donde se alcanzó un promedio de 1.5 brotes por explante. Un factor que puede estar involucrado en esta disminución es la etapa en la cual los cotiledones se mantuvieron en un medio de cultivo osmótico o bien el daño mecánico ocasionado por los microproyectiles. Mediante un análisis de varianza (Cuadro 4) se determinó que existen diferencias entre las diferentes condiciones de bombardeo ($gl=8$, $F=7.81$, $p < 0.0001$).

Cuadro 4. Resultados del análisis de varianza para el número de brotes según las condiciones de bombardeo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Número de brotes	657	0,09	0,08	87,86

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	22,52	8	2,82	7,81	<0,0001
Condic. de bombardeo	22,52	8	2,82	7,81	<0,0001
Error	233,63	648	0,36		
Total	256,15	656			

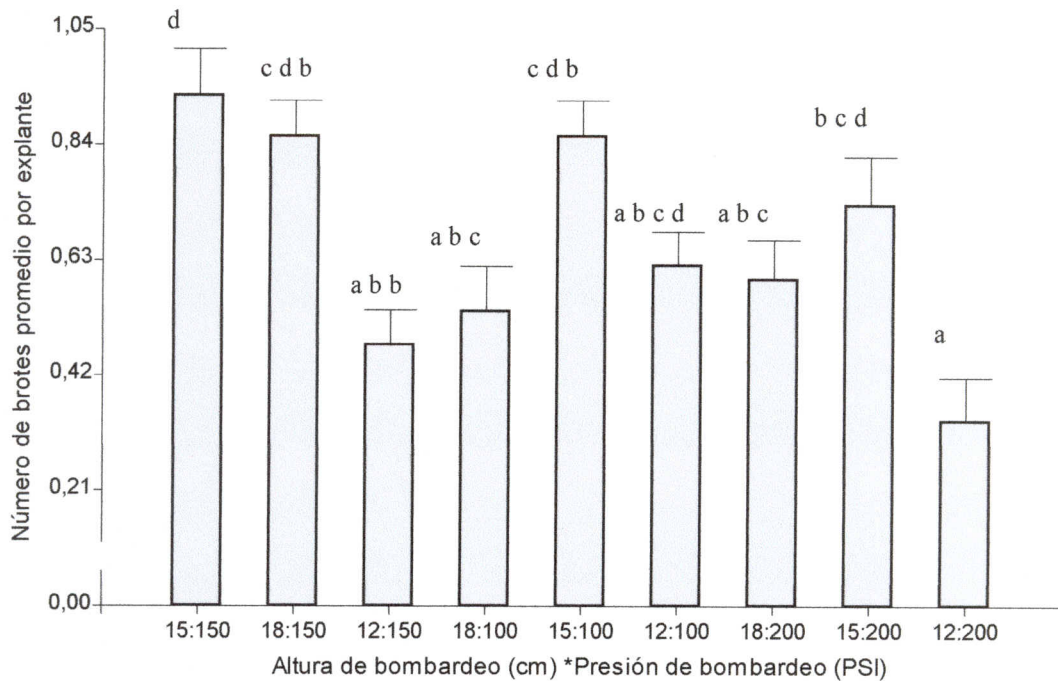


Figura 8. Número de brotes promedio por explante observado en las diferentes alturas y presión de disparo empleadas. Los datos se tomaron a las cuatro semanas de cultivo. Las barras de error corresponden al error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El número de hojas por brote a las cuatro semanas de cultivo se presenta en la figura 9 y se tomó como una estimación del grado de desarrollo de los brotes. Hay una disminución significativa bajo las siguientes condiciones 12cm : 100 PSI, 12cm : 200 PSI, 18cm : 100 PSI y 18 cm : 200 PSI, en las cuales se registran valores inferiores a una hoja por brote. Sin embargo, en las combinaciones restantes se observan datos muy similares entre sí, y estos rondan entre 2 y 4 hojas por brote, cercana a los valores mostrados en el cuadro 2. Al realizar un análisis de varianza se observaron diferencias significativas entre el número promedio de hojas y la condición de bombardeo utilizada ($gl=8$, $F=7.81$, $p < 0.0001$).

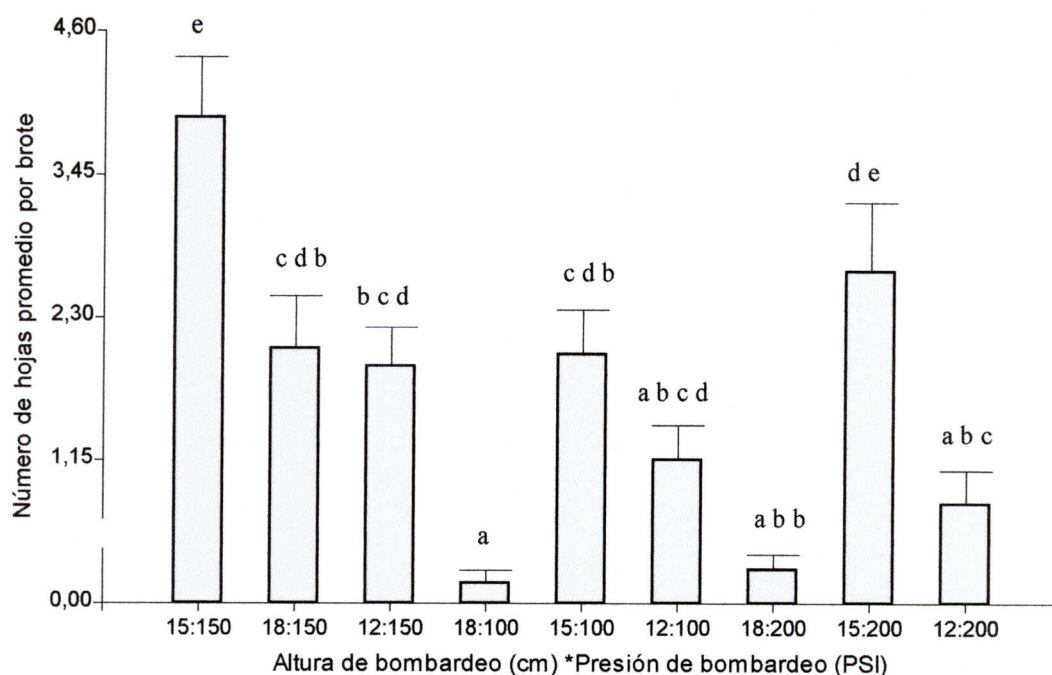


Figura 9. Número de hojas promedio por brotes en las diferentes condiciones de bombardeo empleadas (altura y presión de disparo) a las cuatro semanas de cultivo. Las barras de error corresponden al error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En el Cuadro 5, se muestra la respuesta de los explantes para la inducción de brotes a los 15, 30 y 45 días después del bombardeo bajo las diferentes condiciones de bombardeo. Durante ese periodo, los valores más altos se concentran en las combinaciones de altura 15 cm. y las tres presiones utilizadas. Bajo las condiciones de altura 18 cm. y presión 100 y 200 PSI se presentó la respuesta más baja en los explantes durante la primera semana. La disminución en los porcentajes de respuesta conforme avanza el tiempo se puede deber a la pérdida de explantes por contaminación y por necrosis, este último debido a la selección con PPT.

Cuadro 5. Efecto de las condiciones de bombardeo en el porcentaje de explantes produciendo brotes.

Altura (cm)	Presión (PSI)	Días desde el bombardeo %		
		15	30	45
12	100	72	66	34
12	150	62	48	34
12	200	72	66	30
15	100	64	59	55
15	150	74	71	56
15	200	71	66	55
18	100	32	27	18
18	150	58	68	56
18	200	46	48	20

Expresión estable

A los brotes que han sobrevivido por más de 45 días se les realizó la prueba de expresión del gen reportero *uidA*, para determinar si las células han incorporado dicho gen dentro su genoma. Para ello, se tomó una muestra de hoja de cada brote y se colocó en un eppendorf con solución de revelación GUS y se dejó por toda la noche a 37°C.

Todas las muestras analizadas han dado negativo en la prueba (Figura 10), por lo que se ha procedido a aumentar la concentración de PPT en los medios de cultivo de estos brotes, con el fin de excluir a aquellos brotes no transformantes.

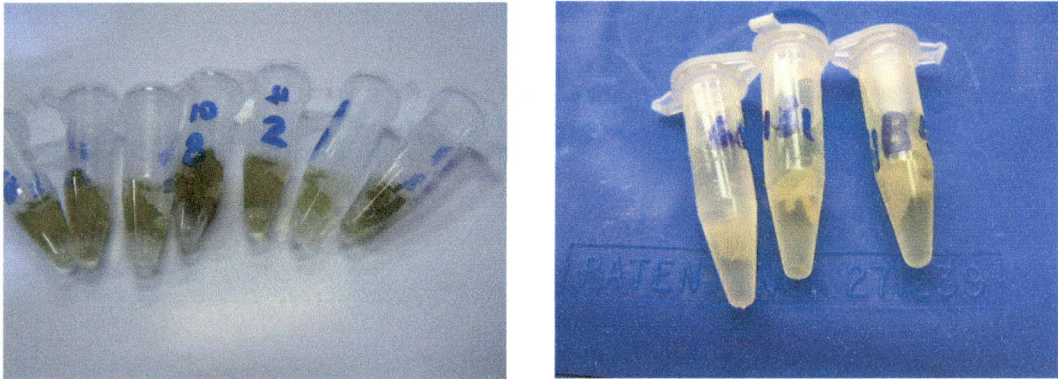


Figura 10. Muestras de hojas después de la prueba de expresión del gen *uidA*, provenientes de brotes que han sobrevivido por más de 45 días en medio de selección con PPT.

Sobrevivencia de los brotes bajo selección con PPT

En las figura 11 y 12 se muestra la sobrevivencia de los brotes después de dos meses en medio de selección con 4 mg^l⁻¹ de PPT. En general las plantas son de tamaño pequeño, con pocas hojas y de coloración amarillo-verdoso, mientras los controles presentan un mayor tamaño y número de hojas verdes. En la mayoría de los experimentos con diferentes condiciones de transformación, la sobrevivencia de los brotes bajo selección con PPT se mantuvo cercana al 2.5%. El mayor registro de sobrevivencia se obtuvo para las condiciones de altura de bombardeo de 12 cm. y una presión de 150 PSI, pero son plantas que se mantienen con un tamaño inferior a 1 cm. de altura.

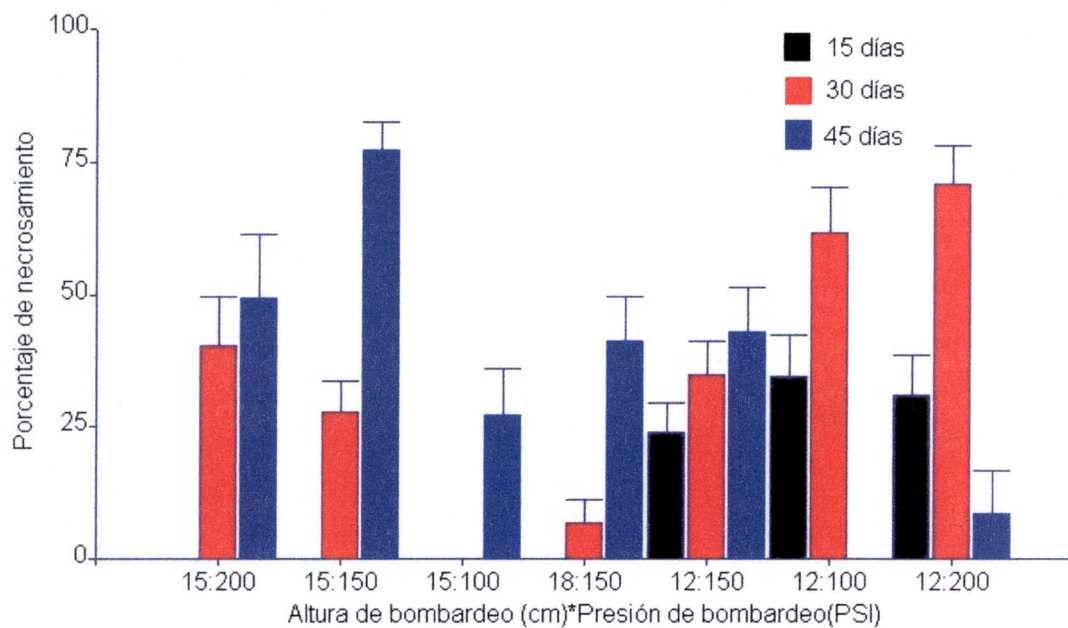


Figura 11. Efecto del PPT en el necrosamiento de los explantes bombardeados con diferentes alturas y presiones de Helio. Los datos se tomaron a los 15, 30 y 45 días.

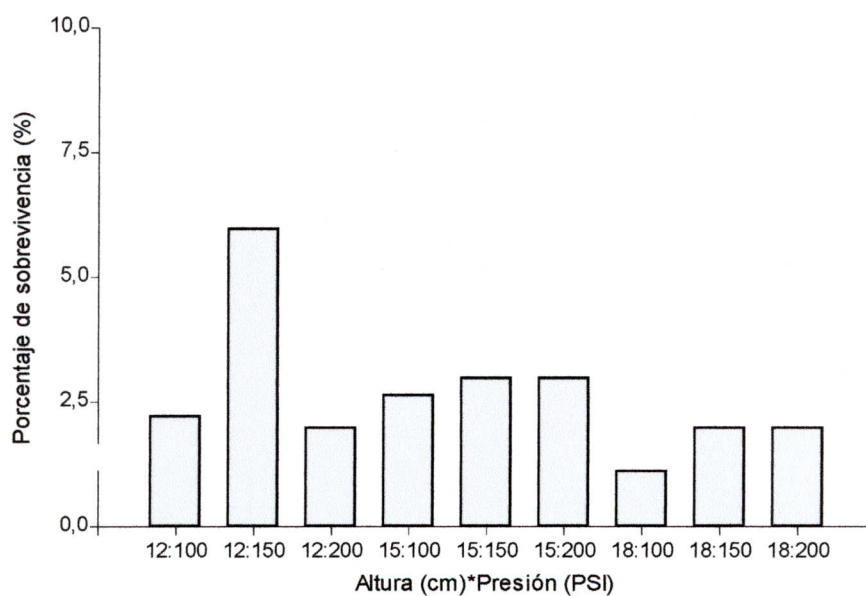


Figura 12. Porcentaje de sobrevivencia de brotes obtenidos después de los bombardeos bajo diferentes condiciones de presión de Helio y altura y bajo selección en medio MS adicionado con 4 mg^l⁻¹.

Pruebas moleculares

Para aquellos brotes que han sobrevivido en el medio de selección con 4 mg l^{-1} se están realizando pruebas moleculares basadas en la técnica de PCR, con el fin de determinar la presencia del gen de resistencia *bar* y para el gen reportero *uidA*. En la figura 13A se muestra el ADN extraído de las supuestas plantas transgénicas de ayote y las plantas controles (no bombardeadas) con el protocolo descrito por Dellaporta. Por otra parte, en la figura 13B, se muestra la amplificación del gen *bar* en los controles positivos (plásmido pCAMBIA 1301-BAR) pero no así en las tres muestras de ADN extraído de hojas de brotes de ayote bombardeados que han sobrevivido a la selección con PPT. En el mes de diciembre del 2007, se llevará a cabo un nuevo PCR con muestras de ADN de hojas de brotes de ayote bombardeados con el plásmido pCAMBIA 1301-BAR y ADN extraído de plantas de arroz modificado genéticamente con el gen *bar*.

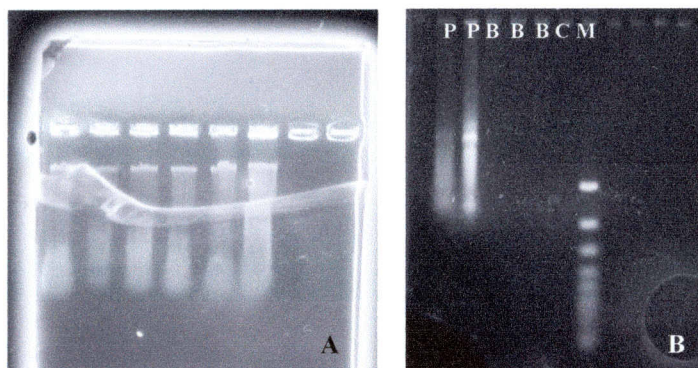


Figura 13. Amplificación de los genes marcadores. A. ADN extraído de las brotes control y bombardeados con el plásmido pCAMBIA 1301-BAR. B. Amplificación del gen marcador *bar*. P: Plásmido pCAMBIA 1301-BAR. B: Pozos cargados con ADN de brotes bombardeados. C: control negativo. M: Marcador molecular de 100 pb.

Para cumplir con el objetivo 4 en un 100 % aún falta por determinar la tolerancia natural de las plantas no transformadas a distintas concentraciones (0, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 % v/v) del herbicida Basta TM. Esta actividad se llevará a cabo en el mes de diciembre como parte de la tesis de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología del estudiante Alexander García.

Por otra parte, no ha sido posible evaluar las características agronómicas y la fertilidad de las plantas transformadas con los genes *bar* y *uidA*, por cuanto, las vitroplantas que permanecen en el medio de selección con PPT no han alcanzado la altura adecuada que les permita ser transplantadas al invernadero. En estas condiciones, las plantas transferidas y aclimatadas a las condiciones del invernadero probablemente moriran. Asimismo, al no haberse comprobado aún la presencia de los genes *bar* y *uidA* podría ser que estas vitroplantas correspondan a falsos positivos.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En la primera etapa del proyecto se desarrolló la metodología para la embriogénesis somática y la regeneración de plantas en cultivos celulares de ayote. En la segunda etapa se validó la tecnología y se demostró su aplicación a otros genotipos de la especie, de interés agronómico y comercial.

Se alcanzaron los objetivos propuestos originalmente, es decir la obtención de embriones somáticos a partir de callos indiferenciados y la subsiguiente regeneración de plantas. Una investigación ulterior de microscopía electrónica para confirmar y optimizar el proceso embriogénico de este procedimiento experimental en esta especie, sería de sumo interés científico y aplicado para la biotecnología del ayote. Al respecto, la estudiante Jenny Muñoz Valverde como parte del Programa de Posgrado en Ciencia Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología está realizando una investigación por tutoría la cual tiene por objetivo analizar morfológicamente el proceso de embriogénesis somática a través del tiempo a partir de tejidos de cotiledón y el proceso de regeneración con la utilización de la microscopía electrónica de barrido y el estereoscopio de luz.

El presente proyecto de investigación logró desarrollar la metodología y los protocolos que permiten la regeneración de plantas de ayote en condiciones de cultivo *in vitro*, *via* embriogénesis somática. Ello permitirá establecer una metodología de punta, que permita la producción sincronizada y a gran escala de los embriones somáticos de ayote en Recipientes de Inmersión Temporal Automáticos (RITA®). De esta manera, en un futuro cercano, será posible el cultivo de dichos embriones somáticos, a escala pre-industrial en biorreactores, para la producción de semillas artificiales de ayote. La aplicación de técnicas como el cultivo *in vitro* para la producción a gran escala de semilla vegetativa, representa una poderosa herramienta para obtener un producto biotecnológico con características agronómicas deseadas que permita mejorar la producción y la competitividad de los productores de ayote.

El desarrollo e implementación de técnicas de esta naturaleza, para la producción de semilla vegetativa en ayote, será un aporte sumamente valioso para la ciencia y la tecnología de Costa Rica y de otras regiones del mundo, ya que aún no se ha desarrollado en ningún otro país. De manera general, el desarrollo de esta metodología permitirá muchas aplicaciones futuras, de tipo básico y aplicado, con miras al desarrollo del país en ese campo, tales como: i) fijación de características agronómicas de las variedades de ayote; ii) micropropagación de variedades de ayote con características deseadas y iii) desarrollo futuro de técnicas no convencionales de mejoramiento genético para resistencia a enfermedades y plagas en esta especie.

El principal interés de este proyecto fue iniciar una estrategia para la aplicación de la biotecnología al mejoramiento genético del cultivo del ayote en Costa Rica. Es por ello que en la tercera etapa se desarrolló la metodología de transformación genética para el ayote (*Cucurbita moschata*) que permita la transferencia ulterior de genes de interés agronómico, tales como los que confieren resistencia a enfermedades virales. Efectivamente, las cucurbitáceas son altamente susceptibles a más de 30 enfermedades virales, que, en muchos casos, pueden infectar simultáneamente una misma planta. De hecho, las pérdidas debidas a las infecciones virales son, con gran frecuencia, el mayor limitante de su producción.

Así, se contribuirá con el desarrollo de una agricultura sostenible en este cultivo emergente, de gran importancia para el país, y podrán sentarse las bases de un futuro plan de manejo integrado, que sea coherente con las políticas de conservación del ambiente y de la biodiversidad de Costa Rica.

8. REFERENCIAS

- Bevan MW., R. B. Flavell. & M. D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of the T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Christensen A. H., R. A. Sharrock & P. H. Quail. 1992. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression, transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18: 675-689.
- Gallagher S. 1992. GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc. USA. 219 p.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., & Bevan M. W. 1987. GUS fusions β -glucuronidasa as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907
- Madriz-Ordeñana, K. 1999. Molecular studies of the defence responses of maize (*Zea mays* L.) in interaction with Maize Rayado Fino Maravirus (MRFV). Thesis of PhD, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Murashige T. & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Thomson CJ., Nova NR., Tizzard R., Cramer R., Davis JE., Lauwerys M. & Botterman J. 1987. Characterization of the herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal*, 6: 2519-2523.
- Ribas A.F., Kobayashi A.K., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. 2005. Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. *Biologia Plantarum.* 49: 493-497.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (ed) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Spencer T.M., Gordon-Kamm W.J., Daines R.J., & Lemaux P.G. 1990. Bialaphos selection of stable transformants from maize cell culture. *Theor. Appl. Genet.* 79:625-631
- Valdez, M., J. L. Cabrera-Ponce, D. Sudhakar, L. Herrera-Estrella & P. Christou. 1998. Transgenic Central American, West African and Asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Annals of Botany* 82: 795-801.
- Vasil I., y Thorpe T. 1994. *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academics Publishers. Netherlands. 593 p.

Anexo 1

Extracción de ADN por el método de Dellaporta

1. Tome 3 círculos del material vegetal (que se obtuvo de la hoja por medio de un sacabocados).
2. Coloque los tres círculos en un tubo eppendorff de 1,5 ml que contenga 500 μ l de Buffer Dellaporta. Macere bien con un pistilo.
3. Agregue 33 μ l de SDS al 20% (10g/50ml de agua) e invierta el tubo. Incube a 65 °C por 10 minutos.
4. Agregue 160 μ l de Acetato de Potasio 5M (245g KoAc/ 500ml de agua), agite con vortex y centrifugue por 10 minutos a 12000 rpm. Luego transfiera el sobrenadante a un tubo eppendorff de 1,5 ml limpio.
5. Agregue 500 μ l de PCI, mezcle y centrifugue por 8 minutos a 12000 rpm. Tome la fase acuosa y transfírela a un tubo eppendorff de 1,5 ml limpio.
6. Agregue un volumen de isopropanol. Mezcle bien volteando el tubo y centrifugue por 10 minutos a 12 000 rpm.
7. aspire el sobrenadante y añada 500 μ l de Etanol al 70%. Deje reposar por dos minutos. Luego centrifugue, aspire el sobrenadante con la pipeta, vuelva a centrifugar, vuelva a aspirar el sobrenadante con la pipeta y deje secar el botón al aire por 10 minutos.
8. Resuspenda el botón en 10 μ l de agua bidestilada estéril, transfiera 5 μ l a un tubo eppendorff limpio de 0,5 ml. A los 5 μ l restantes agrégueles 20 μ l de agua y almacene ambos tubos a -20 °C.

Preparación del Buffer Dellaporta: 100 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl y 10 mM Mercaptoetanol

TrisHCl 1M pH 8.0: Tome 121,1 g de Tris Base y disuelva en 800 ml de Agua destilada. Agregue HCl conc hasta llegar a pH 8.0. Luego afore a 1 L.

EDTA 0,5 M pH 8.0: Tome 181,1 g de EDTA y añada 800 ml de agua destilada. Luego añada NaOH a 1M hasta llegar a pH 8.0. (El EDTA se disolverá cuando el pH esté cerca de 8; una vez disuelto se puede autoclavar).

NaCl 0,5 M: Tome 29,22 g de NaCl y disuelva en 1 L de agua destilada.

Preparación 50 ml de Buffer Dellaporta

En una botella color ámbar agregue 5 ml de solución Tris-HCl 1M pH 8.0, 5 ml de EDTA 0,5 M pH 8.0, 5 ml NaCl 0,5 M y 34,5 μ l de β -Mercaptoetanol. Luego añada agua bidestilada hasta 50 ml. El buffer se almacena a 4° en una Botella Ámbar.

Anexo 2

Resumen presentado a

VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria (REDBIO 2007) organizado por REDBIO/FAO, 22 al 26 de octubre del 2007, Viña del Mar y Valparaíso, Chile.

Plant regeneration by somatic embryogenesis and development of a system for genetic transformation in tropical butternut squash (*Cucurbita moschata*)

Valdez Marta ¹, García Alexander ¹, Delgado Marlon ¹, Gatica Andrés ¹, Ramírez Pilar ^{1,2}

¹ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

Palabras clave: *Cucurbita moschata*, squash, cucurbits, somatic embryogenesis, genetic transformation.

Squash is an economically important crop for countries of tropical and temperate zones. In 2006, Costa Rica exported 8,348 Kg of squash with a total value of US\$ 2,509,472. Despite its importance, this crop is susceptible to different diseases and pests, such as those caused by virus, fungi and bacteria. Techniques such as plant tissue culture and genetic plant transformation can contribute to squash improvement and accelerate the release of varieties with novel traits.

The aim of this study was to establish a protocol for regeneration of commercial and pure lines of butternut squash plants via somatic embryogenesis by studying the influence of genotype, explant source, N⁶-benzylaminopurine (BAP), 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) concentration. For genetic transformation, cotyledons of *C. moschata* cv. Sello de Oro were bombarded with pCAMBIA 1301-BAR (*uidA* and the *bar* gene) using Helium pressure of 1100, 1300 or 1550 psi from a target distance of 6 or 12 cm with a PDS 1000/ He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad). Also, cotyledons were bombarded with a Particle Inflow Gun (PIG) using Helium pressure of 100 and 200 psi from a target distance of 9, 12, 15 or 18 cm.

Regarding the influence of BAP and 2,4-D on somatic embryogenesis induction, the best results were obtained when cotyledons and zygotic embryos were cultured on Murashige and Skoog medium (MS) with 0.5 and 3.5 mg l⁻¹ 2,4-D. No embryogenic calli were observed in leaf segments of *C. moschata* cv. Sello de Oro cultured on MS with different concentrations of BAP and 2,4-D and cotyledons of *C. moschata* cv. PVG 04 cultured on MS with different BAP and 2,4,5-T concentrations. Successful acclimatization of *in vitro* plants was achieved. Regenerated plants appeared morphologically normal.

In relation to the establishment of biolistic parameters, the higher number of blue spots per explant was obtained with 1100 psi and 6 cm of target distance using the PDS 1000/ He device. On the other hand, using the PIG, the higher number of blue spots in squash cotyledons was obtained with 200 psi and 15 cm of target distance.



Establecimiento de cultivos celulares para la regeneración de plantas *in vitro* y para la transformación genética del ayote (*Cucurbita moschata*)



Valdez Marta ¹, García Alexander ¹, Delgado Marlon ¹, Gatica Andrés ¹, Ramírez Pilar ^{1,2}

¹ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.
² Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Universidad de Costa Rica. Ciudad de la Investigación. San Pedro de Montes de Oca. San José, Costa Rica.

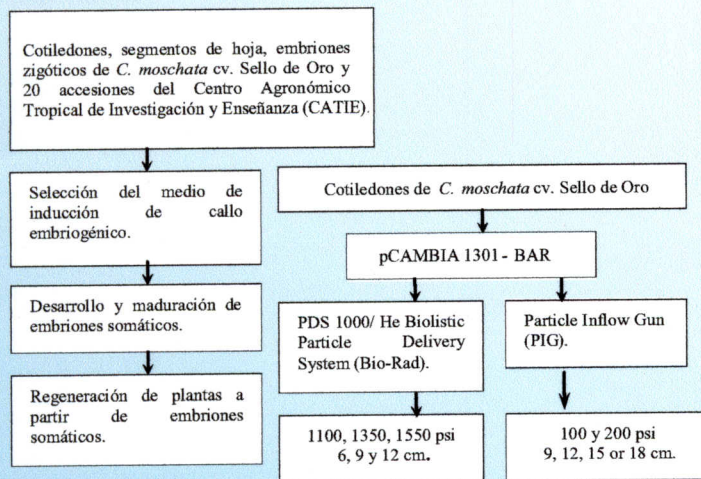
Introducción

El ayote (*Cucurbita moschata*) es uno de los cultivos de mayor importancia en los trópicos. En Costa Rica presenta una creciente importancia económica y social. Sin embargo, la producción se ve afectada por el ataque de plagas y enfermedades, en especial las ocasionadas por virus. Las técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos y la transformación genética pueden contribuir a la reducción de ese problema.

Objetivo general

Desarrollar los protocolos experimentales para la regeneración de plantas en condiciones de cultivo *in vitro* y para la transformación genética del ayote (*C. moschata*) con genes marcadores.

Metodología



Resultados

Los mejores explantes para la inducción de callos embriogénicos en *C. moschata* cv. Sello de Oro fueron los cotiledones (70%) y embriones zigóticos (53-56%). Con respecto al medio de cultivo, el mejor medio consistió de las sales minerales Murashige y Skoog (MS) con 0.5 ó 3.5 mg l⁻¹ 2,4-D. Al transferir los callos embriogénicos al medio de regeneración se obtuvieron brotes luego de dos semanas de cultivo. Los brotes se transfirieron a un medio MS para el desarrollo de plántulas, las cuales se llevaron a condiciones de invernadero y campo (Figura 1). De las 20 accesiones del CATIE examinadas, 10 han generado brotes y plántulas. El análisis histológico demuestra la regeneración de plantas *in vitro* via embriogénesis somática (Figura 2).

En cuanto al establecimiento de parámetros de bombardeo, el mayor número de puntos azules por explante se obtuvo con 1100 psi y 6 cm de distancia al utilizar la pistola PDS 1000/ He. Por otro lado, con la pistola PIG, el mayor número de puntos azules por cotiledón se obtuvo con una presión de Helio de 200 psi y una distancia de 15 cm (Figura 3).

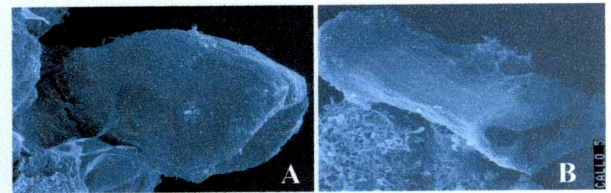


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido del proceso de embriogénesis somática en *C. moschata* cv. Sello de Oro. (a) Embrión somático en estado globular. (b) Embrión somático en estado torpedo.

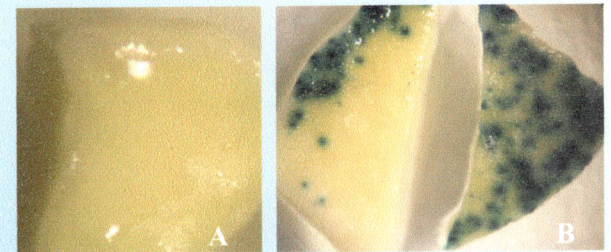
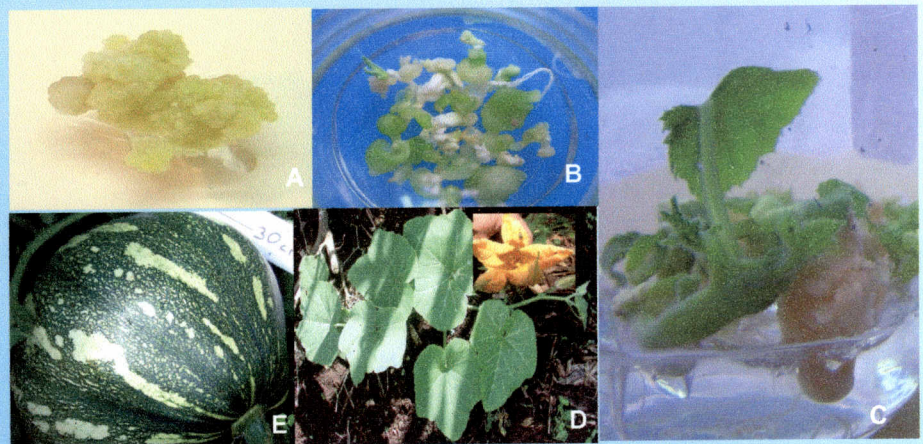


Figura 3. Análisis histoquímico de la expresión transitoria del gen *uidA*. (A) Cotiledones no bombardeados (control) (B) Cotiledones bombardeados con pCambia 1301-BAR.

Figura 1. Proceso de embriogénesis somática en *C. moschata* cv. Sello de Oro. (A) Callo embriogénico obtenido después de 16 semanas en medio de callogénesis. (B) Brotes regenerados a partir de embriones somáticos. (C) Plántulas de ayote en medio de regeneración. (D) Plantas aclimatadas en el campo con flores normales. (E) Frutos de ayote.



Agradecimientos

Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica
 Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT)
 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT)

Anexo 3

Manuscrito sometido a consideración para el Suplemento Especial del 50 Aniversario
de la Escuela Biología de la Revista Biología Tropical

***In vitro* plant regeneration system for different tropical butternut squash genotypes
(*Cucurbita moschata*)**

Marta Valdez-Melara¹, Alexander García¹, Marlon Delgado¹, Andrés M. Gatica-Arias¹,
Pilar Ramírez-Fonseca²

¹ Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, P.O. Box 2060, San Pedro, Costa Rica.

Escuela de Biología y Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, P.O. Box 2060, San Pedro, Costa Rica.

Abstract. An efficient and reproducible method for regeneration of commercial and pure lines of tropical butternut squash (*Cucurbita moschata*) plants via somatic embryogenesis was developed. The influence of genotype, explant source, N⁶-benzylaminopurine (BAP), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) concentration on somatic embryogenesis induction was investigated. Friable embryogenic calli was produced from zygotic embryos (53-56%) and cotyledons (70%) of *C. moschata* cv. Sello de Oro cultured on callus induction medium (CIM) supplemented with 0.5 mg l⁻¹ or 3.5 mg l⁻¹ 2,4-D. No embryogenic calli was obtained from leaf segments of *C. moschata* cv. Sello de Oro cultured on CIM supplemented with different concentrations of BAP and 2,4-D and cotyledons of *C. moschata* cv. PVG 04 cultured on CIM with BAP and 2,4,5-T. Embryogenic calli induction was achieved in 75 % *C. moschata* pure lines evaluated and calli percentage frequency range from 5% to 34%. Successful acclimatization of squash *in vitro* plants was achieved in the greenhouse and in the field. Regenerated plants appeared morphologically normal and set flowers and fruits with seeds that could germinate normally.

Keywords: Cucurbits · auxins · cytokinin · explant source · genotype

The *Cucurbitaceae* is a large family that includes a number of valuable edible crop species. Collectively world production of cucurbits in 2004 reached 19.7 million metric tones (FAOSTAT 2005). Squash (*Cucurbita moschata*) is an economic important crop for countries of tropical and temperate zones (Chee 1991). In Costa Rica, squash is a crop of increasing economic and social importance. In 2006, Costa Rica exported 8.348 Kg of squash with a total value of US\$ 2.509.472 (BCCR 2006).

Despite its importance, this species has not been subject of sufficient genetic or biotechnological investigations. Improvement of this crop to resist viruses, insects, weeds and to improve its growth and vigor would be of considerable commercial value. Plant biotechnology techniques could help overcoming these problems, but their use requires a reliable and efficient *in vitro* culture system (Debeaujon and Branchard 1993).

Plant regeneration from *in vitro* cultured cells can be accomplished through somatic embryogenesis or organogenesis. In the first case, somatic embryogenesis is the developmental process by which bipolar structures that resemble zygotic embryos are developed from haploid or diploid somatic cell through an orderly embryological stage without gametes fusion. This process can be achieved via direct somatic embryogenesis (DSE) or indirect somatic embryogenesis (ISE). DSE is characterized by the induction of somatic embryos directly from pro-embryogenic cells of the leaf, stem, microspores or protoplasts in the absence of conspicuous embryogenic calli proliferation, whereas in ISE somatic embryos are developed from friable embryogenic calli (Jimenez 2005).

On the other hand, organogenesis is the developmental pathway by which shoots and roots are formed in response to culture (concentration and type of plant growth regulators) and environmental (light intensity, temperature and photoperiod) conditions. Contrasting to somatic embryogenesis pathway, organogenesis is characterized by the presence of vascular connections between mother tissue and the regenerating sections (Jimenez 2001, 2005).

In the *Cucurbitaceae* family, *in vitro* plant regeneration has been reported by organogenesis in squash (*Cucurbita pepo* L.) (Abrie and Staden 2001, Ananthakrishnan *et al.* 2003, Kathiravan *et al.* 2006, Selvaraj *et al.* 2006, Ananthakrishnan *et al.* 2007), pumpkin (*Cucurbita maxima* L.), melon (*Cucumis melo* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Abrie and Staden 2001) or somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita*

pepo L.) (Chee 1991, Gonsalves *et al.* 1995, Kintzios *et al.* 2002, Leljak-Levanić *et al.* 2004) and melon (Abrie and Staden 2001, Kintzios *et al.* 2002). Several protocols have been described in the literature for plant regeneration of squash via ISE (Debeaujon and Branchard 1993); nevertheless, specific conditions and protocols developed for a particular genotype are not necessarily reproducible for others.

The influence of BAP, 2,4-D and 2,4,5-T concentration, explant source and genotype on ISE induction of *Cucurbita moschata* has not been reported. The aim of this work was to set up a protocol for the callus induction and plant regeneration through ISE, as well as for the acclimatization of tropical butternut squash (*Cucurbita moschata*) plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and explant preparation: Mature seeds of commercial butternut squash (*Cucurbita moschata*) cultivars Sello de Oro, Birris, PVG 01 and PVG 04 were used as source of explants. Also, seeds of *C. moschata* pure lines 7036, 18933, 15049A, 5896, 5998, 14895, 12130, 5978, 18938, 7211, 11048, 11442, 9284A, 9206, 9212, 11316, 5996, 9316A, 6368 and 11428, provided by the Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE, Turrialba, Costa Rica) were used. After removal of the seed coat, the de-coated seeds were washed in 70% (v/v) ethanol for 10 min, disinfected in 4.5% (v/v) sodium hypochlorite (NaOCl) supplemented with 8 drops of Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 20 min followed by an immersion in the fungicide Benomyl (Piscis, Costa Rica) at a concentration of 100 mg l⁻¹ for 5 min. Finally, the seeds were washed three times with sterile distilled water.

The disinfected seeds were cultured in 125 ml flasks, closed with polyethylene food wrap (Glad, Costa Rica), containing 20 ml of half strength Murashige and Skoog (1962) medium (MS) with 30 g l⁻¹ sucrose and 3 g l⁻¹ Gelrite. The pH was adjusted to 5.6 with NaOH before autoclaving for 21 min at 121 °C and 1.05 kg cm⁻². Explants were cultured with 16 h light photoperiod (30 μmol m⁻² s⁻¹) at 26±2°C.

Induction of somatic embryogenic and plant regeneration: Cotyledons (1 cm²) and leaf segments (1 cm²) of *C. moschata* cv. Sello de Oro were excised from *in vitro* grown seedlings 7 days after germination. Moreover, the zygotic embryos excised from disinfected seeds were used as explant. In a first experiment, these explants were cultured on Petri dishes (100 mm x 20 mm) containing 20 ml of CIM composed of MS mineral salts and vitamins, BAP (0, 0.4, 0.8 and 1.6 mg l⁻¹) and 2,4-D (0.5, 1.0, 2.5 and

3.5 mg l⁻¹) (Table 1), 30 g l⁻¹ sucrose and 3 g l⁻¹ Gelrite. The pH was adjusted to 5.6 with NaOH before autoclaving for 21 min at 121 °C and 1.05 kg cm⁻². Cultures were maintained in the dark at 26±2 °C. Embryogenic calli were transferred to fresh medium every four weeks during 16 weeks.

Once the best explant source and culture media composition was determined, in a second experiment, cotyledons from *C. moschata* cv. Birris, PVG 01 and PVG 04 were cultured on CIM supplemented with 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D. To evaluate the influence of 2,4,5-T on embryogenic calli induction, in a third experiment, cotyledons from *C. moschata* cv. PVG 04 were cultured on MS basal medium supplemented with BAP (0, 0.4, 0.8 and 1.6 mg l⁻¹) and 2, 4, 5-T (0.5, 1.0, 2.5 and 3.5 mg l⁻¹) (Table 2). Moreover, the cotyledons from 20 pure lines of *C. moschata* provided by CATIE were cultured on MS basal medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D. Callus formation frequency [(explants with embryogenic callus/total of explants)*100] was evaluated after 16 weeks of culture.

After 16 weeks of culture on CIM, embryogenic calli were transferred to regeneration medium (RM) composed of MS mineral salts supplemented with 0.05 mg l⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA) and 0.05 mg l⁻¹ kinetin (Chee, 1991). After 6 weeks of culture RM, the regenerated plantlets were transferred to half strength MS medium. The explants were cultured under 16 h light photoperiod (30 µmol m⁻² s⁻¹) at 26±2°C. The regeneration percentage [(number of plants regenerated from shoots/total of embryogenic calli)*100] was recorded after five weeks of culture on RM.

Scanning electron microscopy (SEM): Embryogenic callus pieces were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer with pH 7.4 for 24 h at 4 °C. The samples were washed twice in the same buffer and were postfixed in 2% osmium tetroxide solution for 2 h. Fixed tissues were dehydrated in a graded ethanol solutions for 15 min each. After that, the dehydrated specimens were critical point dried and then dried specimens were mounted on aluminium blocks. Finally, the mounted specimens were coated with a very thin layer of gold-palladium and subsequently the coated specimens were examined in a scanning electron microscope (S-570, Hitachi, Japan) at an accelerating voltage of 15 KV.

Acclimatization and field transfer: Regenerated shoots (approximately 3 cm long) with well developed leaves and roots were transferred to pots containing soil, covered with plastic bags and maintained in the greenhouse under 12 h light photoperiod at

26±2°C. The plantlets were watered twice a week with distilled water. Then, after two weeks, the plantlets were transferred in soil under field conditions. The plant regeneration percentage [(number of plants successful acclimated/total number of acclimated plants)*100] was determined. Moreover, a phenotypic analysis was conducted using flowers, fruits and seeds production.

Statistical analysis: The statistical analysis was performed using one-way ANOVA and the significance of differences among treatment means were contrasted with Tukey's Honestly Significant Difference Test (HSD) at $P < 0.05$. The program STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK, USA) version 6.0 was used.

RESULTS

ISE began with the development of a translucent primary callus on the cut edges of explants after two weeks of culture on CIM. Subsequently, yellow friable embryogenic callus formed on the edges of primary callus after 16 weeks of culture on CIM (Fig. 1A). Scanning electron micrographs showed formation of globular (Fig. 2A) and torpedo shape somatic embryos on the embryogenic calli surface (Fig. 2B). Shoots developed after five weeks of culture on RM (Fig. 1B).

Cucurbita moschata cv. Sello de Oro was used in initial experiments. Regardless of the concentration of BAP and 2,4-D on the CIM, the calli formation frequency differed significantly among the three types of explants evaluated. The higher percentage of callus formation was obtained using zygotic embryos (21%), cotyledons (10%) and leaf segments (0%) ($P < 0.05$) (Fig. 3).

Culture of *C. moschata* cv. Sello de Oro cotyledons on CIM supplemented with a range concentration of BAP and 2,4-D resulted in a differential response. The best results were obtained when cotyledons were cultured on CIM with 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D (Table 1). Embryogenic calli were obtained from *C. moschata* cv. Sello de Oro zygotic embryos cultured on CIM supplemented with all the concentrations of BAP and 2,4-D evaluated, except with 1.6 mg l⁻¹ BAP and 2.5 mg l⁻¹ 2,4-D. The best results were obtained when zygotic embryos were cultured on CIM with 0.5 or 3.5 mg l⁻¹ 2,4-D (Table 1).

Independently of the 2,4-D concentration on the CIM, it was observed that as the BAP concentration on the CIM increase, the callus formation frequency decreased (Table 1).

Among the of commercial squash cultivars Birris, PVG 01 and PVG 04, the higher embryogenic calli frequency (29%) was obtained when PVG 04 cotyledons were cultured on CIM supplemented with 0.5 mg l^{-1} 2,4-D. No embryogenic calli was obtained from Birris and PVG 01 cotyledons after 16 weeks of culture on the same callus induction medium.

On the other hand, no embryogenic calli were observed in cotyledons of *C. moschata* cv. PVG 04 after 16 weeks of culture on the CIM supplemented with different BAP and 2,4,5-T concentrations (data not show).

Embryogenic calli induction was achieved in 75 % (15 of the 20) *C. moschata* pure lines evaluated. No embryogenic calli were obtained in 11048, 11442, 9284A, 9206 and 9212 pure lines after 16 weeks of culture on CIM supplemented with 0.5 mg l^{-1} 2,4-D. In the reactive *C. moschata* pure lines, callus formation frequency range from 5% to 34% and it was lower than the frequency obtained using *C. moschata* cv. Sello de Oro (Table 2).

In relation to the regeneration of shoots from embryogenic calli and their conversion into plants, only *C. moschata* cv. Sello de Oro and the pure lines 6368, 11428, 7036, 18933, 15049A, 5896 and 5998 developed plants from shoots. In the *C. moschata* pure lines 5996, 9316A and 11316, the shoots regenerated from embryogenic calli did not develop into plants (Table 3). The higher regeneration percentage and number of plants developed from shoots was obtained with *C. moschata* cv. Sello de Oro (Table 3). Squash somatic embryos developed into plants with two to four pairs of leaves (Fig.1C) and 100% of the regenerated plants were succesful acclimated and developed into adult plants with normal flowers and fruits (Fig. 1D and 1E). Moreover, the number of seeds per fruit, the number of fruits per plant and the weight of the fruits were very similar among plants regenerated *in vitro* from embryogenic calli and plants regenerated *ex vitro* from sexual seed (Table 4).

DISCUSSION

A protocol for the induction of *C. moschata* embryogenic callus and for the formation of somatic embryos was established in the present study. Germination and development of butternut squash somatic embryos into plants was also successfully obtained. Moreover, the results obtained in this work corroborated the influence of the genotype, the source of explant and the type and concentration of plant growth regulator on ISE induction using commercial and pure lines of *C. moschata*.

The influence of the genotype was observed since the higher calli formation frequency was obtained with Sello de Oro cultivar than with Birris, PVG 01, PVG 04 and the *C. moschata* pure lines (Table 1 and 2). In this sense, it has been reported that the embryogenic capacity is genetically determined in cucumber (Nadolska-Orczyk and Malepsky 1989 reviewed by Debeaujon and Branchard 1993) melon (Oridate *et al.* 1992 reviewed by Debeaujon and Branchard 1993), black pepper (*Piper nigrum* L.) (Ramakrishnan *et al.* 2005) rice (*Oryza sativa* L.) (Hoque and Mansfield 2004), cotton (*Gossypium hirsutum* L.) (Wu *et al.* 2004) and coffee (*Coffea* sp.) (Bieysse *et al.* 1993, Molina *et al.* 2002, Santana *et al.* 2004).

In addition, our results corroborated that the explant source influenced ISE since higher calli formation frequency was obtained using zygotic embryos and cotyledons. Success in regeneration through somatic embryogenesis depends on the origin, physiological state and age of the explant. Generally, immature organs and meristematic tissues, which contain undifferentiated cells, are more suitable for plant morphogenesis (Hoque and Mansfield 2004). In cucurbits, diverse types of explants have been used to induce somatic embryogenesis, nevertheless, cotyledons and hypocotyls tissue are especially successful (Debeaujon and Branchard 1993). In *C. moschata* cv. Seoul Dabagi and PM 143, somatic embryos and plants have been obtained by DSE from nucellar cells from unfertilized ovules cultured on half strength MS (Kwack and Fujieda 1998 reviewed by Debeaujon and Branchard 1993). To our knowledge, this is the first report of somatic embryogenesis induction in *C. moschata* using zygotic embryos and cotyledons as explants. However, due to the lower availability of zygotic embryos, this tissue was considered less appropriate for ISE induction and plant regeneration in *C. moschata*.

Regarding the influence of plant growth regulators (PGR), the best results were obtained using 0.5 and 3.5 mg l⁻¹ 2,4-D (Table 1). On squash somatic embryogenesis induction, investigations have been focused on the type, concentration and time of application of PGR. The process of somatic embryogenesis in the *Cucurbitaceae* family requires an induction culture medium followed by a maturation medium. Generally, the former medium is supplemented with an auxin, such as 2,4-D, NAA, IBA (indole-3-butyric acid) and 2,4,5-T (Debeaujon and Branchard 1993).

On the other hand, no embryogenic calli were obtained from *C. moschata* PVG 04 cotyledons using different BAP and 2,4,5-T concentrations. In contrast, Chee (1991, 1992) obtained embryogenic calli from shoot tips and cotyledons of *C. pepo* L. cv.

YC60 cultured on MS supplemented with 1.2 mg l^{-1} 2,4,5-T, 0.8 mg l^{-1} BAP and 0.1 mg l^{-1} kinetin. Because cotyledons of *C. moschata* cv. PVG 04 were the only source of explants evaluated, further studies are required to determine the influence of BAP and 2,4,5-T on somatic embryogenesis induction from different *C. moschata* genotypes and explants.

The PGR used at the induction phase can play an important role on somatic embryogenesis process. Somatic embryogenesis is generally promoted by auxins, either alone or in combination with cytokinins (Pacheco *et al.* 2007). Although, BAP is the most frequently used cytokinin for somatic embryogenesis induction in cucumber and melon (Debeaujon and Branchard 1993), in *C. pepo* L. BAP reduced embryogenesis efficiency (Noël *et al.* 1992 reviewed by Debeaujon and Branchard 1993). A similar result was observed in the present study when *C. moschata* Cv. Sello de Oro cotyledons were cultured with different BAP concentrations (Table 1).

Based on the protocol developed in this study, *C. moschata in vitro* plants could be obtained in 20 weeks after culture initiation. Moreover, the *in vitro* protocols reported in this work could be used for mass production of somatic embryos in bioreactor for use in artificial seeds and to obtain competent target tissue (embryogenic calli and plants) for genetic modification through biolistic, *Agrobacterium* or mutagenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT, Costa Rica) and the Vicerrectoría de Investigación of the University of Costa Rica (UCR).

REFERENCES

- Abrie, A.L. & J. Van. Staden. 2001. Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars. *Plant Growth Regul.* 35: 263-267.
- Ananthakrishnan, G., X. Xia, C. Elman, S. Singer, H.S. Paris, A. Gal-On & V. Gaba. 2003. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. *Plant Cell Rep.* 21: 739-746.
- Ananthakrishnan, G., X. Xia, S. Amutha, S. Singer, M. Muruganatham, S. Yablonsky, E. Fischer, & V. Gaba. 2007. Ultrasonic treatment stimulates multiple shoot regeneration and explant enlargement in recalcitrant squash cotyledon explants *in vitro*. *Plant Cell Rep.* 26: 267-276.
- Bieysse, D., A. Gofflot & N. Michaux-Ferriere. 1993. Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can. J. Bot.* 71 : 1496-1502.
- BCCR (Banco Central de Costa Rica). Estadísticas de exportaciones: ayote. Available http://www.bccr.fi.cr/flat/bccr_flat.htm. 2006.
- Chee, P. 1991. Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L cv. YC 60. *Plant Cell Rep.* 9: 620-622.
- Chee, P. 1992. Initiation and maturation of somatic embryos of squash (*Cucurbita pepo*). *HortScience.* 27: 59-60.
- Debeaujon, I. & M. Branchard. 1993. Somatic embryogenesis in *Cucurbitaceae*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 34: 91-100.
- Leljak-Levanić, D., N. Bauer, S. Mihaljević, & S. Jelaska. 2004. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J. Plant Physiol.* 161: 229-236.
- FAOSTSAT. 2005. World agricultural data. Available in: <http://apps.foa.org> (March 20 2007).
- Gonsalves, C., B. Xue & D. Gonsalves. 1995. Somatic embryogenesis and regeneration from cotyledon explants and six squash cultivars. *HortScience.* 30: 1295-1297.
- Hoque, M.D. & J.W. Mansfield. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 78: 217-223.
- Jiménez, V. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Rev. Brasil. Fisiol. Veg.* 13:196-223.

- Jiménez, V. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47: 91-110.
- Kathiravan, K., G. Vengedesan, S. Singer, B. Steinitz, H.S. Paris & V. Gaba. 2006. Adventitious regeneration *in vitro* occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 85: 285-295.
- Kintzios, S., E. Sereti, P. Bluchos, J.B. Drossopoulos, C.K. Kitsaki, A. Liopa-Tsakalidis. 2002. Growth regulator pretreatment improves somatic embryogenesis from leaves of squash (*Cucurbita pepo* L.) and melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Rep.* 21, no. 1, p. 1-8.
- Molina, D., M. Aponte, H. Cortina & G. Moreno. 2002. The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71: 117-123.
- Murashige, T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Raghavan, R. & D. G. Snehasish. 2005. Effect of Explants and Genotypes on Primary Somatic Embryogenesis in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Citología.* 70: 195-202.
- Santana, N., M.E. González, M. Valcárcel, A. Canto-Flick, M. Hernández, C.F.J. Fuentes-Cerda, F. Barahona, J. Mijangos-Cortés & V.M. Loyola-Vargas. 2004. Somatic embryogenesis: a valuable alternative for propagating selected robusta coffee (*Coffea canephora*) clones. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 40: 95-101.
- Selvaraj, N., A. Vasudevan, M. Manickavasagam & A. Ganapathi. 2006. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. *Biol. Plantarum.* 50: 123-126.
- Wu, J., X. Zhang, Y. Nie, S. Jin & S. Llang. 2004. Factors affecting somatic embryogenesis and plant regeneration from a range of recalcitrant genotypes of Chinese cottons (*Gossypium hirsutum* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 40: 371-375.

TABLE 1

The effect of BAP and 2,4-D concentration on embryogenic callus formation from cotyledons, leaf and zygotic embryos of Cucurbita moschata cv. Sello de Oro after 16 weeks of culture on CIM supplemented with different growth regulators concentrations.

Growth regulator		Callus formation frequency (%) ^a		
BAP (mg l ⁻¹)	2,4-D (mg l ⁻¹)	Cotyledons	Leaf segments	Zygotic embryos
0	0.5	70 a	0	56 a
0.4	0.5	0 c	0	7 d
0.8	0.5	0 c	0	22 a b c d e
1.6	0.5	0 c	0	11 d e
0	1.0	37 b	0	33 a b c d e
0.4	1.0	0 c	0	16 c d e
0.8	1.0	0 c	0	18 c d e
1.6	1.0	0 c	0	2 e
0	2.5	0 c	0	14 c d e
0.4	2.5	0 c	0	8 d e
0.8	2.5	0 c	0	6 e
1.6	2.5	0 c	0	0 e
0	3.5	40 b	0	53 a b
0.4	3.5	0 c	0	40 a b c d
0.8	3.5	0 c	0	47 a b c
1.6	3.5	0 c	0	20 b c d e

Values followed by the same letter are not significantly different with the Tukey HSD test at $P < 0.05$.

^a Callus formation frequency were calculated using this formula [(explants with embryogenic callus/total of explants)*100].

TABLE 2

High frequency somatic embryogenesis response from cotyledons of 20 Cucurbita moschata pure lines after 16 weeks of culture on CIM supplemented with 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D.

Pure line	Callus formation frequency (%) ^a
7036	22
18933	11
15049A	18
5896	23
5998	8
14895	19
12130	18
5978	5
18938	22
7211	13
11048	0
11442	0
9284A	0
9206	0
9212	0
11316	18
5996	11
9316A	17
6368	20
11428	34

^a Callus formation frequency were calculated using this formula [(explants with embryogenic callus/total of explants)*100].

TABLE 3

Regeneration of somatic embryos into plants of Cucurbita moschata after six weeks of culture on RM.

Cultivars	Regeneration (%) ^a	Number of shoots formed from embryogenic calli	Number of plants developed from shoots
Sello de Oro	38	8	8
11428	13	14	4
7036	8	2	1
18933	25	4	3
15049A	14	3	2
5896	10	1	1
5998	4	4	1
6368	17	4	1
5996	0	4	0
9316A	0	2	0
11316	0	1	0
Birris	0	0	0
PVG 01	0	0	0
PVG 04	0	0	0

^a Regeneration was calculated using this formula [(number of plants regenerated from shoots/total of embryogenic calli)*100].

TABLE 4

Morphological characteristics of Cucurbita moschata cv. Sello de Oro plants regenerated in vitro and ex vitro.

Variety	Origin	Number of seeds	Germination ^a (%)	Number of fruits	Weight of the fruit (kg)
Sello de Oro	<i>In vitro</i> regeneration	568	97	5	7.2
Sello de Oro	Sexual regeneration	436	-	4	6.9

^a The germination percentage [(number of germinated seeds/ the total number of seeds)* 100].

FIGURES LEGENDS

Fig. 1. High frequency somatic embryogenesis from *Cucurbita moschata* cv. Sello de Oro. (A) Embryogenic callus formed after 16 weeks of culture on basal MS medium supplemented with 0.5 mg l^{-1} 2,4-D. (B) Regenerated squash plantlets from somatic embryos cultured on regeneration medium. (C) Squash plants cultured on basal MS medium. (D) Plant acclimated in the field with flowers. (E) Squash fruits with normal seeds.

Fig. 2. Scanning electron micrographs of *Cucurbita moschata* cv. Sello de Oro. (A) Globular somatic embryos. (B) Torpedo somatic embryos.

Fig. 3. Effect of the explant source on high frequency somatic embryogenesis induction from from *Cucurbita moschata* cv. Sello de Oro regardless of the concentration of BAP and 2,4-D on the CIM. The callus formation percentage was evaluated 16 weeks after the initiation of the experiments. Values within columns followed by the same letter are not significantly different with the Tukey HSD test ($P < 0.05$).

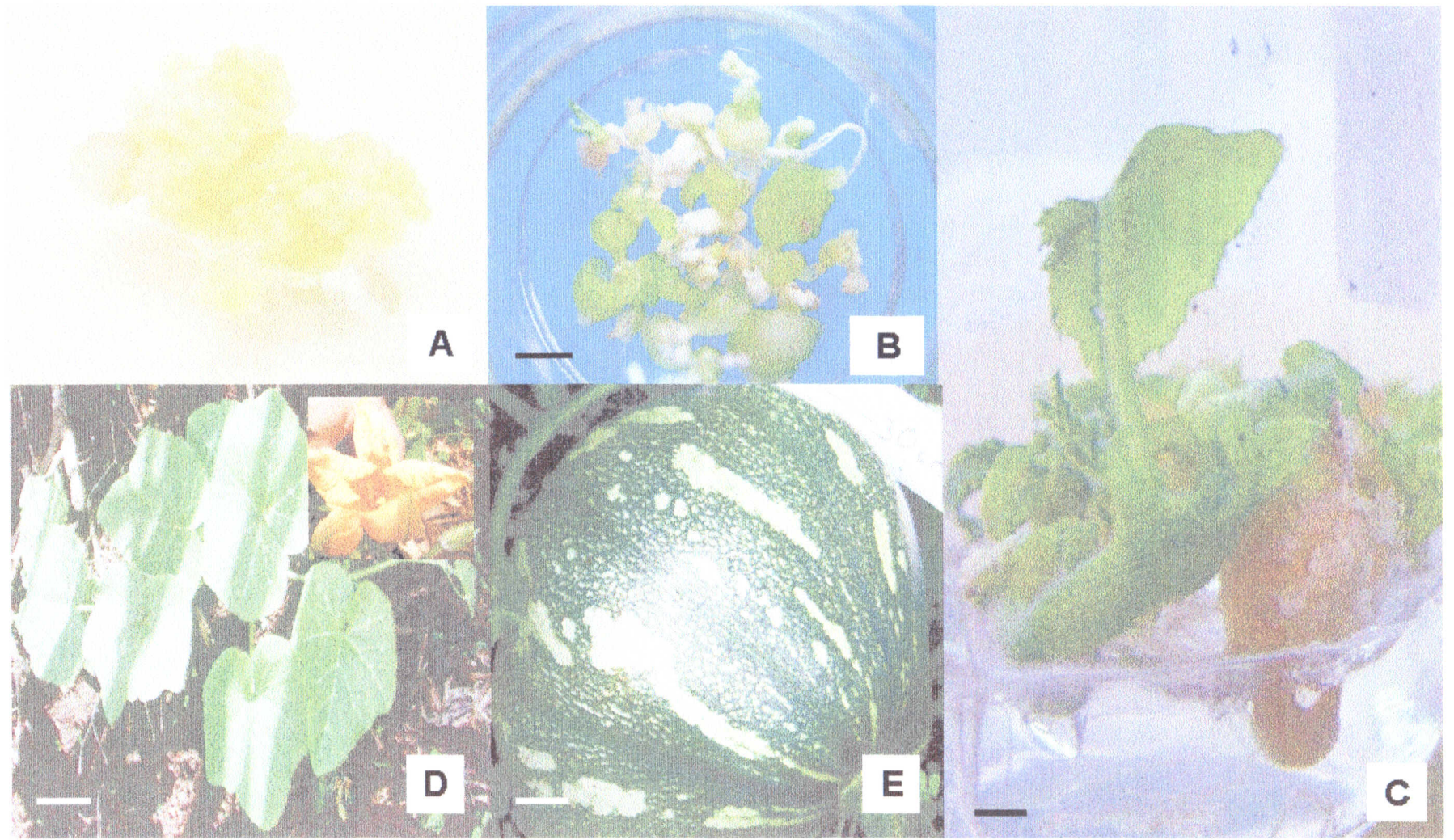


Figura 1

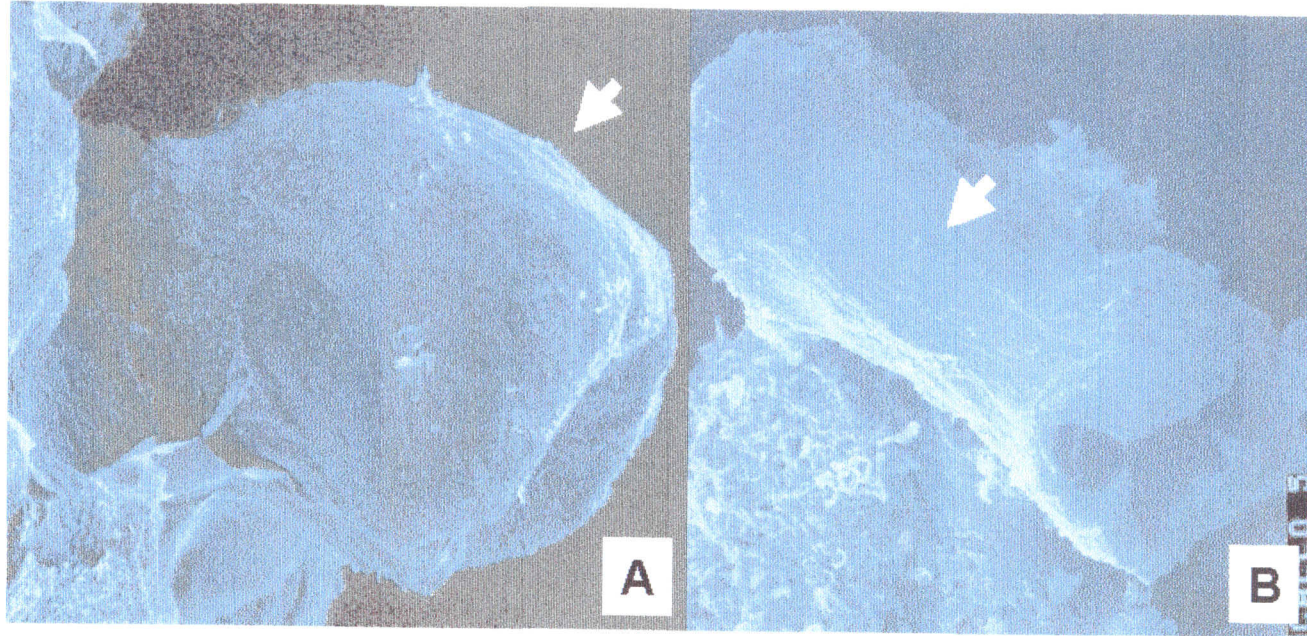


Figura 2

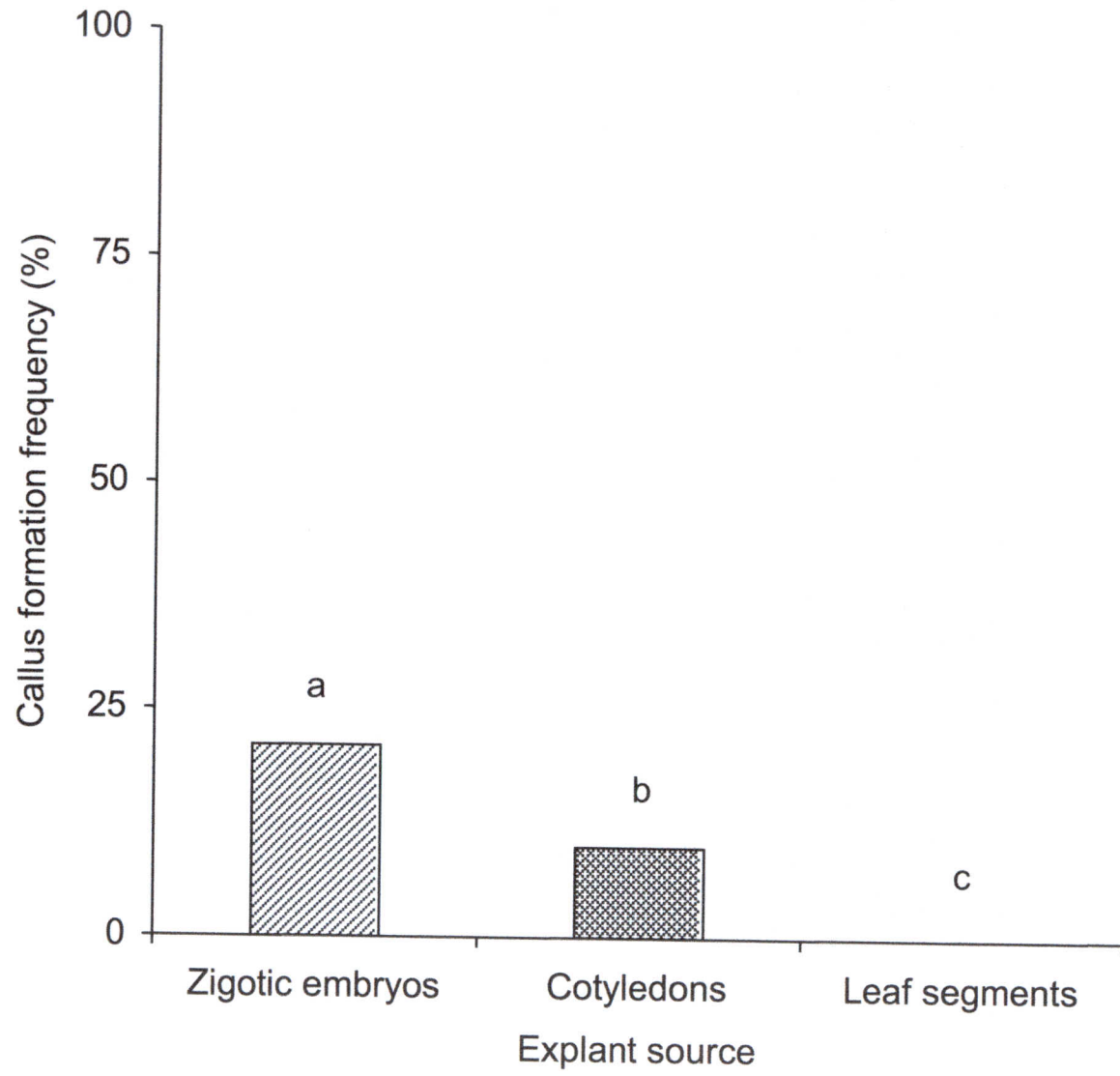


Figura 3