

**Biotechnological Investigations on  
Regeneration and Transformation in  
*Capsicum annum* L.**

Mahran Mokhtar Mohamed Ashry El Nagar

VERLAG GRAUER · Beuren · Stuttgart · 2006

## 5 Summary

The aim of this work was to develop a broadly applicable *in vitro* regeneration and transformation method for pepper (*C. annuum* L.). Therefore, several parameters affecting regeneration and transformation were examined. The following investigations for the development of an efficient regeneration and transformation system were performed:

- (1) Twelve different pepper genotypes were analyzed with regard to their efficiency for regeneration and transformation *in vitro*.
- (2) The effects of the explant source for *de novo*-regeneration were investigated.
- (3) Optimized culture media for *in vitro* regeneration and transformation were developed.

The following results were obtained:

A highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of twelve pepper genotypes was established. The most successful genotype for regeneration was Conquistador. Cotyledons were identified as the most suitable tissues for *de novo* regeneration. Shoots were induced from tissue explants using MS basal medium supplemented with auxin and zeatin. Early transfer of initiated shoots to soil was of major importance for successful rooting and elongation of shoots. The time course of regeneration from tissue culture to mature plants was about eight months. Selfed regenerates were more than 95.0% fertile.

Transient gene expression was achieved for twelve genotypes using *A. tumefaciens* or particle bombardment. Reporter genes GUS and GFP were used to mark the progression of transformation. Putative transgenic tissues were analyzed by GUS-enzyme assay and using PCR. Among twelve different pepper genotypes Conquistador was the most suitable genotype with regard to its amenability for genetic transformation by *A. tumefaciens* while R113 was the most suitable genotype for particle bombardment. Cotyledons were identified as the most promising tissues for transformation: two days of pre-conditioning before inoculation with *Agrobacterium*, followed by co-cultivation on medium supplemented with DTT and Na-thiosulfate for two days. This increased the transformation efficiency slightly. Addition of acetosyringone during co-cultivation with *A. tumefaciens* extended reporter gene

expression in putative transformed tissues for up to four weeks after transformation and increased the frequency of GFP expression in tissue of cotyledons five to nine fold.

Within the framework of this investigation, the parameters for an efficient regeneration as well as for the transformation of explants of *C. annuum* L. could be developed. Although the conditions were optimized for regeneration, no transgenic plants could be produced, i.e. the frequency of regeneration of transgenic tissues was obviously lower than that of untreated (controls). By increasing of the number of explants, the regeneration of transgenic *C. annuum* L. may be achieved in the future.

Our procedure could be applied to other pepper cultivars and be used in genetic modifications of pepper aiming at improved resistance against pathogens or for "metabolic engineering".

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine anwendbare *In-vitro*- Regenerations- und Transformationsmethode für Paprika (*C. annuum* L.) zu entwickeln. Hierzu wurden eine Reihe die Regenerations- und Transformationsfähigkeiten wesentlich beeinflussenden Parametern untersucht.

Folgende Untersuchungen zur Entwicklung eines effizienten Regenerations- und Transformationssystems wurden durchgeführt:

- (1) Zwölf unterschiedliche Paprikagenotypen wurden hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für die Regeneration und Transformation geprüft.
- (2) Die Auswirkungen der Explantquelle auf die *de novo*-Regeneration wurden untersucht.
- (3) Optimierte Kulturmedien wurden für die *In-vitro*- Regeneration und Transformation entwickelt.

Folgende Resultate wurden erzielt:

Ein in hohem Maß effizientes Protokoll für die *In-vitro*-Regeneration von zwölf Paprikagenotypen wurde erarbeitet. Der erfolgreichste Genotyp für die Regeneration war Conquistador. Kotyledonen zeichneten sich als am Besten geeigneten Gewebe für die *de novo* Regeneration aus. Die Sprossbildung von Gewebeexplantaten wurde auf MS Medium, dem die Wachststoffe Auxin und Zeatin zugegeben wurden induziert. Ein frühzeitiges Umsetzen von induzierten Sprossen auf Sterilerde war von großer Bedeutung für die erfolgreiche Wurzelbildung und das Sprosselongationswachstum. Die Regeneration von Pflanzen aus der Gewebekultur dauerte ca. acht Monate. Regenerierte Paprika-Pflanzen besaßen eine Fruchtbarkeit von über 95.0%.

Durch Gentransfer mittels *A. tumefaciens* bzw. Partikelkanone wurde eine transiente Genexpression bei zwölf Genotypen erzielt. Die Reportergene GUS und GFP wurden genutzt, um die Weiterentwicklung der Transformation *in vitro* zu verfolgen. Mutmaßliche transgene Gewebe wurden durch GUS-Enzymtests an der Gewebekultur und mittels PCR analysiert. Unter zwölf unterschiedlichen Paprikagenotypen stellte sich Conquistador als am geeignetesten für die Transformation mit *A. tumefaciens* heraus, während Genotyp R113 mit einer Partikelkanone am besten transformiert werden konnte. Kotyledonen zeichneten sich als am besten geeignetes

Gewebe für die Transformation aus. Eine Vorkultur von zwei Tagen vor der Infektion mit *Agrobacterium* auf Medium mit DTT und Na-thiosulfat und eine spätere Co-Kultivierung auf dem gleichen Medium erhöhte die Transformationseffizienz geringfügig. Die Zugabe von Acetosyringone während der Co-Kultivierung mit *A. tumefaciens* verlängerte die Expression von Reportergenen auf bis zu vier Wochen nach der Transformation und erhöhte die GFP-Expressionsrate um das fünf bis neun fache.

In Rahmen der Untersuchungen konnten die Parameter für eine effiziente Regeneration von *C. annuum* L. sowie zur Transformation von Gewebe entwickelt werden. Obwohl die Bedingungen zur Regeneration optimiert wurden, konnten keine transgenen Pflanzen entwickelt werden, d.h. die Regenerationsfrequenz von transgenem Gewebe war offensichtlich niedriger als die der unbehandelten Kontrollen. Durch Erhöhung der Zahl der eingesetzten Explantate könnte in Zukunft die Regeneration von transgenen *C. annuum* L. erreicht werden.

Das entwickelte Verfahren könnte auch bei anderen Paprikagenotypen, bei der genetischen Modifizierung zur Verbesserung der Resistenz gegen Krankheitserreger und beim "metabolic engineering" von Paprika angewendet werden.