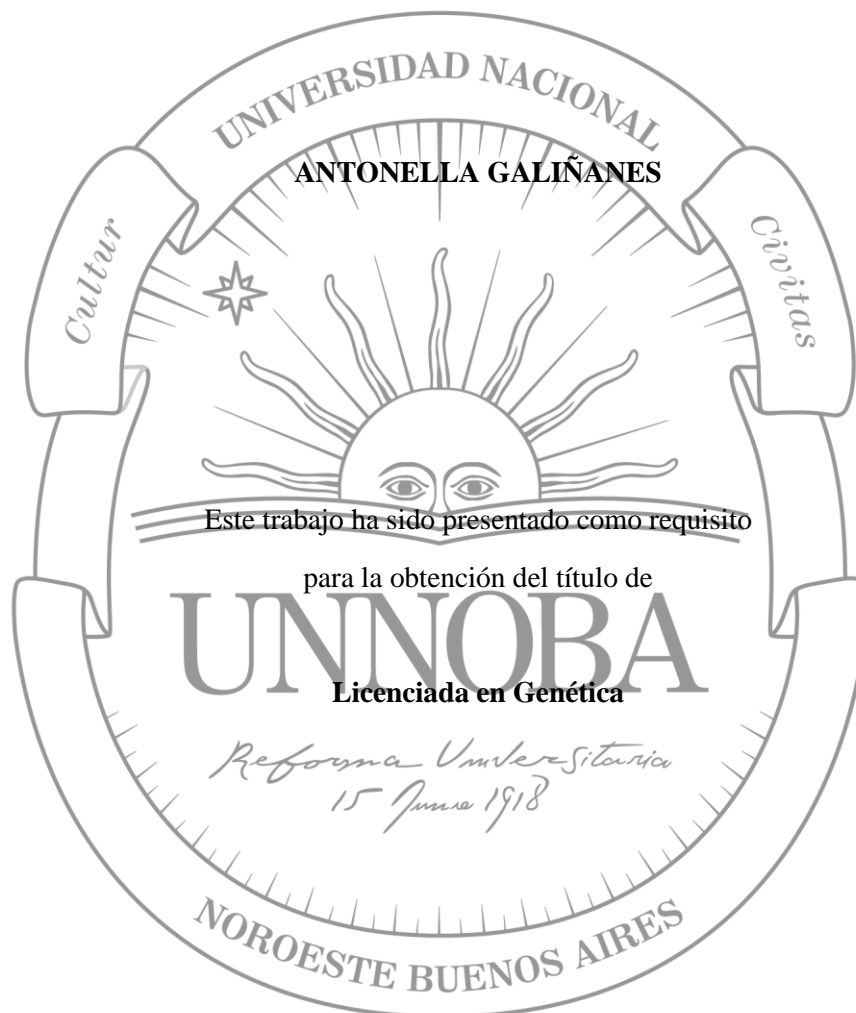


Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la mejora genética  
de *Prunus domestica*



**Licenciatura en Genética**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 15 de febrero de 2024

# Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la mejora genética de *Prunus domestica*

Trabajo Final de Grado  
de la alumna

**ANTONELLA GALIÑANES**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador/a**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador/a**

(Nombre y Apellido)  
**Evaluador/a**

FLORENCIA SORIA  
**Co-Directora**

GERARDO SANCHEZ  
**Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 15 de febrero de 2024

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han sido presentados en el *IX Encuentro Lationamericano Prunus Sin Fronteras* realizado en la provincia de Jujuy durante los días 12 al 14 de octubre de 2022.

“Soria F.E., Galiñanes A.E., Valentini G.H., Bossio A.E. and **Sánchez G.** (2022) “**Optimización de la transformación genética y regeneración de ciruelo europeo (*Prunus domestica*) cv D’Agen mediante un enfoque basado en DOE**”. *IX Encuentro Lationamericano Prunus Sin Fronteras*. San Salvador de Jujuy, Argentina.”



## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNNOBA, como institución pública, y a todo su personal Docente y No Docente, por todos estos años de formación, por guiarme y brindarme las herramientas necesarias para mi formación profesional.

Al CEBIO por habernos cedido tan gentilmente la lupa, fundamental para poder finalizar este trabajo.

A Flor y Gerardo, mis directores de tesina, por la confianza, la dedicación y el compromiso que tomaron para conmigo, por haberme formado no solo como profesional, sino también como persona. Gracias por la paciencia y el acompañamiento para que este trabajo se presentara. Siempre priorizaron mi aprendizaje y lo valoro muchísimo.

A INTA San Pedro, por haberme recibido en un contexto tan complicado. Y especialmente a todo el Team Duraznero, por la buena onda y todo su apoyo. Maxi, Juli, Ceci, Flor, Gerardo... fue hermoso haber trabajado con ustedes. Gracias por hacerme sentir parte desde el primer día, mi paso por este equipo fue de gran aprendizaje.

A Marian, Javier y a todo el equipo de Patología de la FVET, por haberme recibido en mi primera experiencia laboral. Gracias por haber confiado en mí de la manera en que lo hicieron. Los aprecio muchísimo.

A Miguel, quien me inspiró y motivó durante los años que trabajé en el almacén mientras cursaba.

Agradezco profundamente a toda mi familia, que me acompaña y apoya siempre en cada paso. A mis hermanos, por alentarme y cuidarme siempre. A mis amigas de Santa que me esperaron siempre con los brazos abiertos y me apoyaron a la distancia. A mi madrina, por su incondicionalidad todos estos años. A Jaz, amiga que me dejó la carrera, por hacer que su casa fuese la mía, por compartirme las milanesas de su abuela y su aguante incondicional. Y especialmente, a mi mamá Mechi. Por creer en mí, por el sacrificio para que pudiéramos estudiar lejos de casa, por ser mi pilar fundamental, por su amor e impulso constante en cada paso.

Fueron muchos los que me acompañaron en este camino. ¡¡Gracias de corazón!!

# ÍNDICE

RESUMEN .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	12
1.1 Transformación genética .....	15
1.1.1 Clonación.....	15
1.1.2 Métodos de transformación .....	17
1.1.3 Selección de transformantes .....	18
1.2 Factores que afectan la transformación mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	19
2 HIPÓTESIS .....	22
3 OBJETIVOS.....	22
4 Materiales y Métodos .....	23
4.1 Clonación del gen ptFT1 en vectores de expresión en plantas mediante sistema Gateway .....	23
4.1.1 Reacción de recombinación LR.....	24
4.2 Evaluación de sensibilidad a Higromicina de cotiledones de ciruelo 'D'Agén' .....	26
4.3 Optimización de la transformación.....	28
4.3.1 Vector pCAMBIA2301 .....	28
4.3.2 Transformación bacteriana .....	29
4.3.3 Evaluación del efecto de los antibióticos sobre el crecimiento de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	30
4.3.4 Ensayos de transformación.....	31
4.3.4.1 Preparación de inóculo bacteriano.....	31
4.3.4.2 Expresión transiente en hojas y puesta a punto de la tinción GUS.....	32
4.3.4.3 Ensayo de optimización de la transformación transiente en cotiledones.....	33
4.3.4.4 Detección y evaluación del gen <i>uidA</i> (GUS).....	35
5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
5.1 Obtención del vector recombinante pMDC32-ptFT1 .....	38
5.2 Evaluación de sensibilidad a Higromicina de cotiledones de ciruelo 'D'Agén' .....	41
5.3 Optimización de la transformación.....	44
5.3.1 Obtención de las cepas transformadas.....	44
5.4 Determinación de la sensibilidad a los antibióticos Timetina y Cefotaxima de <i>A. tumefaciens</i> transformada con pCAMBIA2301 .....	45
5.5 Transformación de hojas .....	47
5.6 Optimización de la transformación transiente en cotiledones .....	50
6 CONCLUSIONES .....	59

BIBLIOGRAFÍA .....	61
ANEXOS .....	67

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de un programa de mejora clásica de frutales basado en la realización de cruzamientos y selección .....	13
<b>Figura 2.</b> Ejemplo de la tecnología FASTRACK. ....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema de un vector de expresión en plantas. ....	15
<b>Figura 4.</b> Las reacciones de gateway. ....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
<b>Figura 5.</b> Mapa lineal de los vectores utilizados en la reacción de recombinación LR. ....	23
<b>Figura 6.</b> Esquema utilizado para la obtención del vector binario recombinante utilizando la tecnología de clonación GATEWAY®. ....	24
<b>Figura 7.</b> Región amplificada del pMDC32-ptFT1 con los cebadores 35S_pMDC32_ptFT1_F y NosTerm_R. ....	26
<b>Figura 8.</b> Desinfección de semillas de ciruelo. ....	27
<b>Figura 9.</b> Mapa del vector pCAMBIA2301. ....	29
<b>Figura 10.</b> Distribución de la siembra de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> para evaluar sensibilidad a Cefotaxima y Timetina. ....	31
<b>Figura 11.</b> Esquema del diseño experimental multifactorial para la optimización de la transformación transiente de cotiledones de ciruelo 'D'Agen' .....	35
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) de la extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> , luego de la transformación con la mezcla de la reacción LR. ....	38
<b>Figura 13.</b> Transformación de <i>A. tumefaciens</i> C58C1 con la extracción de plásmidos de <i>E. coli</i> . ....	39
<b>Figura 14.</b> Electroforesis en gel de agarosa para confirmar mediante pcr la presencia del vector recombinante pMDC32-ptFT1 en colonia de <i>A. tumefaciens</i> C58C1 aislada en medio selectivo. ....	40
<b>Figura 15.</b> Efecto de la concentración de higromicina sobre la regeneración <i>in vitro</i> de cotiledones 'D'Agen'. ....	43
<b>Figura 16.</b> Corroboración de la transformación de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> con el vector pCAMBIA2301 ....	46
<b>Figura 17.</b> Evaluación de la concentración (mg/l) de los antibióticos Timetina y Cefotaxima sobre el crecimiento de cinco cepas <i>A. tumefaciens</i> en medio LB sólido. ....	46
<b>Figura 18.</b> Hojas de ciruelo 'D'Agen'. ....	48
<b>Figura 19.</b> Análisis histoquímico de la expresión de GUS en cotiledones 'D'Agen' .....	50
<b>Figura 20.</b> Efecto de la OD y la aplicación de vacío sobre el N° de pixeles GUS + .....	52
<b>Figura 21.</b> Efecto de la OD y la aplicación de vacío sobre el N° de pixeles GUS + .....	53
<b>Figura 22.</b> Efecto de la OD y la aplicación de vacío sobre el promedio del porcentaje de área GUS+. ....	54
<b>Figura 23.</b> Esquema de la transformación por choque térmico de células químicamente competentes. ....	68



**Figura 24.** Procesamiento de las imágenes de cotiledones mediante el software ImageJ .. .....70

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resistencia a antibióticos de las cepas de <i>A. Tumefaciens</i> empleadas para la transformación bacteriana con el vector pCAMBIA2301. ....	30
<b>Tabla 2.</b> Factores evaluados en el ensayo de transformación transiente en hojas 'D'Agen' y sus respectivos niveles .....	32
<b>Tabla 3.</b> Factores evaluados en el ensayo de transformación transiente en cotiledones 'D'Agen', y sus respectivos niveles.....	34
<b>Tabla 4.</b> Análisis de Correlación de Pearson entre la concentración de Higromicina y los porcentajes de Regeneración, Necrosis, Blanqueamiento y Regeneración de brotes tipo II de cotiledones 'D'Agen'. ....	42
<b>Tabla 5.</b> Coeficientes de la ecuación de regresión estimada para las variables respuesta Porcentajes de regeneración, Necrosis, Blanqueamiento y Regeneración de brotes tipo II de cotiledones 'D'Agen'. ....	43
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la transformación transiente de hojas 'D'Agen' mediado por <i>A. Tumefaciens</i> C58C1. ....	48
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la transformación transiente de cotiledones 'D'Agen' mediado por <i>A. Tumefaciens</i> C58C1. ....	51
<b>Tabla 8.</b> ANOVA para la variable N° de pixeles GUS+ .....	53
<b>Tabla 9.</b> ANOVA para la variable Porcentaje de área GUS+.....	54
<b>Tabla 10.</b> ANOVA para la variable Promedio del porcentaje de área GUS+.....	54
<b>Tabla 11.</b> ANOVA para la variable Suma de promedios del porcentaje de áreas GUS+.....	56

## RESUMEN

---

El ciruelo europeo (*Prunus domestica L.*) es una de las especies más relevantes a nivel económico dentro de los frutales de Carozo, siendo la variedad 'D'Agen' la más cultivada en nuestro país. El mejoramiento clásico de los frutales de carozo se realiza mediante cruzamientos entre parentales seleccionados y la evaluación y selección de la progenie resultante. Si bien este enfoque ha permitido obtener variedades elite en casi todas las especies del género *Prunus*, presenta limitaciones entre las cuales se encuentran los extensos ciclos reproductivos y largos periodos juveniles, siendo de entre 5-6 años en ciruelo. A esto se suma el tiempo necesario para la expresión completa del potencial genético y la evaluación de caracteres en distintos ambientes, totalizando unos 12-15 años para obtener una nueva variedad. El desarrollo de herramientas biotecnológicas, como la transformación genética, podría permitir la obtención de variedades mejoradas de forma discreta en un plazo relativamente corto. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos por establecer protocolos eficientes de mejoramiento genético aplicables, en ciruelo europeo solo se han transformados unas pocas variedades y en la mayoría de los casos las eficiencias de transformación son bajas. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar herramientas biotecnológicas para la mejora de ciruelo europeo. Para lo cual se construyó el vector pMDC32-ptFT1 el cual permitirá, en un futuro, su utilización para la transformación genética de frutales como ciruelo y duraznero, con el fin de acortar sus ciclos reproductivos mediante la expresión del gen *ptFT1*. Se definió también 5 mg/l como la concentración de Higromicina a utilizar en la selección de transformantes en futuros ensayos de transformación de cotiledones 'D'Agen'. Se logró la transformación de diferentes cepas de *A. tumefaciens* con el vector pCAMBIA2301, sentando bases para futuros ensayos que permitan determinar y comparar su capacidad de transformación mediante la expresión de GUS en distintos tejidos. También se estableció la sensibilidad de las cepas a los antibióticos Cefotaxima y Timetina, siendo 100 mg/l y 75 mg/l respectivamente, las concentraciones que inhiben el crecimiento de las mismas. Se logró la transformación transiente de hojas y cotiledones de 'D'Agen'. En cotiledones se estudió el efecto del estado fisiológico de la bacteria, la sonicación y la aplicación de vacío, sobre la expresión transiente del gen GUS. Y si bien no se obtuvo un modelo estadísticamente significativo, se identificaron factores que afectan la expresión transiente de GUS. Este trabajo representa el primer reporte sobre la transformación transiente de hojas y cotiledones de la variedad 'D'Agen'.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

El género *Prunus* (familia *Rosaceae*) incluye varias especies de cultivos frutales de gran importancia económica, comúnmente llamados frutales de carozo. Estas especies son ampliamente cultivadas debido a las características organolépticas y el valor nutricional de sus frutas (Potter, 2012). Dentro de las más importantes de este grupo se encuentran *Prunus pérsica* (duraznero), *Prunus cerasus* (cerezos), *Prunus domestica* (ciruelo europeo), *Prunus salicina* (ciruelo japonés), *Prunus armeniaca* (damasco), entre otros (Kumar *et al.*, 2022).

En términos de importancia económica, las ciruelas ocupan el segundo lugar después del durazno y la nectarina (variedad de durazno de piel lisa) en la producción mundial de fruta de carozo, alcanzando alrededor de 12.600.000 toneladas, con un aumento del 20 % en la última década según datos de la FAO a partir de 2019 (Sottile *et al.*, 2022).

*Prunus domestica* L., conocida comúnmente como ciruela europea, es una especie alohexaploide ( $2n = 6x = 48$ ) cuya principal variedad comercial a nivel mundial es la D'Agen, destinada principalmente a la producción de ciruela pasa o deshidratada debido a su elevado contenido de azúcares y excelente sabor (Somogyi, 2005).

Argentina se posiciona como el cuarto productor mundial de ciruelas deshidratadas, detrás de Estados Unidos, Chile y Francia. La provincia de Mendoza se destaca como principal productora, con un 89% de la producción destinada a la exportación a países como Rusia, Alemania, Brasil y Japón. La variedad D'Agen y su clon 707 abarcan el 98% de la superficie implantada, lo que convierte a este rubro en un pilar de la economía regional (IDR, 2015).

Los objetivos actuales de mejora de este tipo de frutales se enfocan en la búsqueda de resistencia o tolerancia a estreses abióticos y bióticos, mejorar la calidad y aspecto de la fruta y reducir los costos de producción. Además, se busca ampliar el tiempo de disponibilidad de la fruta en el mercado y la adaptación al cambio climático (Sottile *et al.*, 2022).

El mejoramiento clásico de los frutales de carozo se realiza mediante cruzamientos entre parentales seleccionados y la evaluación y selección de la progenie resultante. Si bien este enfoque ha permitido obtener variedades elite en casi todas las especies del género *Prunus*, presenta limitaciones entre las cuales se encuentran los extensos ciclos reproductivos y largos periodos juveniles (3-4 años en duraznero y 5-6 en ciruelo) (Abbott *et al.*, 2008; Milošević & Milošević, 2018). A esto se suma el tiempo necesario para la expresión completa del potencial genético y la evaluación de caracteres en distintos ambientes, totalizando unos 12-15 años para obtener una nueva variedad (Figura 1).

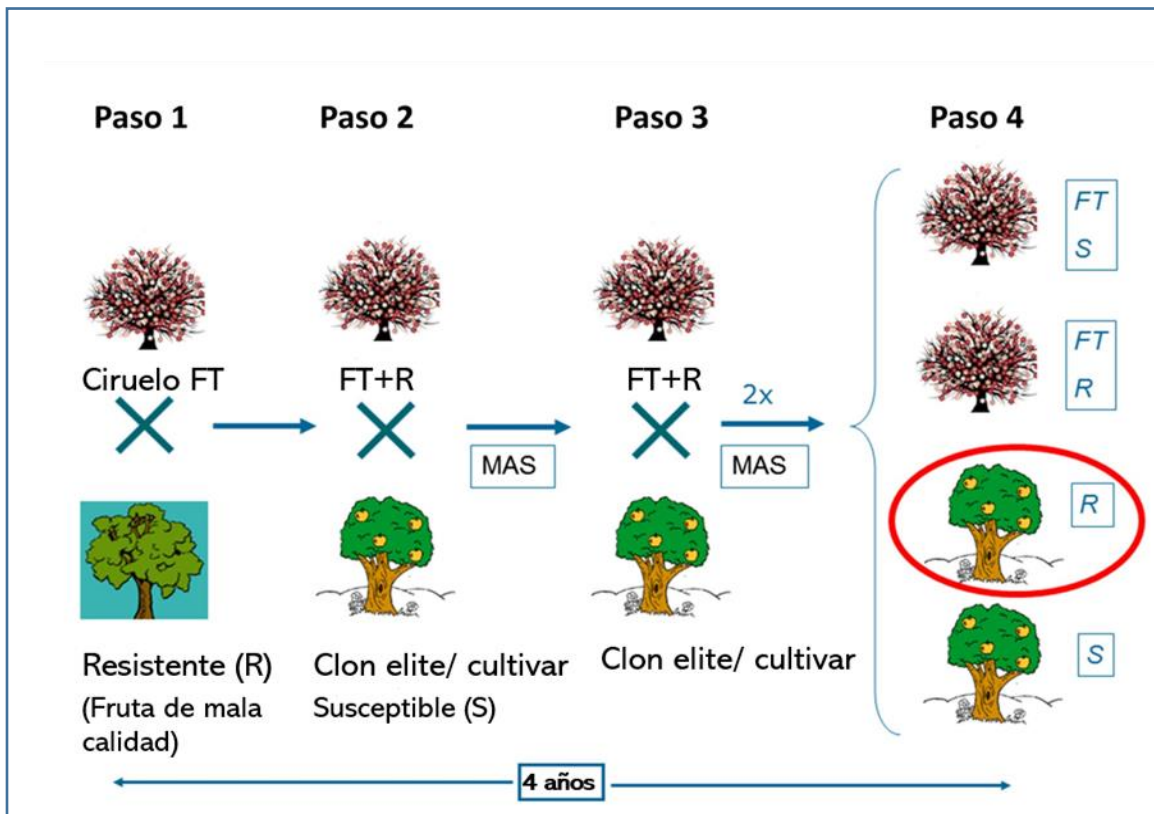


**Figura 1. Esquema de un programa de mejora clásica de frutales basado en la realización de cruzamientos y selección.** Fuente: Adaptada de Martínez-Gómez, 2017.

Debido a estas limitaciones, los programas de mejoramiento de frutales requieren de la utilización de tecnologías que aumenten la eficiencia del proceso. En este sentido, el empleo de herramientas biotecnológicas, como la transformación genética, permiten sortear dichas limitaciones al introducir genes entre especies emparentadas o no, confiriendo una nueva característica sin modificar ningún otro carácter al individuo. De esta manera, se evitan los sucesivos cruzamientos necesarios en el enfoque tradicional, acelerando así el proceso.

La transgénesis en frutales también se emplea como etapa intermedia para obtener líneas mejoradas. Un ejemplo es el sistema “Fastrack Breeding”, que introduce el gen *Flowering Locus T (FT)* para acelerar la floración. En ciruelos transformados, la sobreexpresión de *FT* de álamo (*Populus trichocarpa*) demostró alteraciones en la arquitectura, el requerimiento de dormancia y floración continua. Esto permite producir frutos en pocos meses,

reduciendo el ciclo de 3-7 años a menos de 1 año (Petri *et al.*, 2018). El mejoramiento con este sistema consta de 4 pasos principales (Figura 2).



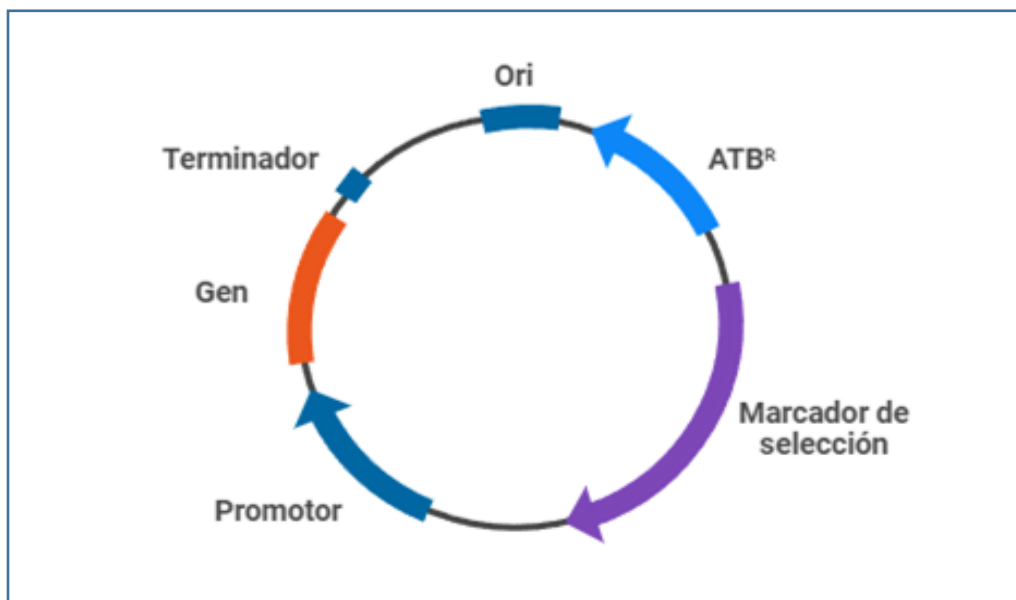
**Figura 2. Ejemplo de la tecnología FasTrack.** El esquema muestra un procedimiento para introducir un rasgo resistente a una enfermedad a un clon de elite o cultivar comercial. **Paso 1:** Se cruza una ciruela FT de floración temprana con un genotipo resistente (R). Entre la progenie de las ciruelas FT, se seleccionan los individuos resistentes utilizando la selección asistida por marcadores (MAS). **Paso 2:** Se cruzan los individuos resistentes y con FT y el tipo de ciruela deseado. **Paso 3:** Se realizan dos retrocruzas con el genotipo original utilizando MAS para seleccionar los rasgos deseados. **Paso 4:** Se selecciona la progenie resistente (R) con los rasgos originales deseados (círculo rojo). Los árboles resultantes no son transgénicos y pueden ser llevados a campo para la evaluación. Fuente: Petri *et al.*, 2018

Si bien la transgénesis confiere ventajas, es un proceso complejo con múltiples etapas: aislamiento del gen, construcción del *casette* de expresión, transferencia al genoma vegetal y sistemas de selección y regeneración de las células transformadas. En este último radica la mayor limitación para el género *Prunus*, ya que son recalcitrantes al cultivo *in vitro*, es decir que tienen poca tendencia a regenerar brotes a partir de células o tejidos cultivados *in vitro*, al igual que la mayoría de los frutales leñosos. Esto se refleja en la escasez de protocolos eficientes reportados a nivel mundial para estas especies (Petri *et al.*, 2018; Ricci *et al.*, 2020).

## 1.1 Transformación genética

### 1.1.1 Clonación

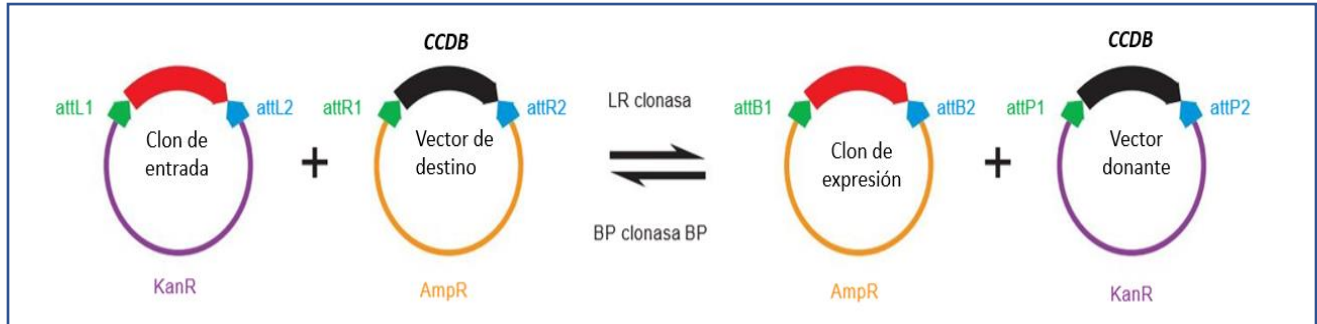
Para introducir un transgén en la planta, primero debe ser clonado, es decir insertado, en un vector o plásmido que funcionará como vehículo de transporte. En el vector se clona el *cassette* de expresión, que contiene la secuencia codificante del gen de interés y secuencias reguladoras independientes que dirigirán la expresión del transgén en la célula vegetal (Figura 3).



**Figura 3. Esquema de un vector de expresión en plantas.** Se muestran los diferentes elementos que componen el vector: el *cassette* de expresión, compuesto por el promotor, la secuencia codificante del gen y un terminador; Ori, origen de replicación en la bacteria; *ATB<sup>R</sup>*, gen de resistencia al antibiótico de selección; y marcador de selección.

Tradicionalmente, este procedimiento de clonación se basa en la digestión mediante enzimas de restricción, que reconocen y cortan secuencias específicas para generar un fragmento que luego se inserta en un vector mediante un proceso de ligación catalizado por la enzima ADN ligasa, que une los extremos del inserto y del vector. Desde hace un tiempo existen sistemas de clonación que permiten ensamblar múltiples fragmentos de ADN de forma precisa, eficiente y con orientación definida, superando las limitaciones de la clonación convencional. Un ejemplo es el sistema Gateway, basado en la recombinación específica del fago lambda.

La tecnología Gateway permite clonar, combinar y transferir fragmentos de ADN entre distintas plataformas de expresión, manteniendo la orientación y el marco de lectura. Consta de tres pasos: 1) Amplificación del gen por PCR; 2) Clonación del producto en un vector de entrada mediante recombinación, sin digestión/ligación (reacción BP); 3) Subclonación del gen desde el vector de entrada a uno de destino (reacción LR) (Traore & Zhao, 2011) (Figura 4).



**Figura 4. Las reacciones de Gateway.** El esquema muestra los cuatro tipos de plásmidos y mezclas de enzimas involucradas en las reacciones de clonación de Gateway. Las flechas rojas representan el fragmento de interés. Los términos clon de entrada, vector de destino, clon de expresión y vector donante son utilizados para distinguir los plásmidos de entrada y salida en las reacciones Gateway. Fuente: Katzen, 2007.

En la reacción BP, la mezcla de enzimas BP Clonasa II cataliza la transferencia de un fragmento de ADN flanqueado por dos sitios attB a un vector donante que contiene dos sitios attP. Luego de la recombinación entre estos sitios, el fragmento de ADN se inserta en el vector donante, creando un clon de entrada (pENTR) flanqueado por dos sitios attL. En la reacción LR, la mezcla de enzimas LR Clonasa II cataliza la transferencia del fragmento de ADN desde el clon de entrada (pENTR) a un vector de destino que contiene dos sitios attR. Luego de la recombinación entre los sitios attL y attR, el fragmento de ADN se inserta en el vector de destino (pDEST) (Karimi *et al.*, 2007). El producto de esta reacción LR es el clon de expresión, que lleva el gen de interés, y el vector donante, que en este punto se considera un subproducto de la reacción. De esta reacción se toma una alícuota para transformar células de *Escherichia coli* competentes. Para seleccionar las células que solo fueron transformadas con el clon de expresión, este sistema utiliza dos esquemas: primero, el clon de entrada y el vector de destino contienen diferentes genes de resistencia a los antibióticos (Kanamicina y Ampicilina en el ejemplo que se muestra en la Figura 4); en segundo lugar, el vector de destino contiene un marcador contra seleccionable, el gen *ccdB*, que destruye las células al inducir la rotura del ADN de doble cadena mediada por la enzima girasa. Las cepas de *E. coli* deben ser sensibles al efecto tóxico de *ccdB*, como lo es DH5 $\alpha$  (Traore & Zhao, 2011). Mientras que las cepas que mantienen los vectores destino que contienen el gen *ccdB* deben ser resistentes al mismo, como por ejemplo la cepa de *E. coli*



DB3.1. Con este esquema, al final del proceso, sólo quedan las células transformadas con el clon de expresión de interés.

### 1.1.2 Métodos de transformación

Para introducir el transgén en las células vegetales se han empleado diversas técnicas que se pueden clasificar en directas e indirectas, de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia del material genético hacia la célula vegetal (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012).

#### Técnicas directas

En las técnicas directas, el ADN ingresa al interior de la célula mediante la inducción de la permeabilidad de la membrana celular. Dentro de estas técnicas se encuentra la electroporación, que consiste en la aplicación de un campo eléctrico que induce un cambio en el potencial de membrana y la generación de microporos, lo que la hace permeable a moléculas de gran tamaño. Otra estrategia emplea polietilenglicol (PEG), un polímero que tiene la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana celular. Estas técnicas normalmente se utilizan en la transformación de protoplastos (Nkaa & Okpe, 2021).

La biobalística es una de las técnicas directas más utilizadas. Ésta se basa en la utilización de microproyectiles (tungsteno u oro) recubiertos del ADN que se desea transferir, los cuales son disparados sobre el tejido vegetal a alta velocidad atravesando la pared, la membrana celular y el núcleo. Cuando la partícula ha ingresado al núcleo de la célula, el ADN se libera y por recombinación se inserta en el genoma. Este método no requiere de ningún vector para la transferencia de genes y no depende del tipo de célula, especie y genotipo, pero presenta como desventaja ser muy agresivo con el tejido. Además, es frecuente la inserción de varias copias del ADN que pueden ir en tándem, lo que puede inducir silenciamiento génico del transgen (Chakraborty *et al.*, 2020).

#### Técnicas indirectas

Los métodos indirectos utilizan intermediarios biológicos para transferir el ADN deseado a las células vegetales. El método más utilizado es *Agrobacterium*, una bacteria Gram negativa patógena de plantas que tiene la capacidad natural de modificar genéticamente al huésped mediante la transferencia de un fragmento de su ADN al genoma de la planta infectada. El fragmento de ADN que se transfiere se conoce como región T-DNA, el cual contiene genes que promueven la producción de aminoácidos especializados llamados opinas, utilizadas como fuente de alimento para la bacteria, así como genes que codifican enzimas relacionadas con la ruta de síntesis de reguladores de crecimiento, como auxinas y citocininas, que mantienen a las células vegetales en activa división.

La región T-DNA se localiza en el plásmido Ti (inductor de tumores) de la bacteria. El plásmido Ti contiene varias regiones: un origen de replicación, la región Vir que contiene los genes de virulencia (genes *vir*) necesarios para transferir el T-DNA a la planta y la región T-DNA en sí. Esta última región está flanqueada por unos bordes

de 25 nucleótidos que son las secuencias reconocidas por la maquinaria de transferencia, denominados borde izquierdo (LB) y derecho (RB).

En cuanto a la capacidad de transferir ADN, las dos especies de *Agrobacterium* que se utilizan para la transformación vegetal son *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rizogenes*. La diferencia entre ellas radica en los genes que transfieren, lo que resulta en diferentes síntomas al infectar la planta. En el caso de *A. rizogenes* induce la proliferación de raíces adventicias dando lugar a la enfermedad denominada raíz en cabellera.

La infección del tejido vegetal por parte de *Agrobacterium*, está dada por reconocimiento de compuestos fenólicos (como la acetosiringona) que el tejido vegetal libera cuando se produce una herida en la planta. Estas moléculas señalan activan el proceso de patogénesis de la bacteria y provocan su movilización hacia el tejido dañado por quimiotaxia.

Para utilizar el mecanismo de *Agrobacterium* en la introducción de ADN en células vegetales, se han desarrollado vectores derivados del plásmido Ti. En estos vectores, los genes implicados en la síntesis de opinas y auxinas, que no son necesarios para la transferencia del T-DNA, son eliminados, dejando únicamente la región T-DNA (Valderrama *et al.*, 2005). Los genes *vir*, que codifican las proteínas encargadas de movilizar y transferir el T-DNA al genoma vegetal, no necesitan estar en el mismo plásmido que la región T-DNA para ser funcionales. Dado esto, y considerando el gran tamaño del plásmido Ti original de aproximadamente 20 kb, se han desarrollado estrategias para reducir el tamaño de estos vectores de transferencia. Entre los vectores que cumplen con estos requisitos, se encuentran los vectores de la serie pCAMBIA (Komori *et al.*, 2007). El vector pCAMBIA contiene la región T-DNA recombinante en un plásmido pequeño, que se utiliza en conjunto con un plásmido *helper* que contiene los genes *vir* necesarios para mediar la transferencia al genoma vegetal.

### 1.1.3 Selección de transformantes

Debido a que solamente un porcentaje muy bajo de células incorpora el transgén en el proceso de transformación, es necesario recurrir a algún método para poder distinguirlas y seleccionarlas de las células no transformadas. Como estrategia se utiliza la incorporación de genes en el vector de transformación que, al expresarse en la célula transgénica, puedan conferir una ventaja en un medio selectivo (genes marcadores de selección) respecto a las células no transformadas, o permitir una selección visual (genes reporteros) mediante cambios fenotípicos de los explantos transformados.

Entre los genes de selección se encuentran aquellos que confieren resistencia a agentes selectivos como antibióticos y herbicidas. Los más utilizados son el gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) y el gen de la Higromicina B fosfotransferasa (*hpt*); el primero confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos como la

Kanamicina, y el segundo al antibiótico Higromicina. Estos genes codifican enzimas que desintoxican los antibióticos a través de la fosforilación, lo que permite el crecimiento celular y la diferenciación de las células vegetales transformadas a brotes cuando estas son cultivadas en medios suplementados con estos agentes selectivos (Nyaboga *et al.*, 2014). En la selección de transformantes de *Prunus domestica*, se han utilizado tanto Kanamicina como Higromicina (Tian *et al.*, 2009).

Debido a que la respuesta del material vegetal a estos agentes puede variar según las condiciones de cultivo, el genotipo o el tipo de explanto (Gonzalez Padilla *et al.*, 2003), es fundamental determinar la sensibilidad del material a los agentes de selección previo al procedimiento de transformación. Una dosis subóptima podría dar como resultado la aparición de escapes (brotes no transformados) y, por otro lado, una concentración alta del antibiótico podría inhibir el crecimiento de las células transformadas.

En cuanto a los marcadores visuales más utilizados, denominados genes reporteros, se encuentran los genes *uidA* y *gfp*. El gen *uidA*, más conocido como gen *gus*, codifica para la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que degrada el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ glucurónido (X-Gluc) produciendo un precipitado de color azul de fácil detección. La expresión de este gen permite el monitoreo a corto plazo de la transformación genética, mediante una reacción histoquímica. Esta prueba de expresión transiente se utiliza como base para la estandarización de protocolos de transformación (Song *et al.*, 2011)

En cuanto al gen *gfp*, éste codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) que, al expresarse en la célula vegetal transformada, emite fluorescencia verde cuando se expone a luz ultravioleta. A diferencia de *gus*, que su detección implica la destrucción del tejido, *gfp* permite conservar vivo el material en estudio, lo que representa una herramienta útil para visualizar diferentes etapas del proceso de transformación (Joshi *et al.*, 2005).

## **1.2 Factores que afectan la transformación mediada por *A. tumefaciens***

El desarrollo de un protocolo de transformación mediado por *A. tumefaciens* en especies como las del género *Prunus*, requiere la identificación de los factores que influyen tanto en la transformación genética así como en la regeneración de una planta entera a partir del tejido vegetal transformado. Entre los factores que pueden tener un efecto significativo sobre la obtención de tejido vegetal transformado genéticamente se encuentran: la variedad y el tipo de explanto a transformar, la cepa de *A. tumefaciens*, el método de inoculación, el estado fisiológico y la densidad bacteriana en la inoculación, el tiempo de co-cultivo, la presencia de compuestos como la acetosiringona, concentración del agente de selección, entre otros (Canli & Tian, 2009; Wang, 2011).

En cuanto al tipo de explanto, se pueden utilizar dos clases: material juvenil (tejidos derivados de semillas como cotiledones e hipocótilos) o material adulto (por ejemplo, hojas o segmentos nodales) (Ricci *et al.*, 2020). La regeneración a partir de tejidos somáticos adultos se recomienda particularmente para cultivos de propagación

clonal con el objetivo de mantener la estabilidad genética del clon (Song *et al.*, 2019). Sin embargo, la mayoría de los procedimientos de transformación descritos para *Prunus* spp. (incluyendo durazno, ciruela europea y ciruela japonesa) implican el uso de explantos derivados de semillas, debido a que estos explantos generalmente tienen tendencia a producir brotes *in vitro* (Petri *et al.*, 2018).

En la transformación de ciruelo europeo se han empleado distintas cepas, incluyendo LBA4404, EHA101, EHA105 y GV3101 (Song *et al.*, 2011), y se ha informado que la efectividad de la transformación puede variar significativamente en función de la cepa empleada. Song *et al.* (2011) reportaron diferencias en la transformación de ciruela (tanto en transformación transiente como transformación estable) entre las cepas LBA4404 y GV3101, ambas con construcciones idénticas. Los resultados mostraron que la eficiencia de la cepa LBA4404 fue 22 veces mayor que GV3101 en la transformación estable de ciruelas, por lo que sugieren que la cepa debe considerarse cuidadosamente para la transformación de diferentes variedades de ciruela.

Además de la cepa, la fase de crecimiento y la concentración del inóculo bacteriano (expresadas en términos de Densidad óptica OD<sub>600</sub>) pueden considerarse como otros de los factores que influyen en la transformación. La fase de crecimiento más utilizada es la logarítmica o exponencial, donde las bacterias se dividen rápidamente y la OD<sub>600</sub> se encuentra entre 0.2 y 1.0 aproximadamente (Gonzalez padilla *et al.*, 2003). Una OD<sub>600</sub> muy por encima de 1.0 indica fase de latencia/declive con alto porcentaje de células muertas, no recomendada para la transformación. En cuanto a la concentración de la bacteria al momento de inocular el explanto, se ha documentado un incremento en la eficiencia de transformación conforme el valor de la densidad óptica disminuyó (Yu *et al.*, 2002). Este efecto podría relacionarse a la necrosis producida en el explanto debido a la cantidad excesiva de células bacterianas.

Se han desarrollado distintos métodos de inoculación para el ingreso de la bacteria al interior de los explantos, siendo la inmersión el más frecuente en *Prunus* spp., donde el explanto se sumerge en una suspensión de *A. tumefaciens* durante un tiempo que puede variar entre 20 a 60 min (Gonzalez padilla *et al.*, 2003). Otras metodologías incluyen, además, la generación de heridas en el tejido para permitir el acceso de la bacteria a las células vegetales. Miguel & Oliveira (1999) han transformado hojas de *Prunus dulcis* realizando cortes perpendiculares a la nervadura utilizando un bisturí previamente sumergido en una suspensión de *A. tumefaciens*. La aplicación de sonicación se ha utilizado para producir heridas en el tejido, donde sola o combinada con infiltración al vacío ha permitido mejorar la eficiencia de transformación en muchas especies de plantas, especialmente aquellas que son recalcitrantes a la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Pérez Caselles *et al.* (2011) obtuvieron valores más altos de transformación cuando se aplicó sonicación durante 30 s más infiltración al vacío durante la infección de hipocótilos de damasco. Sin embargo, la sonicación puede causar daño celular. En este sentido, Gao and Tao (2014) probaron diferentes tiempos de sonicación en transformación de cotiledones de

*Prunus mume*, encontrando que los explantos mostraron daños graves después del tratamiento; por lo que es necesario poner a punto el tratamiento para cada especie.

En cuanto al período donde se cultiva el explanto con la bacteria, etapa de co-cultivo, el tiempo estándar para la mayoría de los protocolos de transformación es de 2-3 días. Periodos más prolongados de co-cultivo no son recomendables ya que promueven un crecimiento bacteriano excesivo, lo cual puede ser perjudicial para las células vegetales. Ainsley *et al.* (2001) demostraron que tiempos de co-cultivo mayores a 3 días resultaron en una colonización masiva de *A. tumefaciens*, causando necrosis en los tejidos que luego afecta su capacidad regenerativa y de transformación.

Luego del co-cultivo, es necesario eliminar las células bacterianas residuales para evitar sobrecrecimiento y permitir la regeneración del tejido vegetal. Los antibióticos Cefotaxima y Timetina son comúnmente utilizados para este fin. La concentración debe optimizarse para cada combinación tejido vegetal/cepa bacteriana, ya que dosis subletales permitirían la supervivencia de *A. tumefaciens* mientras que dosis muy altas pueden resultar fitotóxicas e inhibir la regeneración.

La adición de acetosiringona durante la inoculación y co-cultivo de los explantos con *A. tumefaciens* fue reportado como un potenciador de la eficiencia de transformación. Esto se debe a que la acetosiringona estimula la transcripción de los genes *vir* facilitando la transferencia del T-DNA (Tzfira y Citovski 2006). En especies de *Prunus* como el damasco (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992) y el almendro (Miguel & Oliveira, 1999), se ha observado un efecto potenciador de la acetosiringona durante la transformación mediada por *A. tumefaciens*.

En ciruelo europeo las eficiencias de transformación se han reportado con una ocurrencia desde 0,4 % (Padilla *et al.*, 2013) hasta 42 % (Petri *et al.*, 2008) de explantos transformados. Asimismo, los factores mencionados previamente han sido reportados como influyentes en la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Por lo tanto, aquellos protocolos que busquen optimizar la eficiencia de transformación deben estudiar dichos factores en un diseño experimental que permita evaluar el efecto individual de cada factor y la interacción entre ellos, con el objetivo final de definir la mejor combinación de factores que maximice la transformación.

En este trabajo, se busca construir vectores para la transformación genética, así como poner a punto la transformación genética transiente de cotiledones de ciruelo europeo 'D' Agen' mediante la identificación de factores claves que influyen en la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Se estudió el efecto del estado fisiológico de la bacteria, la sonicación y la aplicación de vacío, sobre la expresión transiente del gen GUS. La estandarización de un protocolo reproducible y de alta eficiencia permitiría acelerar los programas de mejoramiento genético en esta especie para obtener nuevos cultivares elite con características agronómicas deseadas.

## 2 HIPÓTESIS

---

La aplicación de vacío y sonicación durante la infección con *A. tumefaciens* C58C1, así como la adición de acetosiringona al medio de co-cultivo, potenciarán la transformación transiente de cotiledones de *Prunus domestica* cv. 'D'Agen'.

## 3 OBJETIVOS

---

### Objetivo general

Optimizar la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* C58C1 de cotiledones de ciruelo europeo 'D'Agen' y desarrollar un vector para la transformación genética de esta especie que incorpore la tecnología Fastrack Breeding, para obtener nuevas variedades con características deseables en un menor tiempo.

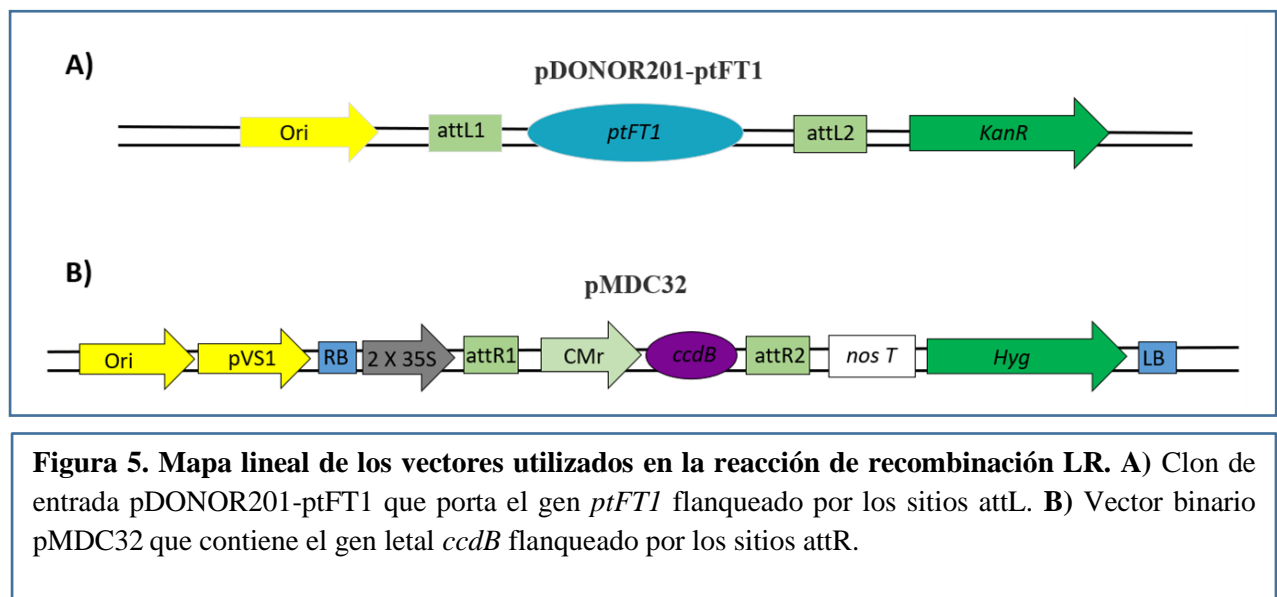
### Objetivos específicos

- I. Clonar el gen *ptFT1* en un vector de expresión en plantas.
- II. Evaluar el efecto de la concentración de Higromicina sobre la regeneración *in vitro* de brotes en cotiledones 'D'Agen'.
- III. Determinar la sensibilidad a Cefotaxima y Timetina de *A. tumefaciens*.
- IV. Determinar el efecto individual e interactivo de la aplicación de vacío, sonicación y acetosiringona sobre número de explantos transformados y el número de eventos de transformación por explanto, en un ensayo de optimización de transformación transiente de cotiledones de ciruelo 'D'Agen'.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

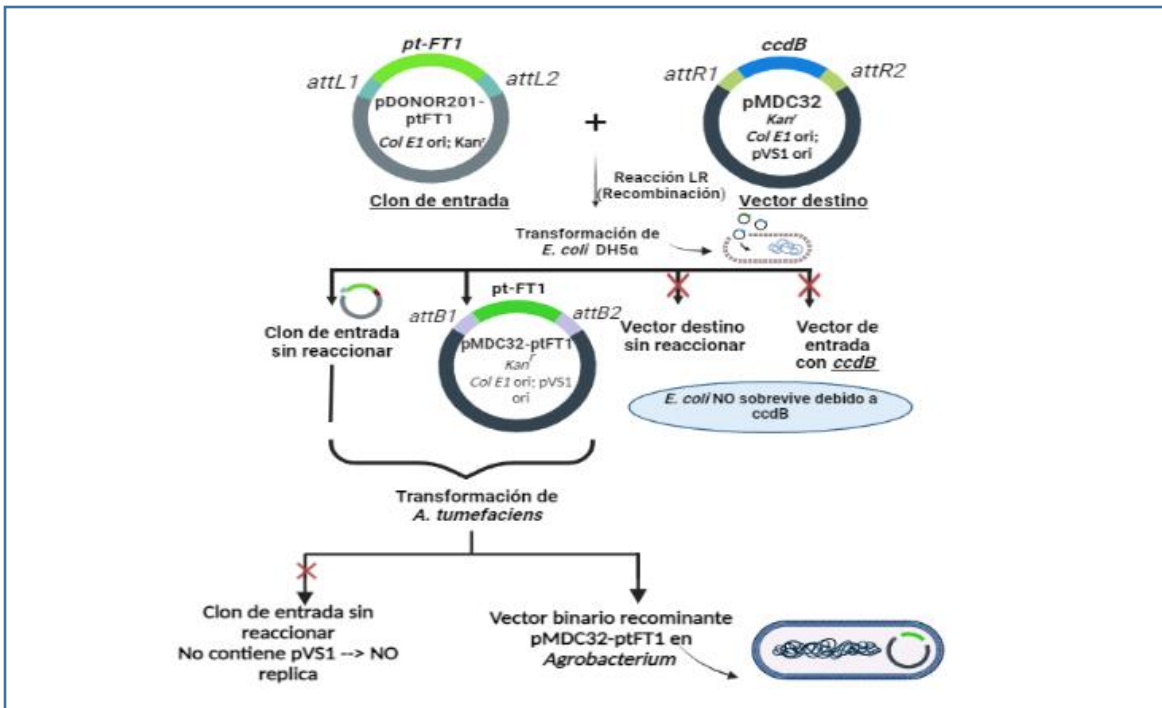
### 4.1 Clonación del gen *ptFT1* en vectores de expresión en plantas mediante sistema Gateway

Para poder introducir el gen *ptFT1* en el vector de expresión en plantas pMDC32, se realizó la reacción de recombinación LR del sistema GATEWAY entre el clon de entrada pDONOR201-*ptFT1* (cedido por Ove Nilsson, Plant Umeå Plant Science Centre, Suecia), y el vector destino pMDC32 (Curtis & Grossniklaus, 2003). El diagrama esquemático de los vectores empleados se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Mapa lineal de los vectores utilizados en la reacción de recombinación LR. **A)** Clon de entrada pDONOR201-*ptFT1* que porta el gen *ptFT1* flanqueado por los sitios attL. **B)** Vector binario pMDC32 que contiene el gen letal *ccdB* flanqueado por los sitios attR.

Debido a que el vector de entrada y destino presentaban el mismo marcador de selección bacteriana (Kanamicina, Km), el vector recombinante de interés se aisló siguiendo la estrategia descrita por Xu & Li (2008), que aprovecha el hecho de que los vectores utilizados poseen diferentes orígenes de replicación. El vector binario pMDC32 contiene los orígenes de replicación *Col E1* y *pVS1* para *E. coli* y *A. tumefaciens*, respectivamente. Por el contrario, el vector pDONOR-*ptFT1* solo puede replicarse en *E. coli*. La estrategia empleada se detalla en la Figura 6.



**Figura 6. Esquema utilizado para la obtención del vector binario recombinante utilizando la tecnología de clonación Gateway®.** Col E1 ori: origen de replicación para *E. coli*. pVS1 ori: origen de replicación para *Agrobacterium*. *Kan<sup>r</sup>*: gen de resistencia a Kanamicina. RB: borde derecho de T-DNA. LB: borde izquierdo de T-DNA. att L, att R, att B: sitios de recombinación. *ccdB*: gen *ccdB* de *E. coli*. Fuente: adaptado de Xu & Li (2008).

#### 4.1.1 Reacción de recombinación LR

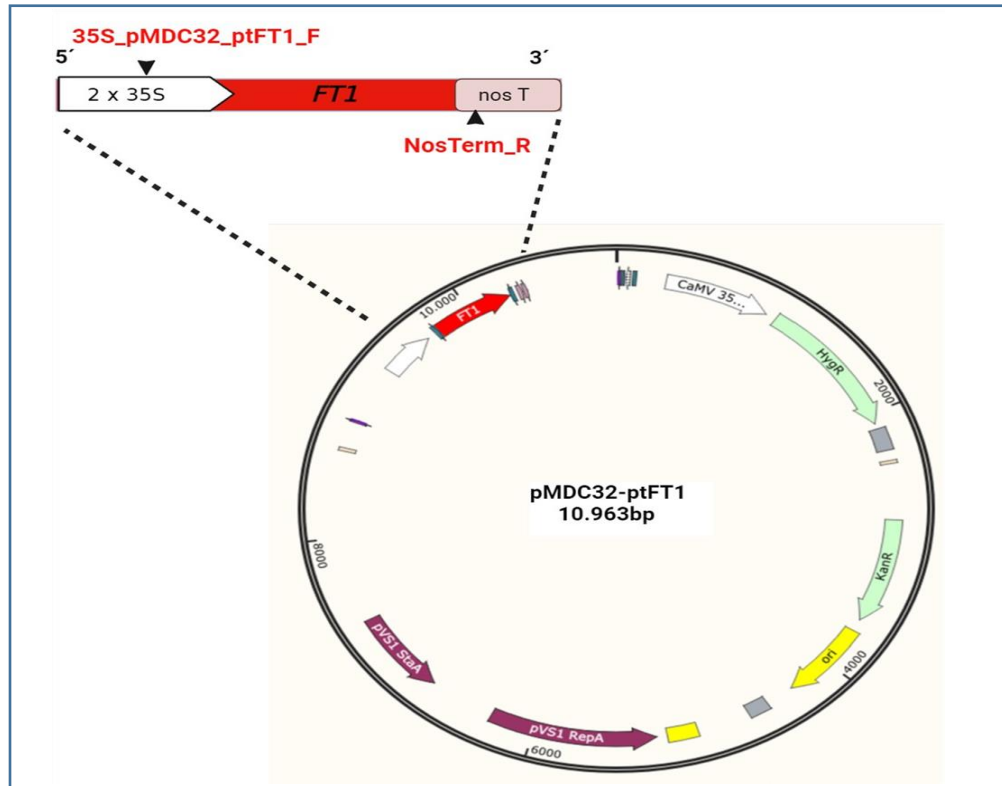
En un microtubo de 200 µl se añadieron, a temperatura ambiente (TA), 0,5 µl del clon de entrada pDONOR201-ptFT1, 1,5 µl del vector destino pMDC32, 6 µl de buffer TE (pH= 8,0). Se adicionó 2 µl de enzimas LR Clonase™, se mezcló brevemente en vórtex y se incubó en termociclador a 25 °C durante 1 h. Luego, para detener la reacción, se añadió 1 µl de la proteinasa K, se mezcló brevemente y se incubó a 37 °C durante 10 min. De esta mezcla de reacción se tomaron 2 µl para transformar mediante choque térmico (Anexo 2) 100 µl de células químicamente competentes de *E. coli* DH5α. Posteriormente, las células se suspendieron en medio LB líquido suplementado con Km (50 mg/l) y se incubaron a 37 °C *overnight* (ON). La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante un kit de extracción (High-Speed Plasmid Mini Kit, Geneaid) siguiendo las instrucciones del fabricante y se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) teñido con Bromuro de Etidíio (BrEt) a una concentración final de 0,5 µg/ml. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 10 min a 90 voltios (V) más 45 min a 65 V. Transcurrido ese tiempo, el gel fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta (GeneFlash, Syngene) y se realizó registro fotográfico para su posterior interpretación. En este punto se esperaba



obtener el siguiente patrón de bandeo correspondiente a la mezcla de vectores: pDONOR201-ptFT1 sin reaccionar de 2000 pb y el vector de expresión recombinante pMDC32-ptFT1 de 10.963 pb.

Para seleccionar el clon de expresión recombinante, se transformaron células químicamente competentes de la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* con 5 µl de la mezcla de ADN plasmídico extraída del cultivo líquido de *E. coli*, siguiendo la metodología descrita en el Anexo 2. Al cabo de aprox. 48 h de incubación a 28 °C, se seleccionó una de las colonias que crecieron en medio selectivo LB suplementado con Tetraciclina (Tc) 2,5 mg/l y Km 50 mg/l y se realizó un cultivo líquido en agitación ON con el objetivo de extraer el plásmido recombinante de interés y criopreservar las bacterias transformantes a -80 °C en glicerol al 20 %.

La corroboración de la extracción de ADN plasmídico de interés de *A. tumefaciens* se realizó mediante electroforesis como se describió previamente para *E. coli*. Posteriormente, se realizaron PCRs (convencionales y *Colony* PCRs) para confirmar la presencia del vector pMDC32-ptFT1 utilizando los cebadores directo 5' TCATTTTCATTTGGAGAGGACCTC3' y reverso, 5'GCGCTATATTTTGTTTTCTATCG3' que amplifican un fragmento de 1263 pb (Figura 7). Como control positivo se utilizó el vector pMDC32-OLE, que contiene un fragmento en el sitio de clonado (Sánchez *et al.*, resultados no publicados) esperando un amplicón de 1900 pb con los cebadores directo y reverso utilizados para la amplificación de pMDC32-ptFT1.



**Figura 7. Región amplificada del pMD32-ptFT1 con los cebadores 35S\_pMDC32\_ptFT1\_F y NosTerm\_R. Mediante este par de cebadores se obtiene un producto de amplificación de 1263 pb.**

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l conteniendo 1 X buffer Taq Pegasus (provisto por el fabricante de la enzima, PB-L), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,2  $\mu$ M cebador forward, 0,2  $\mu$ M cebador reverse, 2,5 U enzima Taq polimerasa (TAQ Pegasus), 0,5  $\mu$ l de ADN plasmídico y  $H_2O$  para llevar a volumen. En cuanto a las Colony PCRs, la técnica consistió en recolectar, con un palillo estéril una colonia crecida en medio selectivo y utilizarla como templado en la reacción. El programa de amplificación consistió en un ciclo a 95  $^{\circ}C/5$  min, 35 ciclos de 94  $^{\circ}C/30$  s; 47  $^{\circ}C/30$  s; 72  $^{\circ}C/2$  min; y un ciclo de extensión final de 72  $^{\circ}C/10$  min.

## 4.2 Evaluación de sensibilidad a Higromicina de cotiledones de ciruelo 'D'Agen'

### Preparación del explanto

Se recolectaron frutos maduros de ciruelo 'D'Agen' localizado en la EEA San Pedro del INTA durante el mes de enero 2022. Los carozos separados de la pulpa fueron desinfectados superficialmente mediante inmersión en 1,2 g/l hipoclorito de sodio durante 45-60 min. Posteriormente, se colocaron sobre papel secante a TA y, una vez secos, fueron almacenados a 4  $^{\circ}C$  hasta su empleo.

Las semillas se extrajeron de los carozos con ayuda de una pinza y la desinfección superficial se realizó por inmersión en hipoclorito de sodio 1,2 g/l durante 20 min y agitación constante. Luego, fueron llevadas a cámara de flujo laminar donde se realizaron cinco lavados con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril (H<sub>2</sub>Od), eliminando así el resto de los compuestos químicos (Figura 8). Las semillas se mantuvieron en H<sub>2</sub>Od ON y al día siguiente con ayuda de un bisturí se eliminó el tegumento y se separó el hipocótilo del cotiledón.



**Figura 8. Desinfección de semillas de ciruelo.** A) Extracción de la semilla del carozo. B) Desinfección en una solución de hipoclorito de sodio en agitación. C) Lavado en H<sub>2</sub>Od en cámara de flujo horizontal.

### **Preparación de medios y evaluación de la regeneración de brotes en medio selectivo**

El protocolo de inducción de brotes a partir de cotiledones consistió en la utilización de dos medios de cultivo SRM (del inglés *Shoot Regeneration Medium*): i) SRM con 2,4-D y ii) SRM sin 2,4-D. El medio SRM con 2,4-D estaba formulado por sales de medio MS  $\frac{3}{4}$  X ( $\frac{3}{4}$  MS, Murashige & Skoog, 1962), vitaminas MS 5 X, sacarosa 20 g/l, agar 6,5 g/l (BRITANIA®, CABA, Argentina), pH 5,8 y los reguladores de crecimiento vegetal (RCV): tiazurón (TDZ) 75  $\mu$ M, ácido indol-3-butírico (IBA) 0,25  $\mu$ M y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) 9  $\mu$ M. La composición del SRM sin 2,4-D era similar al SRM con 2,4-D con la excepción de no estar suplementado con 2,4-D y tener una concentración final de agar a 9 g/l. El pH de los medios se ajustó previo a la esterilización del medio en autoclave a 121 °C y a 1 atmósfera de presión durante 20 min. En cuanto a los RCV, por tratarse de compuestos termolábiles, éstos se filtraron empleando un filtro de jeringa de 0,20  $\mu$ m y se agregaron al medio posterior a la esterilización del mismo.

Los cotiledones se dispusieron en placas de Petri con la superficie adaxial en contacto con el medio SRM con 2,4-D y fueron mantenidos en el mismo durante tres días en cámara de cultivo a  $24 \pm 2$  °C y un régimen diario de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Transcurrido este tiempo, los cotiledones se transfirieron al medio SRM sin 2,4-D, suplementado con distintas concentraciones del antibiótico Higromicina (Hyg) para determinar la concentración mínima a la cual se inhibe la regeneración *in vitro* de brotes en medio selectivo. Los tratamientos quedaron definidos por seis concentraciones de Hyg: 0; 1,5; 2,5; 5; 10; y 20 mg/l (Tian et al.,2009), cuyas unidades experimentales consistieron en una placa de Petri con 25 ml de medio y un n= 20 cotiledones.

Los brotes regenerados fueron clasificados en dos tipos: brotes tipo I y brotes tipo II. Esta clasificación se realizó en base al conocimiento previo del grupo de biotecnología sobre la regeneración *in vitro* de ‘D’Agen’, en la que generalmente los brotes tipo II son los que progresan en las etapas posteriores, a la inducción de brotes, en el cultivo *in vitro*. Por este motivo, se analizó particularmente el efecto de la Hyg en la regeneración de brotes tipo II. Asimismo, se evaluó el efecto de la Hyg, sobre tres variables respuesta asociadas a la regeneración de brotes en condiciones *in vitro* en medio selectivo: i) porcentaje de brotación (N° de explantos con brotes/ N° de explantos totales), ii) porcentaje de explantos necrosados y iii) porcentaje de explantos blanqueados. La evaluación se realizó a los 28 días luego de iniciado el ensayo.

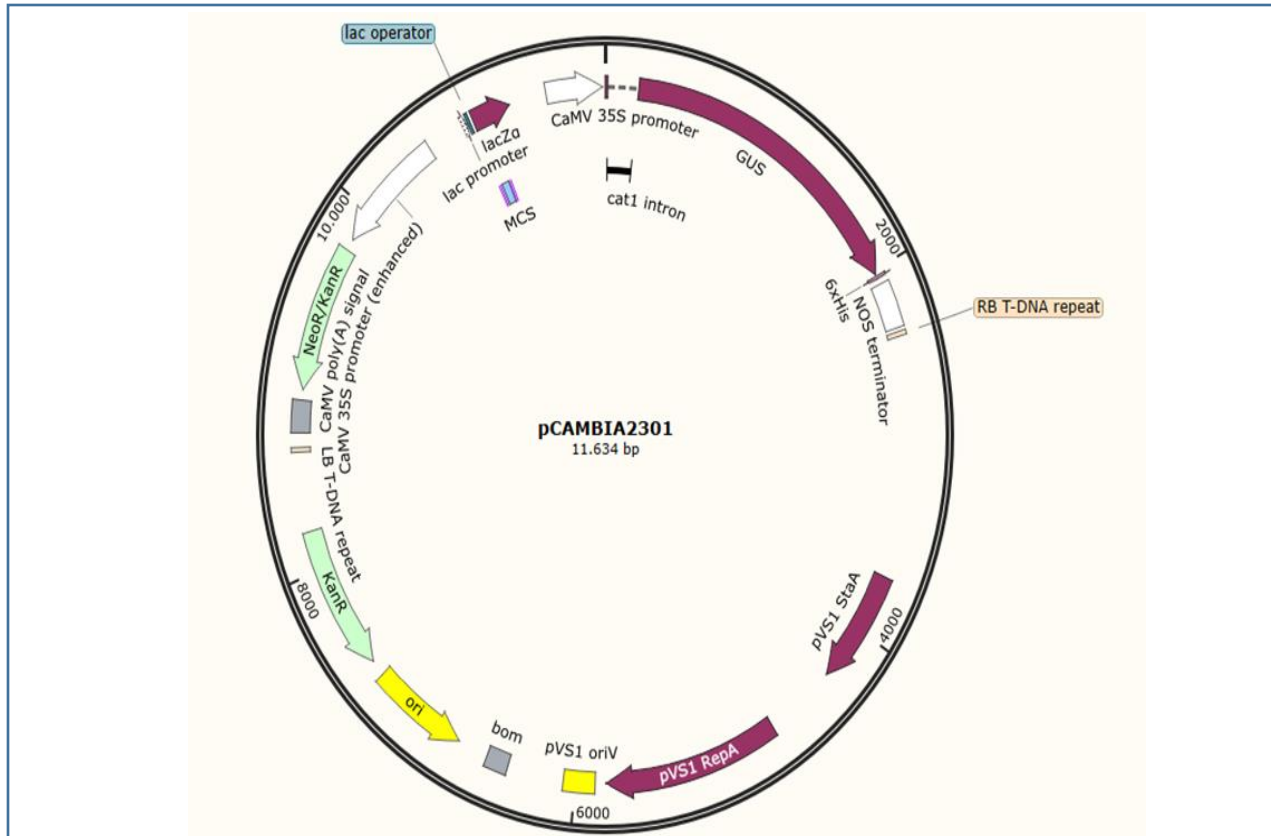
### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para evaluar la asociación entre la variable independiente concentración de Higromicina (ccHyg) y las variables respuestas: porcentaje de regeneración, porcentaje de explantos necróticos (oxidados) y porcentaje de explantos blanqueados. También se ajustaron modelos de regresión lineal simple para evaluar el efecto de la ccHyg sobre cada una de las variables respuesta. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.* 2020).

## **4.3 Optimización de la transformación**

### **4.3.1 Vector pCAMBIA2301**

Para la transformación de cotiledones de ciruelo se utilizó el vector binario pCAMBIA2301 que contiene el gen reportero *GUS* (*uidA*), el promotor constitutivo CaMV 35S, el terminador de nopalina sintasa (NOS), el promotor lacZa y genes de selección de Kanamicina *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) tanto para bacterias como para plantas (Figura 9).



**Figura 9. Mapa del vector pCambia2301.** Se muestran los diferentes elementos que componen la región T-DNA: Bordes izquierdo (LB) y derecho (RB); CaMV 35S promoter: promotor constitutivo del virus del mosaico del coliflor; *NeoR/KanR*: gen que confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos en plantas; NOS term: Terminador de la nopalina sintasa; *GUS*: gen que codifica la enzima  $\beta$ -glucoronidasa. Por fuera de la región T-DNA se encuentra el gen *KanR*, que confiere resistencia a Kanamicina en bacterias.

### 4.3.2 Transformación bacteriana

Uno de los factores que influye en la eficiencia de la transformación mediada por *A. tumefaciens* es la cepa (Song *et al.*, 2011). Para seleccionar aquella con la que se iban a realizar los experimentos de transformación genética de explantos de ‘D’Agen’ (sección 4.4), se decidió transformar cinco cepas de *A. tumefaciens* (Tabla 1) con el vector pCambia2301 aislado previamente. Asimismo, se transformó la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* que luego se criopreservó en glicerol al 20 % (v/v) a -80°C con el objetivo de conservar el vector por largos períodos de tiempo en una cepa con elevada tasa de replicación de ADN plasmídico.

**Tabla 1. Resistencia a antibióticos de las cepas de *A. tumefaciens* empleadas para la transformación bacteriana con el vector pCAMBIA2301.**

<b>Cepa</b>	<b>Resistencia</b>	<b>Concentración (mg/l)</b>
<b>LBA4404</b>	Rifampicina	40,0
	Estreptomicina	40,0
<b>C58C1</b>	Tetraciclina	2,5
<b>GV3101</b>	Rifampicina	40,0
	Gentamicina	40,0
<b>EHA105</b>	Rifampicina	40,0
<b>AGL1</b>	Ampicilina	100,0

Para llevar a cabo la transformación bacteriana se utilizó la metodología de choque térmico de células químicamente competentes obtenidas con CaCl<sub>2</sub> (Anexo 3). Se utilizó 10 µl de la extracción del plásmido pCAMBIA2301 para transformar las cepas de *A. tumefaciens* y 5 µl para *E. coli*. La selección de las colonias bacterianas que incorporaron el plásmido de interés (transformantes) se realizó haciendo crecer las bacterias en medio LB con Km 50 mg/l.

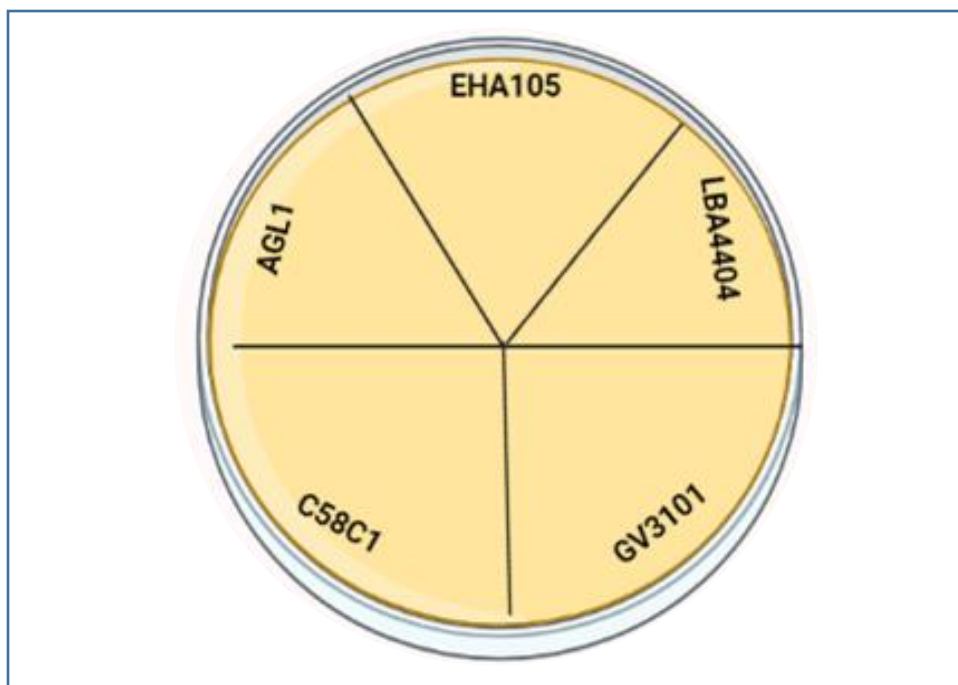
#### **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se realizó una *Colony* PCR para confirmar la presencia del vector pCAMBIA2301 en las colonias crecidas en el medio selectivo utilizando un par de cebadores específicos para el gen *nptII* que generan un amplicón de 260 pb (*forward* 5'-CTGGACGAAGAGCATCAGGG-3' y *reverse* 5'-TAAAGCACGAGGAAGCGGTC-3'). Como control negativo se utilizaron las cepas "vacías", es decir, aquellas que no estaban provistas del vector pCAMBIA2301. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl con 1 X de buffer PB-L (Productos Bio-Lógicos), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTPS, 0,2 µM de cebador *forward*, 0,2 µM de cebador *reverse*, 1 U de la enzima Taq polimerasa Pegasus (PB-L) y H<sub>2</sub>O hasta completar volumen. Se recolectó una colonia utilizando un tip de pipeta estéril y se resuspendió en la mezcla de reacción. Se utilizó como programa de amplificación un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C/5 min, 35 ciclos de 94 °C/30 s; 58 °C/30 s; 72 °C/30 s; y un ciclo de extensión final de 72°C/10 min.

#### **4.3.3 Evaluación del efecto de los antibióticos sobre el crecimiento de las cepas de *A. tumefaciens*.**

En los experimentos de transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, la bacteria debe ser eliminada del explanto vegetal luego del período de co-cultivo. Para ello, se evaluó el efecto de la concentración de Timetina y Cefotaxima sobre el crecimiento en placa de las cinco cepas de *A. tumefaciens* (Tabla 1) transformadas con el vector

pCAMBIA2301. La técnica empleada consistió en sembrar el inóculo mediante estriado en placas de Petri con medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes según cepa y concentraciones diferentes e independientes de Timetina y Cefotaxima. El efecto de la concentración se evaluó a seis niveles: 0, 75, 150, 200, 300 y 400 mg/l para Timetina y a 0, 100, 200, 300, 500 y 600 mg/l en el caso de Cefotaxima. El orden de siembra de las cepas en la placa de Petri se describe en la Figura 10. Las placas se incubaron en estufa a 28 °C y el crecimiento bacteriano se evaluó a los tres días posteriores a la siembra.



**Figura 10. Distribución de la siembra de las cepas de *A. tumefaciens* para evaluar sensibilidad a Cefotaxima y Timetina.**

#### 4.3.4 Ensayos de transformación

##### 4.3.4.1 Preparación de inóculo bacteriano

Las cepas C58C1 de *A. tumefaciens*, vacía y transformada con el vector binario pCAMBIA2301, se seleccionaron para los ensayos de transformación de tejido vegetal de 'D'Agen' (sección 4.3).

Se inculó una colonia bacteriana en 5 ml de medio LB suplementado con TC (2,5 mg/l) y se incubó ON a 28 °C en un agitador orbital. A partir de este cultivo, se realizó una dilución 1/100 en 50 ml finales de medio LB. Ésta se llevó a cabo en un erlenmeyer de 250 ml, tomando una relación de aireación (1/5), y se incubó ON a 28 °C en

agitación hasta la OD de ensayo medida mediante la absorbancia a 660nm en espectrofotómetro LAMBDA 25 (PerkinElmer). En cuanto al cultivo de la cepa transformada, el medio LB utilizado fue, a su vez, suplementado con 50 mg/l de Km, debido a la resistencia conferida por el vector. Por último, se centrifugó a 2500 x g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en medio de transformación (SRM líquido con Acetosiringona 100 µM) hasta una OD<sub>600</sub>= 0,3 (OD de infección) y se mantuvo a 28 °C en agitación suave durante un mínimo de 4 h.

#### 4.3.4.2 Expresión transiente en hojas y puesta a punto de la tinción GUS

El ensayo se llevó a cabo para establecer las condiciones de transformación que maximizan el número de explantos transformados y número de eventos transformantes/explanto (variables respuesta) en la transformación transiente de hojas de ‘D’Agen’. Para ello se empleó un diseño experimental *Screening* multifactorial  $2^3 = 8$  tratamientos, en el que se evaluaron tres factores a dos niveles cada uno (Tabla 2). La cepa C58C1 vacía se utilizó como control negativo de transformación.

**Tabla 2. Factores evaluados en el ensayo de transformación transiente en cotiledones 'D'Agen', y sus respectivos niveles.**

<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>
<b>Sonicación (s)</b>	0,0
	15,0
<b>Vacío (min)</b>	0,0
	20,0
<b>Vacío en tinción (5 min)</b>	0,0
	5,0

Las hojas expandidas y turgentes empleadas para este ensayo fueron escindidas de brotes de ‘D’Agen’ mantenidos en condiciones *in vitro* y colocadas en medio SRM líquido (SRM líq.), antes de iniciar cada tratamiento. La unidad experimental quedó definida por tres hojas/tratamiento.

En los tratamientos con sonicación (ocho tratamientos), las hojas en medio SRM líq. fueron sometidas a sonicación (frecuencia 40 KHz) durante 15 s y posteriormente infectadas durante 15 min, sumergiéndolas en el cultivo bacteriano descrito anteriormente.



Para evaluar el efecto de la aplicación de vacío sobre hojas expuestas previamente o no a sonicación, se aplicó vacío a una presión de -50 cm Hg durante la infección de 15 min de las hojas por inmersión en el cultivo bacteriano.

Luego de realizados los tratamientos, las hojas fueron secadas en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de la bacteria y se colocaron en placas de Petri con medio de co-cultivo (SRM) donde permanecieron en cámara de cultivo durante tres días a  $24 \pm 2$  °C y en oscuridad.

Finalizado el período de co-cultivo, las hojas se lavaron con el buffer de reacción (Anexo 5) y luego fueron sumergidas en el buffer de reacción GUS que contenía el reactivo x-gluc. Dado que la presencia de la cutícula en la hoja podría impedir el ingreso del reactivo X-Gluc al tejido foliar durante la tinción, en ocho tratamientos del diseño se aplicó vacío durante la tinción GUS; éste consistió en aplicar vacío a las hojas embebidas en el buffer de reacción X- Gluc, a una presión de -50 cm Hg durante 5 min.

Las unidades experimentales de todos los tratamientos fueron incubadas a 37 °C ON. Finalizado este tiempo, se realizó una serie lavados en etanol al 70 % (v/v) hasta eliminar la clorofila para poder visualizar las zonas transformadas (azul) con mayor claridad.

Las variables respuesta evaluadas fueron: porcentaje de explantos transformados (N° de hojas que presentaron al menos un evento de transformación/N° de hojas totales) y N° de eventos por explanto. Como evento de transformación se consideró la presencia de puntos azules en el explanto (spot). Para el análisis estadístico se utilizó el software Design Expert versión 7.0.0.

#### **4.3.4.3 Ensayo de optimización de la transformación transiente en cotiledones**

Se empleó un diseño experimental Full- factorial, compuesto por un total de 24 tratamientos, en el que se evaluó el efecto de cuatro factores sobre la eficiencia de la transformación transiente de cotiledones de ciruelo 'D'Agen' (Tabla 3). Al igual que en el ensayo de transformación transiente de hojas, se incluyó la cepa C58C1 vacía como control negativo de transformación. La unidad experimental quedó definida por tres cotiledones por tratamiento.

**Tabla 3. Factores evaluados en el ensayo de transformación transiente en cotiledones 'D'Agen', y sus respectivos niveles.**

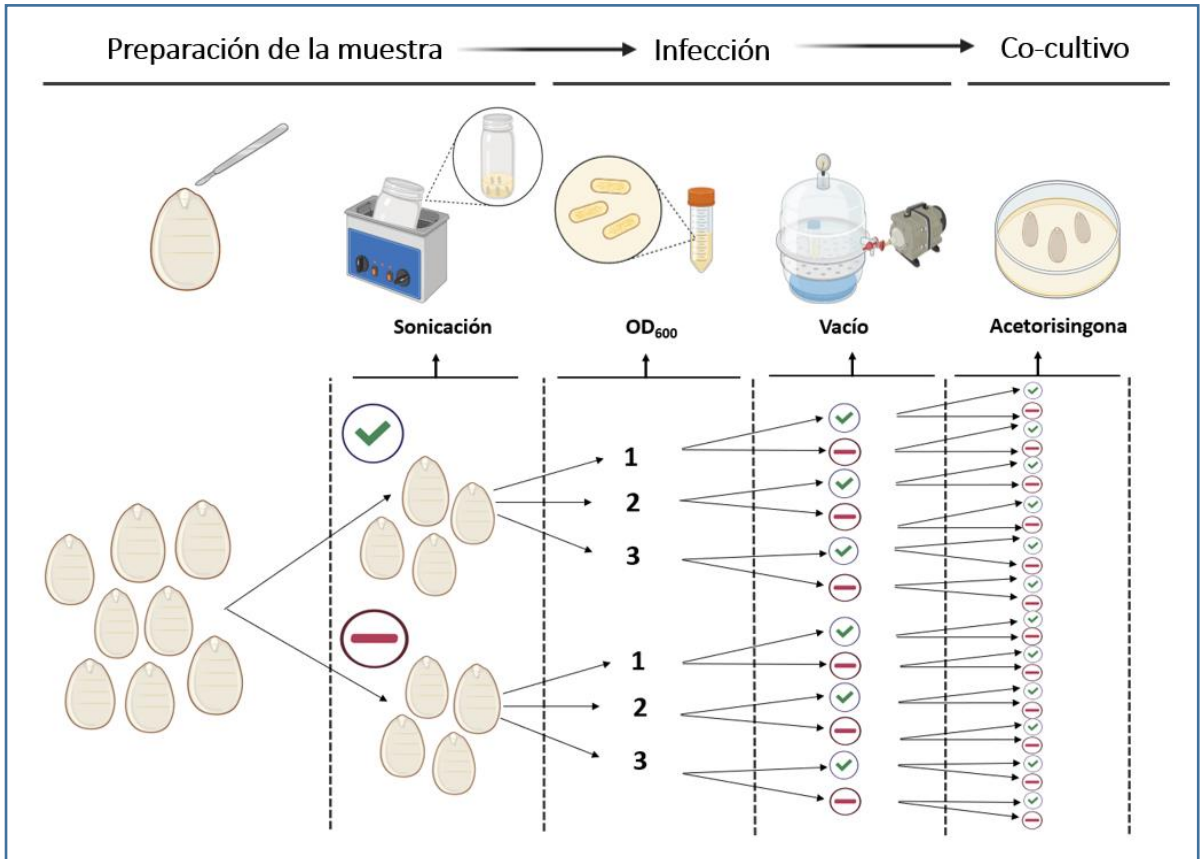
<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>
<b>Estado fisiológico de la bacteria (OD<sub>600</sub>)</b>	0,2
	0,6
	0,8
<b>Sonicación (s)</b>	0,0
	15,0
<b>Vacío (min)</b>	0,0
	20,0
<b>Acesotosiringona en Co-cultivo (µM)</b>	0,0
	100,0

Se utilizaron semillas maduras de ciruelo 'D'Agen' preparadas siguiendo el procedimiento descrito previamente en la sección 4.2. Luego de la eliminación del tegumento, con la ayuda de un bisturí, se realizaron tres cortes transversales en la superficie adaxial del cotiledón. Con el fin de evaluar el efecto de la sonicación, los cotiledones obtenidos fueron divididos en dos grupos: uno de ellos fue sumergido en medio SRM líquido y sonicado durante 15 s, mientras que el otro grupo se mantuvo en el mismo medio, pero sin sonicar.

Para evaluar el efecto de la fase de crecimiento bacteriana, se obtuvieron tres cultivos de *A. tumefaciens* con una OD<sub>600</sub> de 0,2, 0,6 y 0,8, respectivamente. Por otra parte, la cepa vacía se cultivó hasta una OD<sub>600</sub> de 0,4. Los cultivos fueron centrifugados a TA y luego resuspendidos en medio de transformación (SRM líquido, 100 µM de AS) hasta obtener una OD<sub>600</sub> final de 0,3 (OD<sub>600</sub> de infección). Los cotiledones fueron sumergidos en estas suspensiones bacterianas e incubados durante 20 minutos a TA para permitir la infección. Asimismo, durante la infección, parte de los cotiledones fueron sometidos a vacío a una presión de -50 cm Hg durante 20 min.

Finalizada la infección, todos los cotiledones fueron secados en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de la bacteria y transferidos a placas de Petri con medio de co-cultivo SRM suplementado o no con 100 µM de AS. Las placas se incubaron a 24 ± 2 °C en oscuridad durante tres días.

El esquema del diseño experimental empleado se detalla en la Figura 11. Los resultados fueron analizados mediante el paquete Design Expert versión 7.0.0.



**Figura 11. Esquema del diseño experimental multifactorial para la optimización de la transformación transiente de cotiledones de ciruelo 'D'Agen' mediante *A. tumefaciens*.** Los factores evaluados fueron: sonicación, fase de crecimiento bacteriana (los niveles 1, 2 y 3 corresponden a  $OD_{600}$  0,2; 0,6 y 0,8 respectivamente), vacío durante la infección y acetosiringona en co-cultivo.

#### 4.3.4.4 Detección y evaluación del gen *uidA* (GUS)

Luego del período de co-cultivo, se procedió a la detección histoquímica de GUS en los explantos. La misma se detalla en Anexo 5.

Para el análisis de la expresión de GUS en los cotiledones, los mismos fueron fotografiados en ambas caras, adaxial y abaxial, utilizando una cámara digital acoplada a un Microscopio estéreo Zeiss Stemi 305 puesto

a disposición gentilmente por el Dr. Andrés Lavore del centro de Bionvestigaciones (CEBIO, UNNOBA-CICBA). Las imágenes fueron capturadas a través de Cámara digital 5s Axio Cam ERc en formato TIFF y luego analizadas utilizando el software ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012). Debido a que el área total del cotiledón no cabía en el objetivo de la lupa, se fotografió por partes, obteniendo al menos dos fotografías por cada cara.

Debido a que se observó tinción azul en cotiledones de los tratamientos (cepa C58C1 provista de pCAMBIA2301) y los controles (cepa C58C1 vacía), se realizó el siguiente análisis de imágenes basándose en la metodología descrita en Béziat *et al.* (2017) para cuantificar la transformación:

Todas las imágenes se convirtieron a escala de grises de 8 bits, donde los valores de intensidad de píxeles oscilan entre 0 (negro) y 255 (blanco). Valores más bajos se corresponden con mayor intensidad de la tinción azul en la imagen original.

1. **Análisis de controles:** Se delimitó el área total de cada cotiledón control registrando el número total de píxeles y sus valores de intensidad. Luego se delimitó específicamente el área que a la vista se consideraba con coloración azul, registrando para esta nueva área el número total de píxeles y sus valores de intensidad. El menor valor de intensidad observado se estableció como umbral para ese control y se utilizó para determinar los valores de los tratamientos GUS, en donde se consideraron como positivos (GUS+) a aquellos píxeles cuyo valor de intensidad era menor al umbral (es decir, la tinción era más intensa que la máxima registrada en el control). En cambio, se consideraron negativos (GUS-) los píxeles con valores de intensidad por encima de ese umbral, es decir, misma intensidad en la tinción azul a la que se observó en el control (ruido observado). Para cada tratamiento GUS se utilizó como control su “réplica” con la cepa vacía, la cual fue sometida a las mismas condiciones experimentales (sonicación, vacío y AS en co-cultivo). De esta manera, los umbrales reflejan el ruido de fondo propio de cada tratamiento.

2. **Análisis de tratamientos GUS:** Se delimitó el área total de cada cotiledón, registrando el número total de píxeles e intensidades de dicha área. Luego se delimitó el área que a la vista se consideraba azul (área azul) y se determinó el número total de píxeles e intensidades del área azul. Finalmente, considerando el umbral determinado previamente en el control correspondiente, se consideraron como píxeles GUS+ aquellos con valores de intensidad menores al umbral.

A partir del número total de píxeles y de los píxeles GUS+ obtenidos para cada tratamiento mediante el análisis de imágenes, se calcularon las siguientes variables respuesta:

-**Número total de píxeles GUS+** = N° px GUS+ por tratamiento

-**Porcentaje de área GUS+** = (N° px GUS+/N° total px tratamiento) x 100

**-Promedio porcentaje de área GUS+=**  $(N^{\circ} \text{ px GUS+ cotiledón} / N^{\circ} \text{ total px cotiledón}) / N^{\circ} \text{ cotiledones por tratamiento}$ .

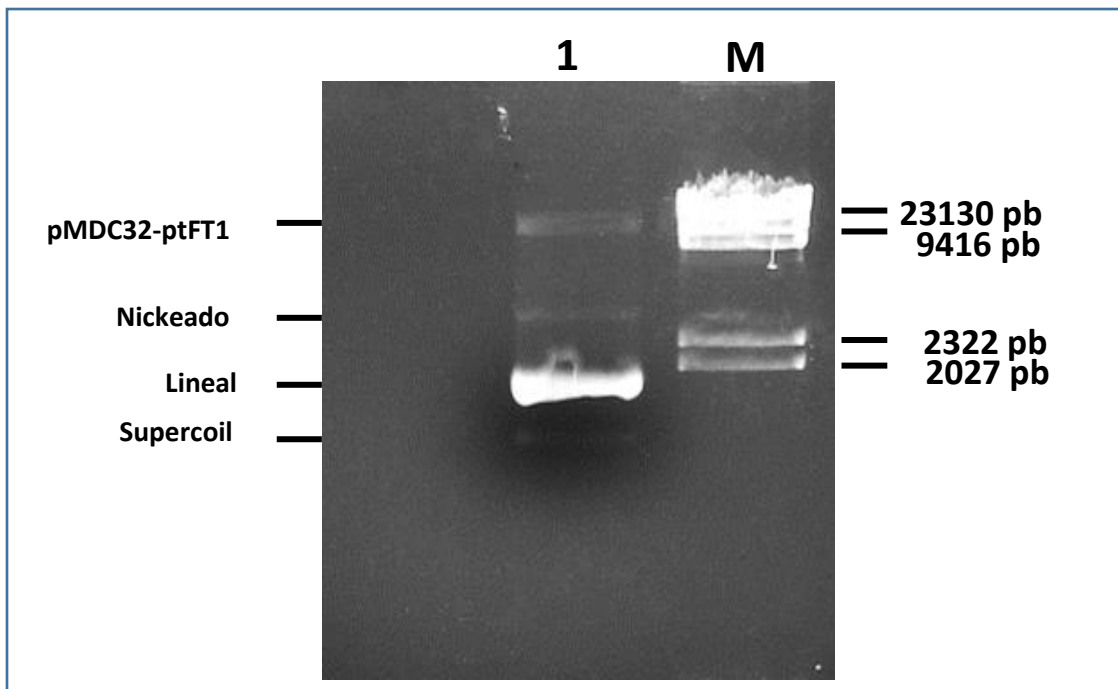
**-Suma porcentaje de áreas GUS+ =**  $\sum (N^{\circ} \text{ px GUS+ cotiledón} / N^{\circ} \text{ total px cotiledón})$  **por tratamiento.**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Design Expert versión 7.0.0. Se obtuvieron modelos parciales para cada variable respuesta de forma independiente y a partir de ellos se calculó la función de deseabilidad (D) con el fin de optimizar las variables respuestas simultáneamente. Cada variable respuesta se transformó a una escala adimensional de 0 a 1 (siendo 1 el valor más deseable), y luego se combinaron las deseabilidades individuales en una deseabilidad global que resume el comportamiento conjunto de todas las variables.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención del vector recombinante pMDC32-ptFT1

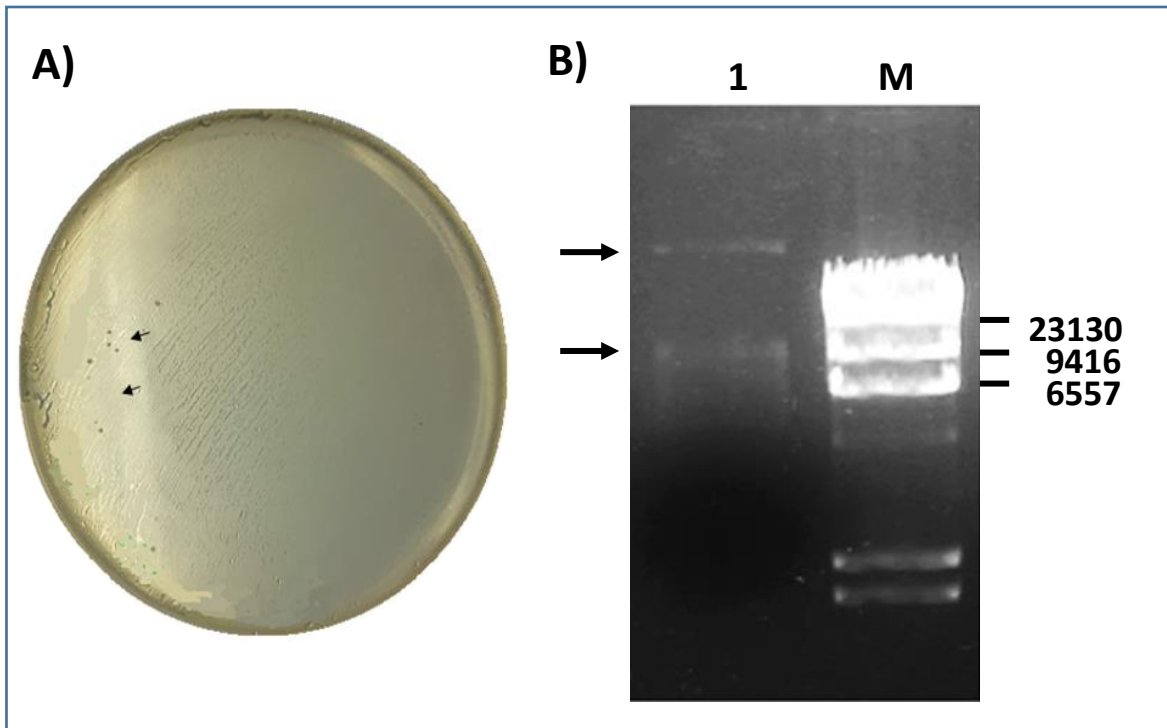
Como resultado de la transformación con la mezcla de la reacción LR, en medio selectivo con Km se obtuvo un cultivo líquido de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformantes. En la Figura 12 se muestra el patrón de bandeo obtenido de ADN plasmídico aislado de dicho cultivo, el cual estuvo caracterizado por: i) una banda en la región entre 9 y 23 kb, concordante con el tamaño esperado para el vector recombinante de interés pMDC32-ptFT1 (10.960 pb) y ii) bandas de tamaño coincidente con el clon de entrada sin reaccionar pDONOR-ptFT1 (2000 pb). Esto, permitió suponer que se obtuvo la población de bacterias transformantes esperada: un pool de *E. coli* DH5 $\alpha$  conformado por bacterias transformantes para el vector de interés y otras para el clon de entrada sin reaccionar.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) de la extracción de ADN plasmídico de *E. coli*, luego de la transformación con la mezcla de la reacción LR. **1)** Se observa una banda de tamaño coincidente con el peso molecular del vector producto esperado de la reacción LR, el vector recombinante pMDC32-ptFT1, y tres bandas de menor peso correspondientes a las diferentes conformaciones del clon de entrada sin reaccionar. **M)** marcador de peso molecular Lambda *Hind III*.

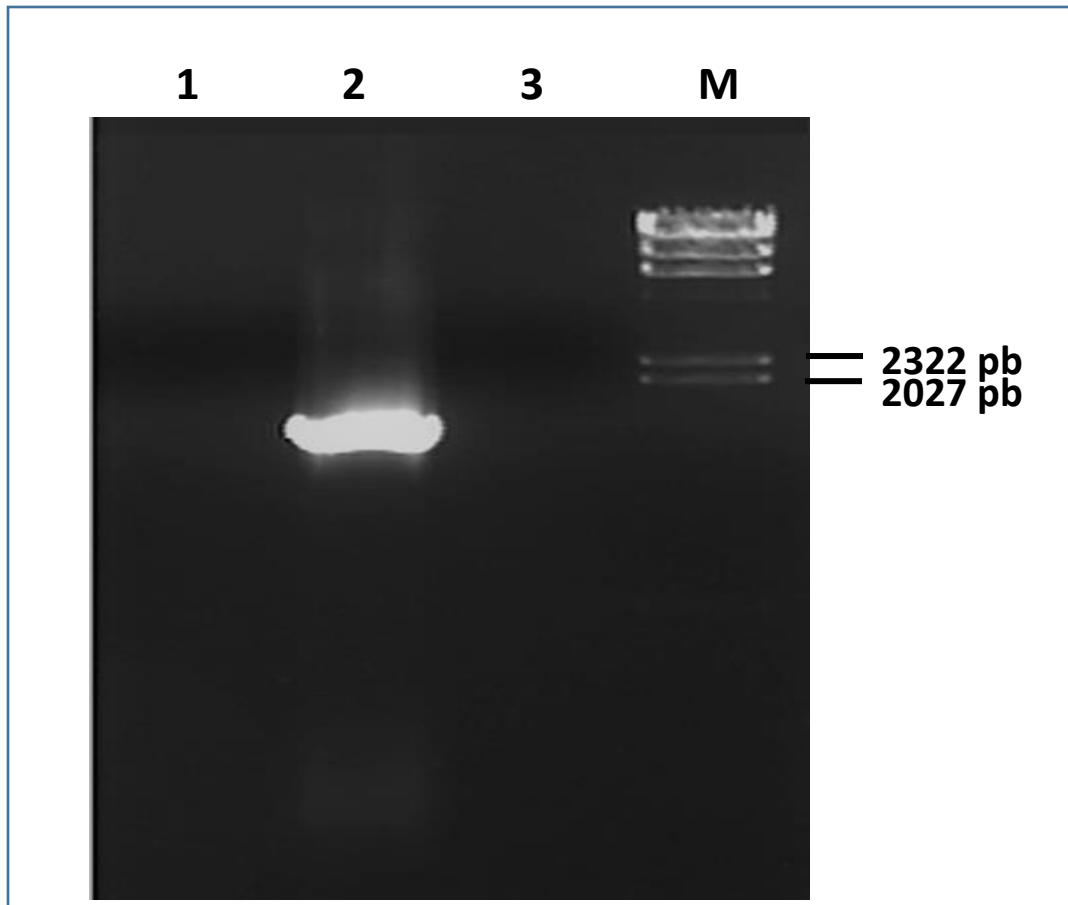
A su vez, la mezcla de plásmidos aislados de la población de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformantes, permitió transformar células competentes de *A. tumefaciens* C58C1 y obtener colonias en medio selectivo (Figura 13-A). Nuevamente,

se observó una banda concordante con el tamaño esperado para el vector recombinante de interés pMDC32-ptFT1 de 11 kb (Figura 13-B) en el perfil electroforético de la extracción de ADN plasmídico de las células C58C1 transformantes. Sin embargo, cuando se realizaron las PCRs para confirmar la identidad del plásmido extraído, no se obtuvo la banda de 1263 pb esperada para PMDC32-ptFT1.



**Figura 13. Transformación de *A. tumefaciens* C58C1 con la extracción de plásmidos de *E. coli*.** **A)** Las flechas indican colonias crecidas en medio LB suplementado con Tc (2,5 mg/l) y Km (50 mg/l) **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v). La flecha superior en el carril 1 muestra una banda de ADN genómico bacteriano, y en la flecha inferior se observa la presencia de una banda de aproximadamente 11.000 pb, coincidente con el clon de expresión pMDC32-ptFT1.

Ante este resultado, se decidió realizar una *Colony* PCR, a partir de una de las colonias transformadas cultivadas en medio selectivo, sin poder amplificar nuevamente el fragmento esperado (Figura 14). Por lo tanto, si bien se logró extraer un plásmido del peso molecular esperado de la cepa C58C1 transformante que adquirió resistencia a Km (conferida por el plásmido) no se pudo comprobar la identidad de este mediante PCR.



**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa para confirmar mediante PCR la presencia del vector recombinante pMDC32-ptFT1 en colonia de *A. tumefaciens* C58C1 aislada en medio selectivo. M) marcador de peso molecular. 1) Control negativo 2) Control positivo pMDC32-OLE 3) pMDC32-ptFT1.**

El sistema Gateway está basado en el empleo de vectores con distintos marcadores de selección para permitir la diferenciación de los clones recombinantes tras las reacciones BP y LR (Karimi *et al.*, 2007). En este trabajo, el principal desafío de clonar el gen *FT* en el vector de expresión pMDC32 mediante este sistema estuvo dado en que los vectores utilizados en la reacción de recombinación LR tenían el mismo marcador de selección bacteriana, la resistencia a Kanamicina. Cuando ocurre esto es difícil, si no a veces imposible, utilizar la resistencia a los antibióticos para seleccionar los transformantes deseados. Por ello, se propuso utilizar la estrategia propuesta por Xu & Li (2008) que permite superar esta limitación al aprovechar las diferencias en los orígenes de replicación de los vectores donante y destino para *E. coli* y *A. tumefaciens*. Ellos encontraron que al transformar *A. tumefaciens* competentes directamente con la mezcla de reacción LR, el 100% de los clones analizados contenían el vector



recombinante buscado. Esto se debería a la inhabilidad de replicación de los clones de entrada en *A. tumefaciens* por diferencias en los orígenes. Por lo tanto, cuando se transforma la mezcla LR directamente en *A. tumefaciens*, estos vectores no son capaces de replicarse ni de conferir resistencia al antibiótico en dicha bacteria.

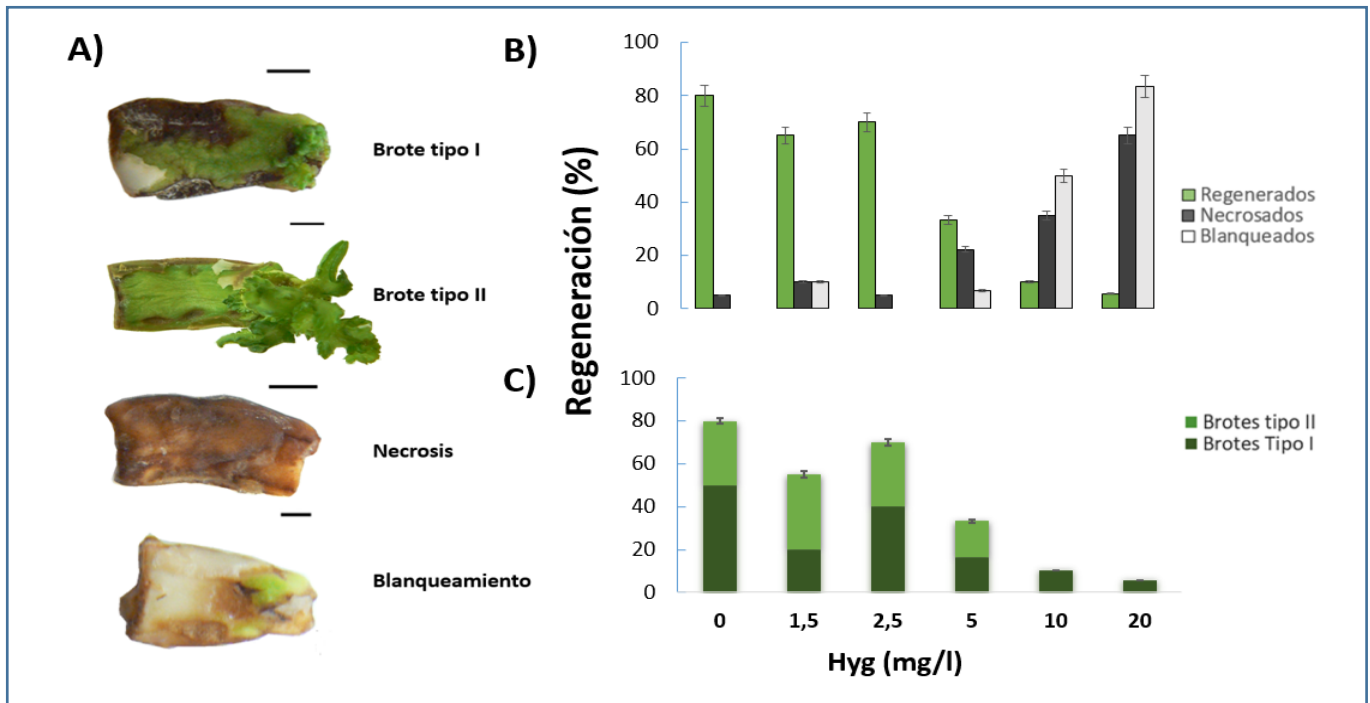
Siguiendo este método, obtuvimos colonias de *A. tumefaciens* resistentes a Kanamicina tras la transformación con la mezcla de reacción LR, de las cuales aislamos un plásmido del tamaño esperado para el vector pMDC32-ptFT1. Sin embargo, la identidad del mismo no pudo ser confirmada por PCR. Si bien la identificación se realizó en *A. tumefaciens*, lo óptimo hubiese sido verificar previamente la presencia del vector de interés en la mezcla LR proveniente de la extracción de ADN del cultivo de *E. coli* utilizado para la transformación. De esta manera, se hubiese podido confirmar desde un inicio la obtención del plásmido deseado antes de continuar con la transformación de *A. tumefaciens*. Para experimentos futuros, se sugiere incluir este paso de control por PCR en *E. coli* luego de obtener el producto de recombinación y previo a la transformación en *A. tumefaciens*, y además, luego de la transformación de *A. tumefaciens*, corroborar más de una colonia transformante. Otra de las confirmaciones a realizar sería la identidad del vector pDONOR201-ptFT1, el cual es el utilizado como vector donante para obtener el pMDC32-ptFT1 mediante diferentes técnicas como antibiograma, digestión con diferentes enzimas de restricción, o PCR seguido de la secuenciación del gen de interés. En relación a los resultados obtenidos, una posible explicación para la dificultad en la detección del vector sería que el vector sufrió una mutación en la zona en el sitio de hibridación de los cebadores durante la manipulación, por lo cual no permite la amplificación por PCR.

Para corroborar esta hipótesis, se deberán diseñar nuevos cebadores que hibriden en un sitio distinto que permita la detección del vector. Además, en futuros ensayos se podría emplear una estrategia adicional, como la digestión del vector aislado con enzimas de restricción y la secuenciación por Sanger para confirmar la estructura primaria. Para ello, será necesario disponer de cebadores específicos que permitan obtener la secuencia del cassette de expresión. Una vez confirmada la obtención del vector pMDC32-ptFT, se podrá continuar con la incorporación de este gen en ciruelos y en otros frutales como duraznero con el objetivo de acelerar su proceso de mejoramiento genético.

## **5.2 Evaluación de sensibilidad a Higromicina de cotiledones de ciruelo 'D'Agen'**

En el análisis de los cotiledones se distinguieron dos clases de brotes, identificados como “brotes tipo I”, y “brotes tipo II”. Los brotes de tipo I presentaron tamaño reducido, sin el desarrollo de hojas alargadas; en contraste, los brotes de tipo II presentaron mayor tamaño, con hojas alargadas y vigorosas. Además de los dos tipos de brote, se observaron efectos deletéreos en los cotiledones evaluados, como necrosis y blanqueamiento (Figura 15-A). El

análisis de correlación de Pearson mostró una correlación significativa entre la concentración de Hyg y estas variables estudiadas (Tabla 4).



**Figura 15. Efecto de la concentración de Higromicina sobre la regeneración in vitro de cotiledones 'D'Agen'. A) Tipos de brote y efectos deletéreos observados durante la regeneración. B) Porcentaje de cotiledones que regeneraron brotes, mostraron necrosis y presentaron blanqueamiento. C) Porcentaje de cotiledones regenerados, considerando brotes de tipo I y II. Barras de error muestran  $\pm 5\%$  de variación.**

**Tabla 4. Análisis de Correlación de Pearson entre la concentración de Higromicina y los porcentajes de Regeneración, Necrosis, blanqueamiento y Regeneración de brotes tipo II de cotiledones 'D'Agen'.**

Variable 1	Variable 2	n	Pearson	p-valor
% Regeneración	Cc Hyg	6	-0,89	0,0188
% explantos necrosados	Cc Hyg	6	0,99	0,0001
% explantos blanqueados	Cc Hyg	6	0,97	0,0016
% brotes tipo II	Cc Hyg	6	-0,87	0,0200

En cuanto al porcentaje de regeneración de los cotiledones expuestos a diferentes concentraciones de Hyg, se encontró un efecto inhibitorio dependiente de la concentración; se observó una reducción progresiva en el porcentaje de explantos que desarrollaron brotes a medida que aumentó la concentración de Hyg (Figura 15 B). Esta tendencia fue corroborada mediante el análisis de regresión lineal, donde se observó una asociación significativa entre la concentración de Hyg y el porcentaje de regeneración ( $R^2=0,78$ ). El análisis mostró un efecto negativo de la concentración de Hyg sobre la regeneración, evidenciado por un coeficiente de regresión negativo (Tabla 6). El resultado observado para la regeneración de brotes tipo II fue similar al obtenido para el porcentaje de regeneración total. Se observó una asociación lineal negativa que se evidencia con la disminución de la regeneración a medida que aumenta la concentración de Hyg.

Por otro lado, el aumento de la concentración de Hyg provocó un incremento en los porcentajes de cotiledones con necrosis y blanqueamiento del tejido (Tabla 5). El análisis de regresión lineal confirmó una asociación positiva entre concentración del antibiótico y estos efectos deletéreos sobre los explantos.

Los resultados del análisis de Regresión lineal se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5. Coeficientes de la ecuación de regresión estimada para las variables respuesta Porcentajes de regeneración, Necrosis, Blanqueamiento y Regeneración de brotes tipo II de cotiledones 'D'Agen'.**

<b>Respuesta</b>	<b>Coef</b>	<b>Est.</b>	<b>E.E.</b>	<b>LI(95%)</b>	<b>LS(95%)</b>	<b>T</b>	<b>p-valor</b>
% Regeneración	Const	68,7	9,38	42,64	94,77	7,32	0,0019
	Cc Hyg	-3,8	1,00	-6,57	-1,04	-3,82	0,0188
% explantos necróticos	Const	2,58	2,18	-3,46	8,63	1,19	0,3012
	Cc Hyg	3,43	0,23	2,79	4,08	14,87	0,0001
% explantos blanqueados	Const	-4,01	5,45	-19,14	11,13	-0,74	0,5030
	Cc Hyg	4,43	0,58	2,83	6,04	7,67	0,0016
% brotes tipo II	Const	6,05	0,97	3,36	8,73	6,24	0,0034
	Cc Hyg	-0,37	0,1	-0,65	-0,08	-3,56	0,0235

**-Conc. Hyg:** Concentración de Higromicina; **Coef Est;** coeficiente estimado. **E.e:** Error estándar; **LI (95%):** Límite inferior del intervalo de confianza del 95%; **LS (95%):** Límite superior del intervalo de confianza del 95%; **T:** Valor de probabilidad T; **p-valor:** valor de probabilidad p

Los resultados obtenidos sugieren que una concentración de 10 mg/l de Higromicina en los medios de regeneración sería la conveniente de usar en experimentos de transformación de 'D'Agen' ya que disminuyó de

manera significativa el porcentaje de regeneración con respecto al control e inhibe completamente la regeneración de brotes tipo II. Sin embargo, a esta misma concentración también se observaron efectos deletéreos importantes sobre la regeneración de brotes no transformados.

Como se mencionó previamente, el desafío en la utilización de los antibióticos de selección es encontrar el equilibrio entre la inhibición de la regeneración de brotes no transformados y el menor daño posible en el tejido vegetal. Si bien altas concentraciones pueden inhibir la formación de brotes no transformados, el daño excesivo al tejido también puede influir en la capacidad de regeneración de las pocas células transformadas. Cuando existe daño, las células necróticas liberan productos tóxicos que generan condiciones desfavorables para el desarrollo de los brotes transformados (Mokhailov *et al.*, 2007). Es decir, no es suficiente únicamente con que no haya escapes; se necesita mantener la viabilidad del tejido lo máximo posible para que las células transformadas puedan regenerar.

En base a lo mencionado, según nuestros resultados, se podría sugerir el uso de una concentración de 5 mg/l, ya que se observó una disminución del porcentaje de cotiledones que regeneraron brotes tipo II sin un incremento importante en los efectos deletéreos sobre el tejido vegetal. Esta concentración permitiría un equilibrio entre la inhibición de tejido no transformado y la regeneración de tejido transformado en futuros experimentos de transformación genética de cotiledones 'D'Agen'. Los resultados reportados por Tian *et al.* (2009) coinciden con esta sugerencia. Ellos evaluaron diferentes concentraciones de Hyg (0, 2,5, 5, 10, 20, 30 mg/l) en segmentos de hipocótilo de ciruela 'Stanley' y observaron que a concentraciones de 5 mg/l o mayores, no hubo regeneración de brotes y los explantos murieron luego de 5 semanas. Por lo tanto, utilizaron esta concentración en experimentos de transformación para ejercer presión de selección, concluyendo que la selección fue efectiva, sin escapes. En la misma línea, Mikhailov *et al.* (2007) establecieron que la concentración efectiva de Higromicina para la selección de hojas del cultivar 'Startovaya' estaba entre 7-8 mg/l. Con 15 mg/l todos los explantos mostraron necrosis severa y murieron sin formación de callos, y con concentraciones intermedias, 9 a 11 mg/l, lograron la formación de algunos callos pero luego los explantos se necrosaron gradualmente y no desarrollaron yemas.

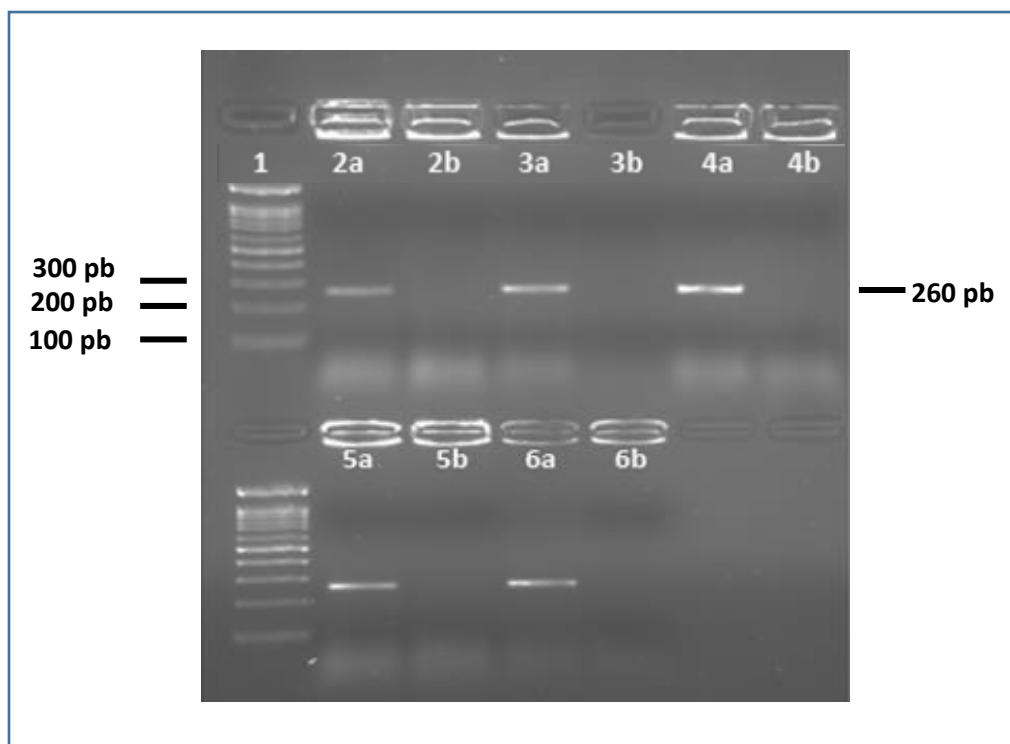
Es importante destacar que tanto en nuestro ensayo con cotiledones 'D'Agen' como en los trabajos de Tian *et al.* (2009) con hipocótilos 'Stanley' y Mikhailov *et al.* (2007) con hojas 'Startovaya', fue necesario utilizar concentraciones bajas de Higromicina para inhibir la regeneración sin producir necrosis severa (5 a 8 mg/l). Esto evidencia la alta sensibilidad a este antibiótico de *Prunus domestica* más allá del genotipo o el tejido utilizado.

### **5.3 Optimización de la transformación**

#### **5.3.1 Obtención de las cepas transformadas**

Se transformaron las cinco cepas de *A. tumefaciens* con el vector binario pCAMBIA2301 utilizando el protocolo de choque térmico. La comprobación de la transformación bacteriana se realizó mediante *Colony* PCR y el análisis

del perfil electroforético de los productos de amplificación. La electroforesis en gel de agarosa reveló la presencia de una banda de aproximadamente 260 pb correspondiente al tamaño del amplicón esperado para el vector pCAMBIA2301 en todas las cepas de *A. tumefaciens* transformadas, mientras que las cepas no transformadas no presentaron bandas (Figura 16). Estos resultados verifican que las cinco cepas de *A. tumefaciens* incorporaron con éxito el vector binario pCAMBIA2301.

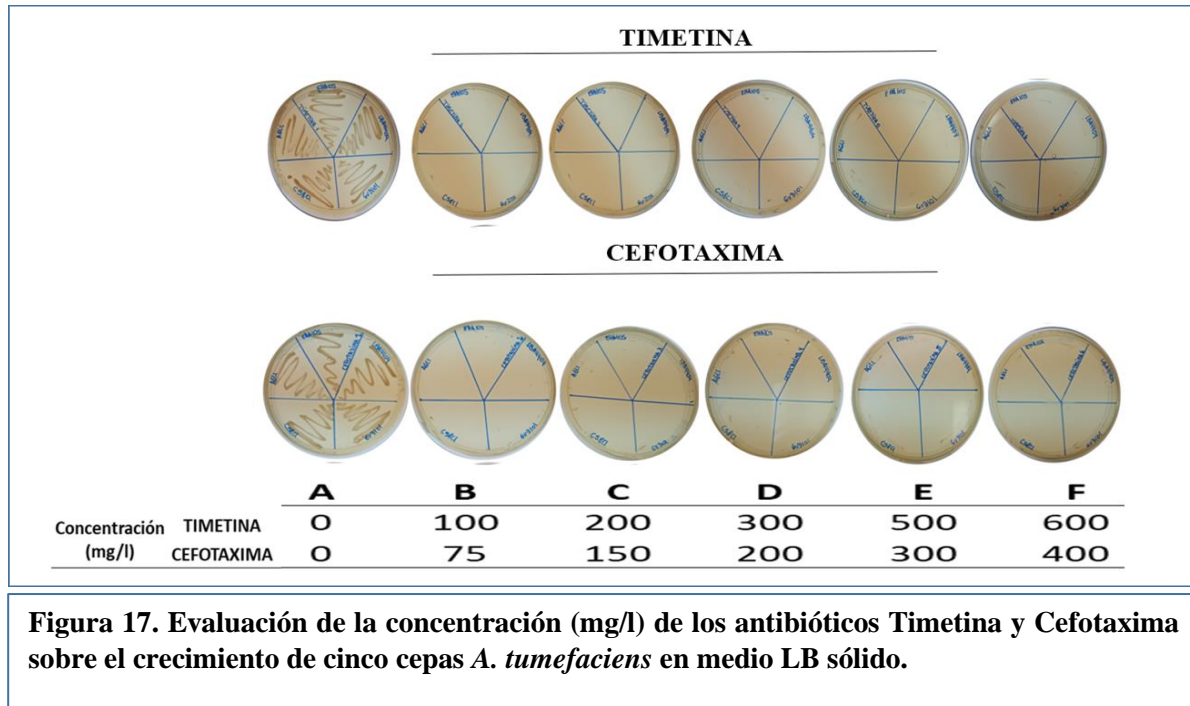


**Figura 16. Corroboración de la transformación de las cepas de *A. tumefaciens* con el vector pCAMBIA2301 (+).** Se emplearon cepas sin transformar (-) como control negativo. **1)** Marcador molecular de 100 pb. **2a)** GV3101 (+) **2b)** GV3101 (-) **3a)** LBA4404 (+) **3b)** LBA4404 (-) **4a)** AGL1 (+) **4b)** AGL1 (-) **5a)** EHA105 (+) **5b)** EHA105(-) **6a)** C58C1 (+) **6b)** C58C1(-).

#### 5.4 Determinación de la sensibilidad a los antibióticos Timetina y Cefotaxima de *A. tumefaciens* transformada con pCAMBIA2301

Los resultados de este ensayo demuestran que las cinco cepas de *A. tumefaciens* transformadas con el vector pCAMBIA2301 son sensibles a Timetina y Cefotaxima, dado que no se observó crecimiento bacteriano en todas las concentraciones evaluadas (Figura 17). Estos resultados indican que las concentraciones de 100 y 75 para

Timetina y Cefotaxima, respectivamente, serían igualmente eficientes para controlar el crecimiento de *A. tumefaciens* en ensayos de transformación.



**Figura 17. Evaluación de la concentración (mg/l) de los antibióticos Timetina y Cefotaxima sobre el crecimiento de cinco cepas *A. tumefaciens* en medio LB sólido.**

En ensayos de transformación de especies de *Prunus*, durante la etapa posterior al co-cultivo, se han empleado concentraciones más altas de estos antibióticos; principalmente entre 200-300 mg/l tanto de Cefotaxima (Pratesi *et al.*, 2003; Mikhailov & Dolgov, 2005) como de Timetina (Padilla *et al.*, 2003; Song & Sink, 2006; Petri *et al.*, 2012). Particularmente en la transformación de cotiledones, Pratesi *et al.* (2003) emplearon 200 mg/l de cefotaxima en *Prunus avium* y *Prunus armeniaca*. El empleo de estas concentraciones puede deberse a la degradación del antibiótico durante el cultivo *in vitro*, por lo que debería emplearse a una concentración más alta al inicio para poder controlar de manera efectiva el crecimiento de *A. tumefaciens* hasta el repique del material vegetal.

Además, aunque estos resultados informan sobre la sensibilidad de las cepas, se debe considerar el efecto de los antibióticos sobre la regeneración del material vegetal, debido a su rol en la morfogénesis *in vitro* (Piagnani & Chiozzotto, 2010). En este sentido, la cefotaxima se ha utilizado ampliamente en el cultivo de tejidos vegetales. De hecho, muchas especies se han regenerado en su presencia y en algunos casos incluso se demostró que mejora la capacidad de regeneración (Piagnani & Chiozzotto, 2010). Verma *et al.* (2023) encontraron que para eliminar el crecimiento excesivo de *A. tumefaciens* de las hojas cultivadas de manzana, la Cefotaxima debía emplearse a 500 mg/l, pero a esa concentración inhibió la inducción de brotes, por lo que debieron reducirla gradualmente a 200

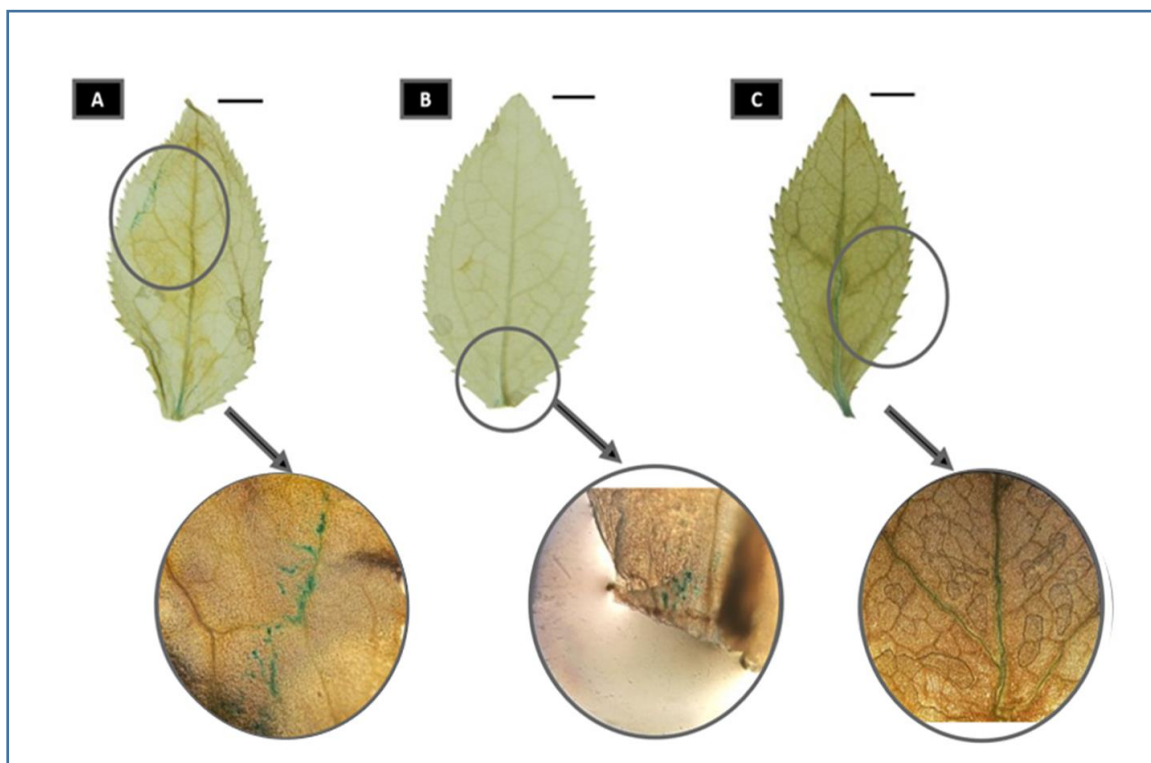
mg/l para permitir la formación de brotes. En contraste, Mikhailov & Dolgoet (2005) encontraron que este antibiótico en un rango de 250 a 1000 mg/l no influyó en la formación de callos ni en la regeneración de brotes adventicios de hojas de *Prunus domestica*. Asimismo, los resultados presentados por Piagnani & Chiozzotto (2010), confirman que la Cefotaxima en una concentración de 200 mg/l no interfiere en la morfogénesis de callos regenerados 'Burlat C1' de *Prunus avium*. Sin embargo, su poder como agente descontaminante a esa concentración en sus condiciones es bajo. Ellos concluyen que se debe a la complejidad del tejido regenerado, masas morfogénicas con grietas, lo que impide el acceso del antibiótico y limita el contacto con la bacteria.

En cuanto al empleo de la Timetina, también se ha estudiado su efecto sobre la capacidad morfogénica de distintos explantos de especies de *Prunus* cuando se emplea para la desinfección post-transformación. Este antibiótico es una mezcla de Ticarcilina, un derivado de la Penicilina, y Ácido Clavulánico (Nauerby *et al.* 1997) con actividad contra muchas bacterias gram negativas, aunque poseen actividad  $\beta$ -lactamasa. El rol de la Timetina en la morfogénesis *in vitro* parece estar asociada a la estructura de la Ticarcilina, que es similar a las auxinas, provocando un efecto de regulador de crecimiento cuando son degradados, facilitando la regeneración (Costa *et al.*, 2000). En este sentido, Padilla *et al.* (2003) encontraron un efecto positivo de esta en la regeneración de hipocótilos de *Prunus domestica*, aumentando la tasa de regeneración de brotes en un 25% en comparación al control cuando se adicionó a una concentración de 5 mg/l. Por otro lado, Burgos & Albuquerque (2003) probaron una concentración mucho mayor de Timetina 650 mg/l en hojas de *Prunus armeniaca* 'Helena', la cual disminuyó la regeneración en comparación al control sin antibióticos.

En función de lo anteriormente expuesto, queda en evidencia que la concentración del antibiótico que se emplea para eliminar la bacteria después del post co-cultivo es importante debido a los efectos sobre el explanto. Por lo tanto, para complementar el trabajo realizado, quedaría realizar un análisis de sensibilidad a Cefotaxima y Timetina en los explantos que se va a transformar en ensayos de transformación futuros de 'D' Agen'.

## 5.5 Transformación de hojas

Las hojas consideradas positivas para la transformación (GUS+) fueron aquellas que presentaron *spots* azules en la lámina (Figura 18). No se observaron spots en el tratamiento control con la cepa sin el vector (Figuras 18-A y 18-B). Sin embargo, como se detectó tinción azul en la nervadura de las hojas (Figura 18-C), tanto de las hojas control como en las hojas de los tratamientos de transformación esta coloración fue desestimada como GUS+. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 6.



**Figura 18. Hojas de ciruelo 'D'Agen'.** A-B: Hojas transformadas con la cepa C58C1 conteniendo el vector pCAMBIA2301 correspondientes a los tratamientos 7 y 1, respectivamente. El círculo señala la zona transformada, observada en aumento 40 x. C: Expresión endógena en la nervadura de una hoja enfrentada a una cepa vacía en aumento 10 x. Barra: 2 mm.

**Tabla 6. Resultados de la transformación transiente de hojas 'D'Agen' mediado por *A. tumefaciens* C58C1.** La unidad experimental para cada tratamiento quedó conformada por 3 hojas, donde se evaluó el N° de explantos transformados y el N° de eventos por explanto.

Tratamiento	Factor			Variable respuesta	
	Sonicación	Vacío	Vacío tinción	N° hojas transf.	N° eventos/hojas
1	✓	✓	✓	1	17
2	-	✓	✓	1	5
3	✓	-	✓	1	1
4	-	-	✓	0	0
5	✓	✓	-	0	0
6	-	✓	-	1	2
7	✓	-	-	2	235
8	-	-	-	0	0

✓ Presencia  
 - Ausencia



La tinción histoquímica de GUS es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la expresión transiente y/o estable del gen reportero *uidA* en plantas y confirmar eventos positivos de transformación (Cervera *et al.*, 2005). Sin embargo, para que esta técnica sea efectiva se deben optimizar diversos factores.

Por un lado, se debe maximizar la transformación en los explantos. En este trabajo, en cinco de los ocho tratamientos analizados se obtuvieron transformantes. El análisis descriptivo de los datos mostró que la aplicación individual de sonicación, resultó ser la mejor condición para aumentar la transformación transiente en hojas de ciruelo 'D'Agen', ya que permitió obtener un mayor número de hojas transformadas y número de eventos/hoja. Estos resultados se pueden deber a una mayor penetración de *A. tumefaciens* en el tejido foliar, ya que el proceso de sonicación genera microheridas por cavitación que facilitan el acceso de las bacterias y la transferencia de ADN-T (Pérez-Caselles *et al.*, 2021).

La aplicación individual de vacío también produjo transformantes, posiblemente al mejorar la infiltración de *A. tumefaciens* en el tejido (Hada *et al.*, 2018). Sin embargo, la combinación de sonicación y vacío no resultó en una mejora aditiva de la transformación, en contraste a lo esperado. Una posible explicación podría ser el efecto combinado de ambos tratamientos disminuye la viabilidad del tejido afectando la incorporación del transgen y por lo tanto reduciendo la señal de GUS+.

A pesar de las observaciones mencionadas anteriormente en base al análisis descriptivo de los datos para cada tratamiento, no fue posible evaluar el efecto de los tres factores estudiados sobre las variables respuestas asociadas a la transformación de hojas de ciruelo 'D'Agen' en base a modelos predictivos estadísticamente significativos, dado que no se cumplían con los supuestos estadísticos necesarios. Se propone aumentar el número de muestras de cada tratamiento para confirmar los resultados observados.

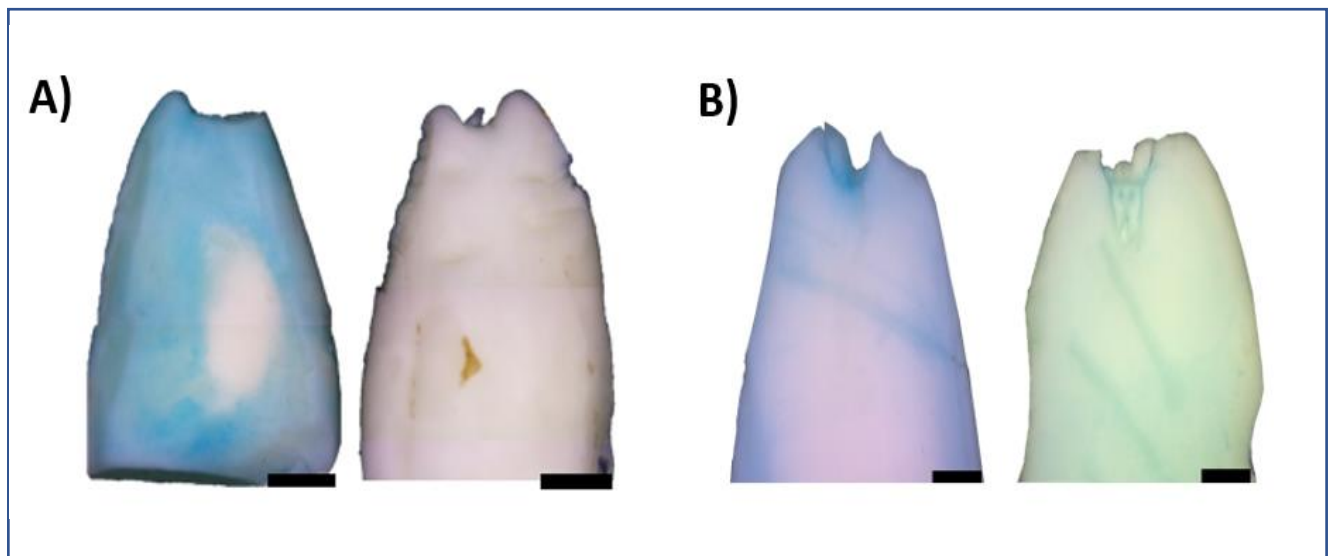
Otro aspecto importante a considerar es la posibilidad de detección de falsos positivos debido a la actividad endógena de la enzima GUS, que en algunas especies vegetales puede generar tinción azul inespecífica y confundirse con transformación positiva (Abdollahi *et al.*, 2011). En nuestro trabajo se observó tinción inespecífica en zonas de la nervadura de las hojas, tanto en las hojas control como en las transformadas. Este resultado evidencia la necesidad de ajustar el protocolo para diferenciar la actividad transgénica de *uidA* de la expresión endógena para los diferentes tejidos y especies.

Además de la posibilidad de detección de falsos positivos debido a la actividad GUS endógena, también existe el riesgo de obtener falsos negativos por una deficiente tinción que impida detectar células transformadas. Para que el reactivo X-Gluc penetre en el interior de las células transformadas debe atravesar posibles barreras físicas como la cutícula de la hoja. Si bien la aplicación de vacío durante la tinción GUS puede ayudar a superar esta barrera, nuestros resultados no concuerdan con esta afirmación. Esto puede deberse a que las hojas utilizadas en el

experimento provenían de plantas cultivadas *in vitro*, las cuales tienen una pared celular delgada.

## 5.6 Optimización de la transformación transiente en cotiledones

En la Figura 19 se muestran cotiledones representativos luego de la tinción histoquímica de GUS. El cotiledón de la izquierda corresponde al tratamiento con mayor número de pixeles GUS+ definido como: OD= 0,6 + Acetosiringona en el medio de co-cultivo (As co), y a la derecha un cotiledón correspondiente a su control (Figura 19-A). Como resultado de la tinción, se observó la presencia de coloración azul en cotiledones de tratamientos GUS (izquierda) y en controles (derecha) (Figura 19- B).



**Figura 19. Análisis histoquímico de la expresión de GUS en cotiledones 'D' Agen'.** Se muestran cotiledones infectados con *A. tumefaciens* cepa C58C1 portando el vector de expresión pCAMBIA2301 para la expresión de GUS (izquierda), y su control negativo infectado con *A. tumefaciens* cepa C58C1 sin vector (derecha). **A)** Cotiledones correspondientes al tratamiento definido por OD<sub>600</sub>= 0,6 + AS co. Barra = 2 mm **B)** Cotiledones correspondientes al tratamiento definido por OD<sub>600</sub>= 0,6, sin vacío, sin sonicación y sin AS co. Se observa tinción azul también en el control negativo. Barra = 1 mm.

Los resultados del análisis de las imágenes de los cotiledones se observan en la Tabla 7, donde se detallan los valores de las variables respuesta estudiadas, para todos los tratamientos.

El análisis estadístico realizado sobre los datos obtenidos del análisis de imágenes permitió obtener modelos que explican el efecto de los factores estudiados ( $p < 0,05$ ) sobre las variables respuesta asociadas a la transformación

**Tabla 7. Resultados de la transformación transiente de cotiledones 'D'Agen' mediado por *A. tumefaciens* C58C1.** La unidad experimental para cada tratamiento quedó conformada por 3 cotiledones, donde se evaluó Número total de píxeles GUS+, Porcentaje de área GUS+, Promedio porcentaje de área GUS+ y Suma porcentaje de áreas GUS+.

Std	Control	A:OD	B:VACIO	C:SONICACION	D:AS co	Nº total px+	Prom %area+	% px azul+ trat./px totales trat.	Suma%areas+
1	26	1	VACIO	SONI	AS	0	0,00	0,00	0,00
2	26	2	VACIO	SONI	AS	0	0,00	0,00	0,00
3	26	3	VACIO	SONI	AS	295505	0,77	0,72	2,30
4	38	1	NO	SONI	AS	1,52E+06	3,47	3,53	10,40
5	38	2	NO	SONI	AS	1,87E+06	4,96	5,45	14,89
6	38	3	NO	SONI	AS	104122	0,22	0,29	0,66
7	32	1	VACIO	NO	AS	78279	0,34	0,22	1,02
8	32	2	VACIO	NO	AS	55380	0,13	0,13	0,40
9	32	3	VACIO	NO	AS	0	0,00	0,00	0,00
10	43	1	NO	NO	AS	2,10E+06	5,03	4,76	15,08
11	43	2	NO	NO	AS	77327	0,17	0,17	0,52
12	43	3	NO	NO	AS	687378	1,77	1,80	5,30
13	35	1	VACIO	SONI	NO	35744	0,09	0,08	0,27
14	35	2	VACIO	SONI	NO	3717	0,01	0,01	0,02
15	35	3	VACIO	SONI	NO	0	0,00	0,00	0,00
16	29	1	NO	SONI	NO	0	0,00	0,00	0,00
17	29	2	NO	SONI	NO	0	0,00	0,00	0,00
18	29	3	NO	SONI	NO	0	0,00	0,00	0,00
19	36	1	VACIO	NO	NO	0	0,00	0,00	0,00
20	36	2	VACIO	NO	NO	15397	0,04	0,03	0,11
21	36	3	VACIO	NO	NO	21092	0,05	0,06	0,15
22	46	1	NO	NO	NO	1,85E+06	4,99	4,92	14,96
23	46	2	NO	NO	NO	120124	0,30	0,29	0,89
24	46	3	NO	NO	NO	0	0,00	0,00	0,00

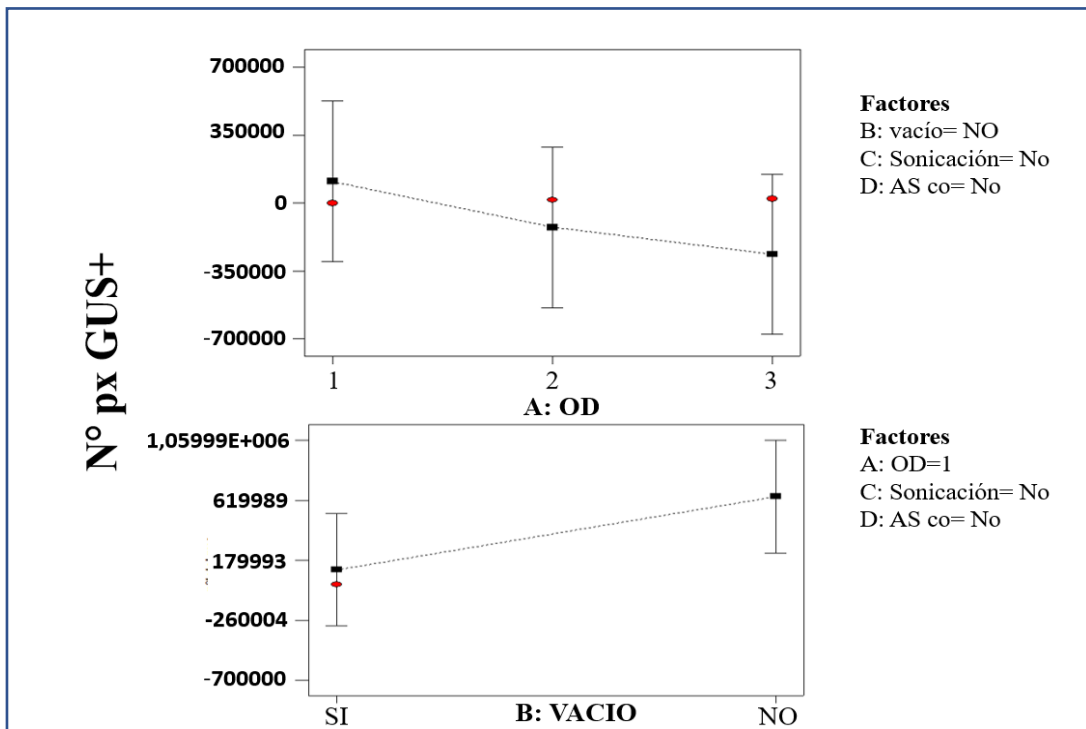
transiente en cotiledones.

Respecto a la variable Número de píxeles GUS+, se obtuvo un modelo conformado únicamente por los factores principales OD, Vacío y AS con un  $R^2$  de 0,44 y  $R^2$  ajustado de 0,32, lo que indica que el 44 % de la variación observada en los datos es explicada por el modelo. El ANOVA mostró un efecto estadísticamente significativo del factor vacío ( $p < 0,05$ ) (Tabla 8).

**Tabla 8. ANOVA para la variable N° de píxeles GUS+.**

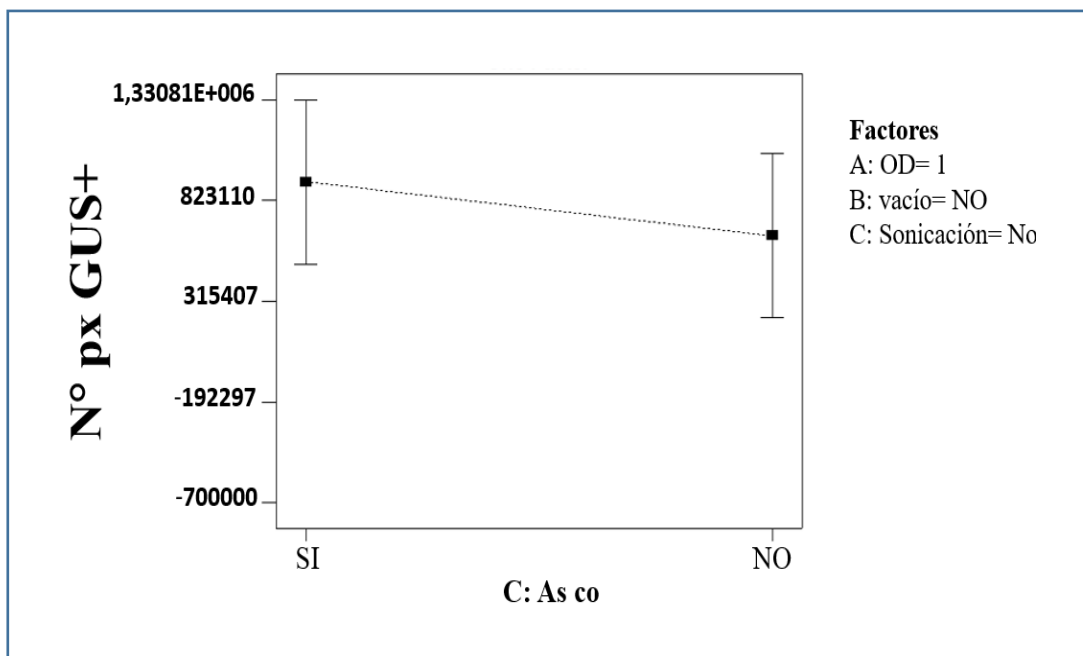
<b>Factor</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F-valor</b>	<b>p-valor</b>	
<b>Modelo</b>	4,8568E+12	4	1,2142E+12	3,61	0.0248	Significativo
A-OD	1,3696E+12	2	6,8481E+11	2,04	0.1592	
B-VACIO	2,5495E+12	1	2,5495E+12	7,59	0.0130	
D-AS co	9,3761E+11	1	9,3761E+11	2,79	0.1121	
<b>Error</b>	6,0459E+12	18	3,3588E+11			
<b>Total</b>	1,0903E+13	22				

Si bien la OD no mostró un efecto estadísticamente significativo sobre las variables respuesta ( $p > 0,05$ ), la OD<sub>600</sub> = 0,2 (OD 1) produjo un mayor N° de píxeles GUS+ respecto a las otras dos OD evaluadas (Figura 20). En cuanto a la aplicación de vacío, se observó que la ausencia de este factor durante la infección de los cotiledones con *A. tumefaciens* produjo un mayor número de píxeles GUS+ en comparación con la aplicación de vacío (Figura 20).



**Figura 20. Efecto de la OD y la aplicación de vacío sobre el N° de píxeles GUS +.**

Al igual que el factor OD, la aplicación de Acetosiringona en co-cultivo no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el N° de píxeles GUS+, pero de igual manera produjo un mayor N° de píxeles GUS+ respecto a no añadirla (Figura 21).



**Figura 21. Efecto de la OD y la aplicación de vacío sobre el N° de píxeles GUS +.**

El análisis de la expresión de GUS en términos del Porcentaje de área GUS+ reveló la misma tendencia observada en el número de píxeles GUS+; un efecto estadísticamente significativo del factor vacío ( $p < 0,05$ ) (Tabla 9). Tanto para la variable Porcentaje de Área GUS+ como para el Promedio Porcentaje de Área GUS+, los modelos explicaron alrededor del 40 % de la variabilidad observada ( $R^2 \sim 0,4$ ).

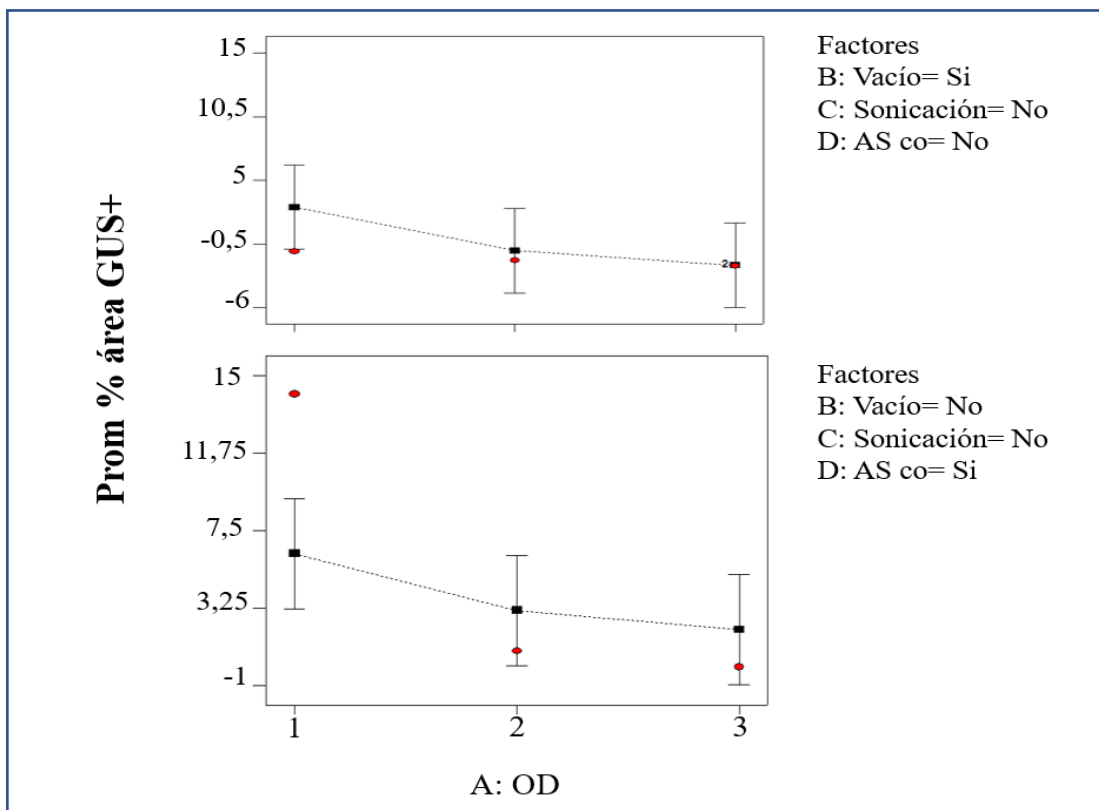
**Tabla 9. ANOVA para la variable Porcentaje de área GUS+.**

Factor	SC	GL	CM	F-valor	p-valor	
Modelo	29,77	4	7,44	3,19	0,038	Significativo
A-OD	7,47	2	3,74	1,60	0,2287	
B-VACIO	16,61	1	16,61	7,13	0,0156	
D-AS co	5,69	1	5,69	2,44	0,1357	
Error	41,96	18	2,33			
Total	71,73	22				

**Tabla 10. ANOVA para la variable Promedio del % de área GUS+.**

Factor	SC	GL	CM	F-valor	p-valor	
Modelo	29,55	4	7,39	3,34	0.0328	Significativo
A-OD	8,35	2	4,17	1,88	0.1807	
B-VACIO	15,81	1	15,81	7,14	0.0156	
D-AS co	5,40	1	5,40	2,44	0.1360	
Error	39,87	18	2,21			
Total	69,42	22				

En el gráfico del efecto de los factores (Figura 20) se puede ver claramente la tendencia mencionada: la ausencia de vacío maximiza el promedio del porcentaje de área GUS+. Además, se vuelve a observar que la OD 1, también maximiza la respuesta respecto al resto de densidades ópticas evaluadas.



**Figura 22. Efecto de la OD y la aplicación de vacío sobre el Promedio del porcentaje de área GUS+.** Los puntos rojos representan los valores de respuesta observados para cada nivel del factor OD.

Al igual que en el resto de las variables estudiadas, en la Suma del porcentaje de áreas GUS+, el factor vacío fue el único que presentó un efecto significativo (Tabla 11).

**Tabla 11. ANOVA para la variable Suma del porcentaie de áreas GUS+.**

Factor	SC	GL	CM	F-valor	p-valor	
Modelo	265,95	4	66,49	3,34	0.0328	Significativo
A-OD	75,07	2	37,54	1,88	0.1807	
B-VACIO	142,27	1	142,27	7,14	0.0155	
D-AS co	48,60	1	48,60	2,44	0.1357	
Error	358,51	18	19,92			
Total	624,46	22				

## Discusión

La transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es un proceso complejo que depende de múltiples factores. El estudio de la expresión transiente del gen reportero GUS puede ser muy útil para evaluar dichos factores y establecer las condiciones que maximicen la eficiencia de transformación. (Song *et al.*, 2011).

En este trabajo se evaluó el efecto de cuatro factores (densidad óptica bacteriana, sonicación, vacío y Acetosiringona en co-cultivo) sobre la expresión de GUS en cotiledones de ciruelo 'D'Agén'.

Respecto a la densidad óptica, la OD<sub>600</sub>= 0,2 produjo los mayores valores en todas las variables, sin ser estadísticamente significativo. Esto coincide con lo reportado por De Clercq *et al.* (2002), quienes obtuvieron mayor expresión transitoria de GUS con un inóculo en fase logarítmica temprana. Si bien es necesario confirmar los resultados obtenidos, estos sugieren que una densidad óptica baja del cultivo inicial podría favorecer la transformación transitoria de cotiledones de ciruelo.

En la evaluación de los factores, el hallazgo más sorprendente fue el efecto negativo de la aplicación de vacío durante la infección de los cotiledones, el cual disminuyó significativamente las variables repuestas analizadas asociadas a la expresión transitoria de GUS. Este resultado no concuerda con lo esperado, ya que en la bibliografía se reporta que la aplicación de vacío se presenta como un factor importante que aumenta la eficiencia de transformación mediada por *A. tumefaciens* en diversas especies vegetales (Pérez-Caselles, *et al.*, 2021). El fundamento es que la aplicación de vacío facilita la eliminación del aire presente en los tejidos intercelulares, permitiendo una mejor penetración de la suspensión bacteriana en el tejido y por lo tanto un mayor contacto bacteria-célula para la transferencia del T-DNA (Niazian *et al.*, 2017). En damasco, Pérez-Caselles *et al.* (2021) reportaron un aumento del 6 % en el número de eventos transgénicos de GFP luego de la infiltración al vacío de secciones de

hipocótilo 'Canino' durante 20 min a una presión de -600 mm Hg. De acuerdo con nuestros resultados, en ciruelo ocurre un efecto contrario, lo que resalta la importancia de poner a punto las técnicas de cultivo *in vitro* en cada especie. Además, las condiciones de experimentales del cultivo *in vitro* pueden variar de laboratorio a laboratorio, por lo que la puesta a punto de forma local resulta clave para lograr herramientas biotecnológicas eficientes. La aplicación de 15 s de sonicación tampoco aumentó los parámetros asociados a expresión transitoria de GUS, a pesar de que el daño mecánico facilita, en teoría, la entrada de la bacteria al tejido. La formación de heridas es un prerrequisito para el proceso de transformación mediante *A. tumefaciens*, ya que permite que la bacteria penetre fácilmente en el tejido y estimule también la producción de inductores de transferencia del T-DNA (Niazian *et al.*, 2017). Trabajos previos han demostrado que la sonicación incrementa los parámetros asociados a transformación transitoria, como la expresión de GFP (Gao *et al.*, 2014), y GUS (Wang, 2011), en comparación a controles sin sonicación. Gao *et al.* (2014) evidenciaron mayores niveles tanto transitorios como estables de GFP tras sonicación, con mayor intensidad y área de fluorescencia versus controles. Respecto al trabajo de Wang (2011), ellos probaron diferentes tiempos de sonicación en cotiledones de damasco, observando la máxima expresión de GUS cuando aplicaron 1 min. de sonicación (frecuencia 40 KHz). Sin embargo, notaron una reducción en la regeneración de los cotiledones expuestos a este tiempo de sonicación. Por ello, concluyeron que 30 s representaba el tiempo óptimo, mejorando los niveles de transformación transitoria sin comprometer la regeneración. Teniendo en cuenta estos tiempos, una de las posibles razones por las que la sonicación no fue efectiva en nuestro trabajo, fue el tiempo de sonicación; restaría en estudios futuros evaluar el tiempo de sonicación en la expresión transiente de GUS y en paralelo evaluar cómo afecta este factor a la regeneración de cotiledones de ciruelo 'D'Ágen', ya que de nada serviría obtener altos niveles de transformación si luego esas células transformadas no regeneran.

En cuanto al efecto combinado de la sonicación y el vacío (factor interactivo Sonicación\*Vacío), si bien se ha reportado que la combinación de ambos ha permitido mejorar la eficiencia de la transformación en muchas especies de plantas, especialmente aquellas que son recalcitrantes a la transformación mediada por *A. tumefaciens* (Track & Finer *et al.*, 1997), son pocos los trabajos que reportan el uso de sonicación y la infiltración al vacío en plantas leñosas. El efecto de ambos tratamientos se ha medido principalmente sobre las eficiencias de transformación transitoria, como por ejemplo en cotiledones de embriones cigóticos de *Pinus radiata*, logrando eficiencias de transformación transitoria del 55 % cuando los explantos fueron infiltrados al vacío durante 5 min. También se ha informado de que la infiltración al vacío es el factor más crítico que afecta a la eficiencia de la transformación transitoria en plántulas de caqui cultivadas *in vitro* y se ha descrito un sistema de transformación mediado por *Agrobacterium* altamente eficiente que utiliza sonicación seguida de infiltración al vacío durante 20 min (Charity *et al.*, 2002). En *Prunus armeniaca*, Pérez-Caselles *et al.*, (2021) reportaron que la combinación de 30 s de sonicación seguida de infiltración al vacío durante 20 minutos aumentó el número de eventos transgénicos de GFP en hipocótilos de damasco 'Canino'. Si bien son pocos los trabajos reportados, los resultados sugieren que la



combinación de sonicación e infiltración al vacío mejoraría la eficiencia de la transformación en plantas leñosas. En nuestro caso, contrario a lo reportado, no encontramos factores interactivos con efecto significativo sobre las variables evaluadas. Una posible explicación es que el tipo de explanto puede influir en la respuesta a estos tratamientos físicos. Los cotiledones podrían ser un tejido más sensible y requerir condiciones más suaves de sonicación/vacío en comparación a hipocótilos u otros explantos más "duros", por lo que en futuros ensayos se podrían evaluar distintos tiempos y condiciones de sonicación y vacío aplicados específicamente sobre cotiledones de ciruelo, teniendo en cuenta la posible sensibilidad diferencial de este tipo de explanto respecto a los reportados previamente en la literatura.

El último factor evaluado fue la aplicación de Acetosiringona durante la etapa de co-cultivo con *A. tumefaciens*. Como se mencionó anteriormente, la AS es un compuesto fenólico que se es liberado por las células vegetales dañadas y que induce la expresión de los genes de *vir* de *A. tumefaciens*, potenciando su capacidad de infección (Stachel *et al.* 1985). En nuestro ensayo, al adicionar 100  $\mu\text{M}$  de AS al medio de co-cultivo donde se colocaron los cotiledones transformados, se observó una tendencia a obtener valores más altos en las variables asociadas a la expresión transitoria de GUS en comparación con el tratamiento sin AS. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Un resultado similar fue reportado por Mante *et al.* (1991), donde no encontraron un efecto significativo al agregar 50  $\mu\text{M}$  de AS en la transformación de GUS en hipocótilos de ciruelo. Una posible explicación de por qué no se detectaron diferencias significativas podría estar relacionada con el tamaño de la muestra evaluada. Si bien se observó una tendencia hacia valores más altos con AS, es posible que el número de cotiledones no haya sido suficiente para detectar esas diferencias como significativas. De hecho, la tendencia sugiere que la AS podría favorecer la transformación. Teniendo en cuenta estos resultados, en futuros ensayos sería recomendable evaluar un rango más amplio de concentraciones de AS, por ejemplo de 0 a 100  $\mu\text{M}$  (0, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$ ), utilizando un mayor número de cotiledones. También se podría probar concentraciones superiores a 100  $\mu\text{M}$ , ya que en la literatura se reportan niveles muy variables, desde 20  $\mu\text{M}$  (Tian *et al.*, 2009) hasta 500  $\mu\text{M}$  (Gao *et al.*, 2010).

Por otro lado, es posible que la adición de AS durante la inducción previa al co-cultivo sea suficiente para estimular los genes *vir*, haciendo innecesaria su aplicación en la etapa de co-cultivo (James *et al.*, 1993). Alternativamente, bajo nuestras condiciones experimentales, el tejido vegetal pudo liberar niveles adecuados de compuestos fenólicos para activar los genes *vir*, por lo que la AS exógena no tendría un efecto adicional.

Uno de los principales hallazgos de este ensayo fue la detección de actividad GUS endógena en los cotiledones control de ciruelo 'D'Agen'. Esto resulta llamativo, ya que si bien se ha reportado en otras especies (Kosugi *et al.*, 1990; Hodal *et al.*, 1992) no se ha encontrado reportes previos sobre la presencia de esta enzima en tejidos de *Prunus* spp. La presencia de esta actividad en los controles generó una señal de "ruido" no esperada, que

condicionó la forma de determinación de la actividad GUS en los tratamientos experimentales. Su expresión podría estar enmascarando la actividad GUS proveniente de la transformación mediada por *A. tumefaciens*, dado que ambas generan el mismo producto de reacción (precipitado de color azul). En este sentido, también evidenciamos actividad GUS endógena en hojas del mismo cultivar, aunque con un patrón distinto: mientras que la enzima recombinante exógena se expresa en forma de spots (puntos delimitados) en la lámina foliar, la actividad endógena aparece sobre las nervaduras. Esta diferencia nos permitió distinguir ambas actividades cuando analizamos la transformación transitoria en hojas.

Frente a este desafío, adaptamos un método de análisis digital de imágenes para cuantificar y distinguir la actividad enzimática endógena y recombinante utilizando el software ImagJ. Este software ha sido utilizado en trabajos previos para cuantificar la expresión del GUS (Béziat *et al.*, 2017) y se basa en que la intensidad de tinción azul en los tejidos se correlaciona positivamente con los niveles de expresión de GUS.

Para poder determinar el efecto de los factores y encontrar las condiciones que maximicen las variables asociadas a la transformación transiente de GUS, en futuros ensayos será necesario implementar estrategias para reducir o eliminar la actividad GUS endógena en los tejidos blanco, especialmente en cotiledones. Asimismo, con la optimización de este procedimiento de cuantificación y el aumento del número de explantos por tratamiento, se podría determinar con mayor precisión el efecto de los factores claves sobre la eficiencia de transformación en futuros ensayos de transformación.

## 6 CONCLUSIONES

---

En este trabajo final de licenciatura se desarrollaron una serie de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de frutales. Desde la construcción de vectores, la obtención de cepas de *A. tumefaciens* transformadas con plásmidos de interés, protocolos de tinción y análisis de GUS, así como protocolos de transformación para ciruelo avanzando en el conocimiento de los factores claves. Del trabajo presentado en esta tesina se concluye que:

- Se obtuvo un plásmido del tamaño esperado para el vector pMDC32-ptFT1 luego de los ensayos de clonación. Sin embargo, no se pudo confirmar mediante PCR que dicho plásmido contuviera efectivamente el gen *ptFT1* clonado en el vector de expresión pMDC32. De confirmarse la identidad del mismo, se podrá implementar el sistema Fastrack breeding en frutales como ciruelo y duraznero.
- Se determinó que una concentración de 5 mg/l de Higromicina es la óptima a utilizar en ensayos de transformación genética de cotiledones de ciruelo 'D'Agen'. Esta concentración representa el mejor equilibrio para utilizarse como agente de selección al ser capaz de inhibir parcialmente la regeneración de brotes tipo II a partir de tejido no transformado, sin afectar tan severamente la viabilidad del explanto.
- Se logró la transformación de todas las cepas de *A. tumefaciens* con el vector pCAMBIA2301. Estas obtenciones permitirán, en ensayos futuros, determinar y comparar la capacidad de transformación mediada por cada una de las cepas mediante la evaluación de la expresión del gen marcador GUS en diferentes tejidos transformados, información de relevancia para la estandarización de un protocolo de transformación en el laboratorio de Biotecnología de la EEA SAN PEDRO.
- Se determinó que las cinco cepas de *A. tumefaciens* evaluadas fueron sensibles a las concentraciones de 100 mg/l de Timetina y 75 mg/l de Cefotaxima, observándose una inhibición completa del crecimiento bacteriano.
- Se logró la transformación transiente de hojas de ciruelo 'D'Agen' infectadas con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*. A partir de un análisis de estadística descriptiva, se detectó que el mayor número de eventos de transformación se observó en el tratamiento con sonicación. Para confirmar el efecto de los factores evaluados sobre la eficiencia de transformación transitoria en hojas de esta especie se requerirán de ensayos con un mayor número de explantos.
- Se logró la transformación transiente de cotiledones de ciruelo 'D'Agen' infectados con la cepa C58C1 de *A. tumefaciens*. Se obtuvieron modelos parciales para el Número total de píxeles GUS+, Porcentaje de área GUS+, Promedio porcentaje de área GUS+ y para la Suma porcentaje de áreas GUS+ que explican el 40 % de la variabilidad

observada, lo que se refleja en un valor obtenido bajo para la función deseabilidad (D). Sin embargo, en función de las condiciones de estudio y los resultados obtenidos, concluimos que se obtiene mayor tejido transformado en cotiledones cuando estos se someten a infección con *A. tumefaciens* en ausencia de vacío.

## BIBLIOGRAFÍA

---

Ainsley, P., Collins, G., & Sedgley, M. (2001). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated gene transfer and the selection of transgenic calli in paper shell almond (*Prunus dulcis* Mill.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(5), 522-528.

Abbott, A. G., Arús, P., & Scorza, R. (2008). Chapter 4: Genetic Engineering and Genomics. In *The Peach: Botany, Production and Uses* (p. 85).

Abdollahi, M. R., Memari, H. R., & Van Wijnen, A. J. (2011). Factor affecting the endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity in rapeseed haploid cells: how to avoid interference with the Gus transgene in transformation studies. *Gene*, 487(1), 96-102.

Béziat, C., Kleine-Vehn, J., & Feraru, E. (2017). Histochemical staining of  $\beta$ -glucuronidase and its spatial quantification. *Plant Hormones: Methods and Protocols*, 73-80.

Burgos, L., & Alburquerque, N. (2003). Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves. *Plant Cell Reports*, 21, 1167-1174.

Canli, F. A., & Tian, L. (2009). Assessment of regeneration and transient expression factors for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Prunus salicina* Lindl. *European Journal of Horticultural Science*, 74(2), 66.

Cervera, M. (2004). Histochemical and fluorometric assays for uidA (GUS) gene detection. *Transgenic plants: Methods and protocols*, 203-213.

Chakraborty, N., Chakraborty, P., Sen, M., & Bandopadhyay, R. (2020). Choice of Explant for Plant Genetic Transformation. *Methods in Molecular Biology*, 2124, 107–123. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_5)

Charity, J. A., Holland, L., Donaldson, S. S., Grace, L., & Walter, C. (2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum-infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 51-60.

Costa, M. G. C., Nogueira, F. T. S., Figueira, M. L., Otoni, W. C., Brommonschenkel, S. H., & Cecon, P. R. (2000). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports*, 19, 327-332.

Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology* 133: 462-469. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027979>

de Oliveira, M. L. P., Febres, V. J., Costa, M. G. C., Moore, G. A., & Otoni, W. C. (2009). High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 28, 387-395.

Díaz Granados, C., & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat Ver. 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Gao, M., Kawabe, M., Tsukamoto, T., Hanada, H., & Tao, R. (2010). Somatic embryogenesis and Agrobacterium-mediated transformation of Japanese apricot (*Prunus mume*) using immature cotyledons. *Scientia Horticulturae*, 124, 360

Gao-Takai, M., & Tao, R. (2014). Improving infection efficiency of Agrobacterium to immature cotyledon explants of Japanese apricot (*Prunus mume*) by sonication treatment. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 83(2), 108-116.-367.

Gonzalez Padilla, I. M., Webb, K., & Scorza, R. (2003). Early antibiotic selection and efficient rooting and acclimatization improve the production of transgenic plum plants (*Prunus domestica* L.). *Plant Cell Reports*, 22(1), 38–45. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0648-z>

Hada, A., Krishnan, V., Mohamed Jaabir, M. S., Kumari, A., Jolly, M., Praveen, S., & Sachdev, A. (2018). Improved *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] following optimization of culture conditions and mechanical techniques. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54, 672-6.

Hodal, L., Bocharadt, A., Nielsen, J. E., Mattsson, O., & Okkels, F. T. (1992). Detection, expression and specific elimination of endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity in transgenic and non-transgenic plants. *Plant Science*, 87(1), 115-122.

IDR (INSTITUTO DE DESARROLLO RURAL, Mendoza – Argentina). 2015. Informe por producto: Panorama del Sector Ciruela Deshidratada de Mendoza. URL: <http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2016/04/Panorama-Ciruela-deshidratada-2015-.pdf/>.

James, D. J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri, P., Viss, P., & Dandekar, A. M. (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance Agrobacterium-mediated transformation of apple. *Plant Cell Reports*, 12, 559-563. 88.

Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3901-3907.

Joshi, M., Niu, C., Fleming, G., Hazra, S., Chu, Y., Nairn, C. J., ... & Ozias-Akins, P. (2005). Use of green fluorescent protein as a non-destructive marker for peanut genetic transformation. *In vitro cellular & developmental biology-Plant*, 41, 437-445.

Karimi, M., Depicker, A., & Hilson, P. (2007). Recombinational cloning with plant gateway vectors. *Plant Physiology*, 145(4), 1144-1154.

Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: A biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(4), 571-589. <https://doi.org/10.1517/17460441.2.4.571>

Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J., & Komari, T. (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant physiology*, 145(4), 1155-1160.

Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K., & Arai, Y. (1990). An improved assay for  $\beta$ -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous  $\beta$ -glucuronidase activity. *Plant Science*, 70(1), 133-140.

Kumar, A., Kumar Sharma, M., Farooq Wani, T., Sharma, A., & Nyorak, G. (2022). Riqueza varietal de Prunus Species. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99048>

Laimer da Câmara Machado, M., da Câmara Machado, A., Hanzer, V., Weiss, H., Regner, F., Steinkellner, H., Mattanovich, D., Plail, R., Knapp, E., Kalthoff, B., & Katinger, H.W.D. (1992). Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Reports*, 11, 25-29.

Martínez-Gómez, P. (2017). Scientific prediction and prescription in plant genetic improvement as an applied science of design: The case of *Prunus* breeding. *Acta Agronómica*, 66(1), 115-127.

Miguel, C. M., & Oliveira, M. M. (1999). Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by Agrobacterium mediated transformation of leaf explants. *Plant Cell Reports*, 18, 387-393.

Mikhailov, R. V., & Dolgov, S. V. (2005, October). Transgenic plum (*Prunus domestica* L.) plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation of leaf explants with various selective agents. In *International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species 738* (pp. 613-623).

Milošević, T., & Milošević, N. (2018). Plum (*Prunus* spp.) Breeding. In J. Al-Khayri, S. Jain & D. Johnson (Eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (pp. 1-21). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-91944-7_5)

Nauerby, B., Billing, K., & Wyndaele, R. (1997). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 123(1-2), 169-177.

Niazian, M., Noori, S. S., Galuszka, P., & Mortazavian, S. M. M. (2017). Tissue culture-based *Agrobacterium*-mediated and in planta transformation methods. *Soil and Water Research*, 53(4), 133-143.

Nkaa, F. A., & Okpe, A. O. (2021). Comparative Review of Plant Transformation Techniques. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 24(10), 1-18.

Nyaboga, E., Tripathi, J. N., Manoharan, R., & Tripathi, L. (2014). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): An important tool for functional study of genes and crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 5, 463.

Padilla, I. M., Webb, K., & Scorza, R. (2003). Early antibiotic selection and efficient rooting and acclimatization improve the production of transgenic plum plants (*Prunus domestica L.*). *Plant cell reports*, 22, 38-45.

Padilla, I. M., Golis, A., Gentile, A., Damiano, C., & Scorza, R. (2006). Evaluation of transformation in peach *Prunus persica* explants using green fluorescent protein (GFP) and beta-glucuronidase (GUS) reporter genes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84, 309-314.

Pérez-Caselles, C., Faize, L., Burgos, L., & Albuquerque, N. (2021). Improving adventitious shoot regeneration and transient *Agrobacterium*-mediated transformation of apricot (*Prunus armeniaca L.*) hypocotyl sections. *Agronomy*, 11(7), 1338.

Petri, C. (2005). Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca L.*), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas (Tesis de doctorado). Universidad de Murcia Departamento de Biología Vegetal, Murcia.

Petri, C., Albuquerque, N., Faize, M., Scorza, R., & Dardick, C. (2018). Current achievements and future directions in genetic engineering of European plum (*Prunus domestica L.*). *Transgenic research*, 27, 225-240.

Piagnani, M. C., & Chiozzotto, R. (2010). Shoot Regeneration, in Vitro Performances of Regenerated Shoots and Transient Expression in Morphogenic Explants in *Prunus avium* cultivar 'Burlat C1'. *European Journal of Horticultural Science*, 75(3), 132-138.

Potter, D. (2012). Basic information on the stone fruit crops. In *Genetics, genomics and breeding of stone fruits* (pp. 1-21).



Pratesi, D., Paris, R., Negri, P., & Scotti, A. (2003, September). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation competence of different *Prunus* explants, as revealed by GUS expression. In *XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics* 663 (pp. 495-498).

Ricci, A., Sabbadini, S., Prieto, H., Padilla, I. M., Dardick, C., Li, Z., Scorza, R., Limera, C., Mezzetti, B., Perez-Jimenez, M., Burgos, L., & Petri, C. (2020). Genetic Transformation in Peach (*Prunus persica* L.): Challenges and Ways Forward. *Plants*, 9(8), 971. <https://doi.org/10.3390/plants9080971>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Somogyi L. P., 2005. Chapter 21: Plums and Prunes. *Processing Fruits Science and Technology* Second Edition. Editors Barret D. M., Somogyi L. P., Ramaswami H. CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. ISBN 0-8493-1478-X. 841 pp.

Song, G. Q., Prieto, H., & Orbovic, V. (2019). *Agrobacterium*-mediated transformation of tree fruit crops: Methods, progress, and challenges. *Frontiers in Plant Science*, 10, 226.

Song, Y., Canli, F. A., Meerja, F., Wang, X., Henry, H. A., An, L., & Tian, L. (2011). Evaluation of Factors Affecting European Plum (*Prunus domestica* L.) Genetic Transformation. In *Genetic Transformation*. IntechOpen.

Song, G. Q., & Sink, K. C. (2006). Transformation of Montmorency sour cherry (*Prunus cerasus* L.) and Gisela 6 (*P. cerasus* × *P. canescens*) cherry rootstock mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 25, 117-123.

Tian, L., Canli, F. A., Wang, X., & Sibbald, S. (2009). Genetic transformation of *Prunus domestica* L. using the hpt gene coding for hygromycin resistance as the selectable marker. *Scientia Horticulturae*, 119(3), 339-343.

Traore, S. M., & Zhao, B. (2011). A new binary vector using Gateway® technology to enable direct selection of recombinant clones in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Methods*, 7, 42. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-7-42>

Trick, H. N., & Finer, J. J. (1997). SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6, 329-336.)

Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: Biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 147-154.

Valderrama Fonseca, A. M., Arango Isaza, R., & Afanador Kafuri, L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "ingeniería genética natural aplicada". *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2569-2585.

Verma, S., Kumar, A., & Modgil, M. (2023). Impact of cefotaxime and kanamycin on in vitro regeneration via *Agrobacterium* mediated transformation in apple cv. Red Chief. *Plant Physiology Reports*, 1-9.

Wang, H (2011). Desarrollo de un protocolo de transformación genética de albaricoquero independiente del genotipo (Tesis de doctorado). Universidad de Murcia Departamento de Biología Vegetal, Murcia.

Xu, R., & Qingshun, L. Q. (2008). Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway® TOPO vector system. *Plant methods*, 4, 1-7. C., Huang, S., Chen, C. *et al.*, (2002). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71, 147–155. <https://doi.org/10.1023/A:1019983107509>

Zhebentyayeva, T., Shankar, V., Scorza, R., Callahan, A., Ravelonandro, M., Castro, S., ... & Dardick, C. (2019). Genetic characterization of worldwide *Prunus domestica* (plum) germplasm using sequence-based genotyping. *Horticulture Research*, 6.

# ANEXOS

---

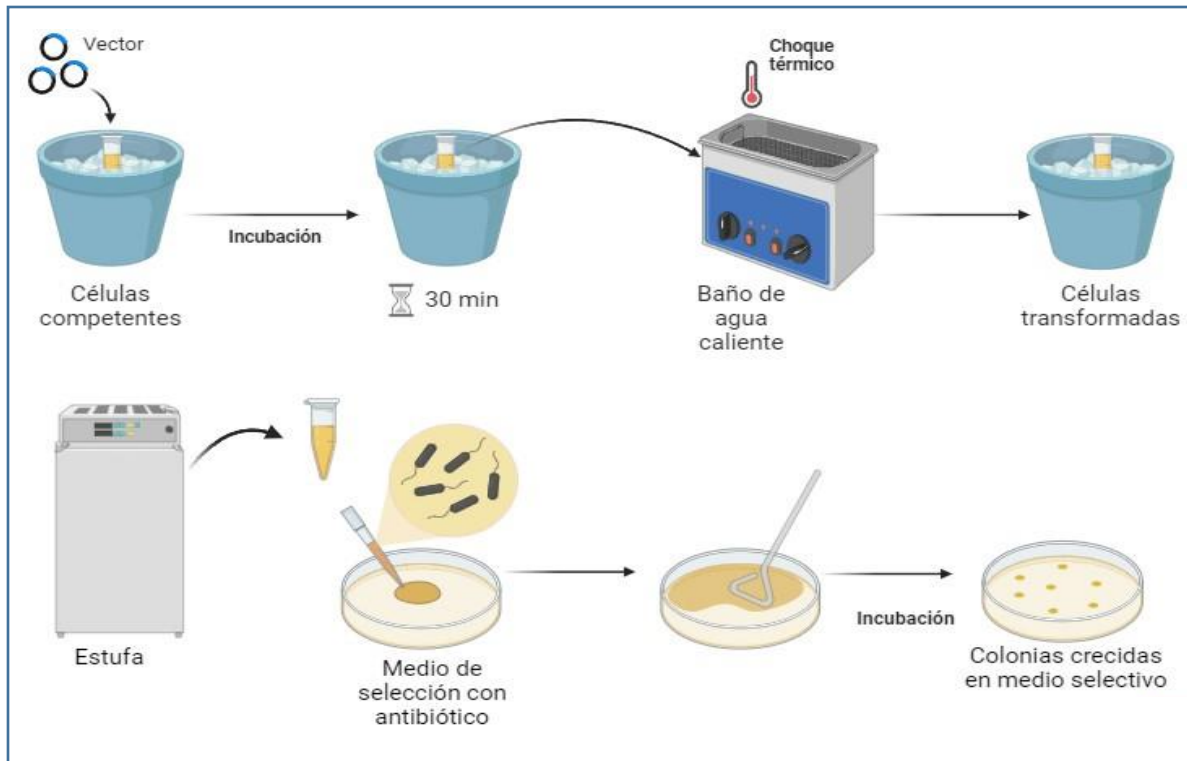
## Anexo 1. Preparación de *E. coli* DH5 $\alpha$ químicamente competentes

- 1) Inocular una colonia bacteriana en 10 ml de LB fresco e incubar ON a 37 °C hasta una OD<sub>600</sub> = 0,4-0,7.
- 2) Incubar las bacterias durante 10 min en hielo.
- 3) Centrifugar a 4000 rpm por 7 min a 5 °C.
- 4) Descartar el sobrenadante y resuspender gentilmente el pellet en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M.
- 5) Incubar la suspensión por 10 min en hielo.
- 6) Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min a 5 °C y luego de descartar el sobrenadante.
- 7) Añadir 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío.
- 8) Distribuir las células competentes en alícuotas de 100  $\mu$ l en microtubos de 1,5 ml tipo *Eppendorf* y conservar a -80 °C.

## Anexo 2. Transformación genética de *E. coli* mediante choque térmico

- 1) Tomar 100  $\mu$ l de bacterias competentes e incubar en hielo hasta que se descongelen.
- 2) Añadir 5-20 ng de ADN plasmídico e incubar durante 30 min en hielo.
- 3) Incubar durante 45 s a 42 °C (choque térmico).
- 4) Añadir 1 ml de medio LB líquido sin antibiótico e incubar a 37°C en agitación suave durante 60 min.
- 5) Centrifugar a 4000 x g durante 5 min.
- 6) Resuspender el sedimento celular en 100  $\mu$ l de medio LB.
- 7) Esparcir con espátula de Drigalski la suspensión bacteriana sobre una placa con medio LB con antibiótico e incubar a 37 °C ON.

El esquema de la figura 23 ilustra los pasos del protocolo de transformación *E. coli* y de *A. tumefaciens* (Anexo 4) utilizado en este trabajo.



**Figura 23. Esquema de la transformación por choque térmico de células químicamente competentes.**

### Anexo 3. Preparación de *A. tumefaciens* químicamente competentes

- 1) Inocular una colonia bacteriana en 5ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes e incubar ON a 28 °C.
- 2) Inocular 50 ml de medio LB (con los antibióticos correspondientes) con 500 µl del cultivo del punto 1. Dejar crecer a 28 °C en agitación ON hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0,5-1,0$ .
- 3) Incubar en hielo durante 10 min.
- 4) Centrifugar a 4000 rpm durante 7 min a 4 °C en tubos de centrifugación estériles.
- 5) Descartar el sobrenadante y resuspender gentilmente el pellet en 1 ml de  $CaCl_2$  20 mM frío.
- 6) Centrifugar a 2500 rpm durante 5 min a 5 °C y luego descartar el sobrenadante.

- 7) Añadir 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 20 mM frío y resuspender suavemente el sedimento celular.
- 8) Distribuir las células competentes en alícuotas de 100 µl en microtubos 1,5 ml tipo *Eppendorf* y conservar a -80 °C.

#### **Anexo 4. Transformación genética de *A. tumefaciens* mediante choque térmico**

- 1) Tomar 100 µl de bacterias competentes e incubar en hielo hasta que se descongelen.
- 2) Añadir 5-10 µl de ADN plasmídico e incubar durante 30 min en hielo.
- 3) Incubar durante 5 min a 37 °C (choque térmico).
- 4) Añadir 1 ml de medio LB líquido sin antibiótico e incubar a 37°C en agitación suave durante 2 h.
- 5) Centrifugar a 4000 x g durante 5 min.
- 6) Resuspender el sedimento celular en 100 µl de medio LB.
- 7) Esparcir con espátula de Drigalski la suspensión bacteriana sobre una placa con medio LB con antibiótico e incubar a 28 °C durante dos noches.

#### **Anexo 5. Detección y evaluación de GUS**

##### **Reacción histoquímica**

El Buffer para la reacción GUS consistió en una disolución con las siguientes concentraciones finales: Buffer de reacción GUS (0,8 mM X-Gluc en DMSO, 100 mM buffer fosfato pH 7, 10 mM EDTA, 2 mM ferrocianuro de potasio, 2 mM ferricianuro de potasio, 1 µl/ml Tritón X-100).

Para realizar el análisis histoquímico se siguió el siguiente protocolo:

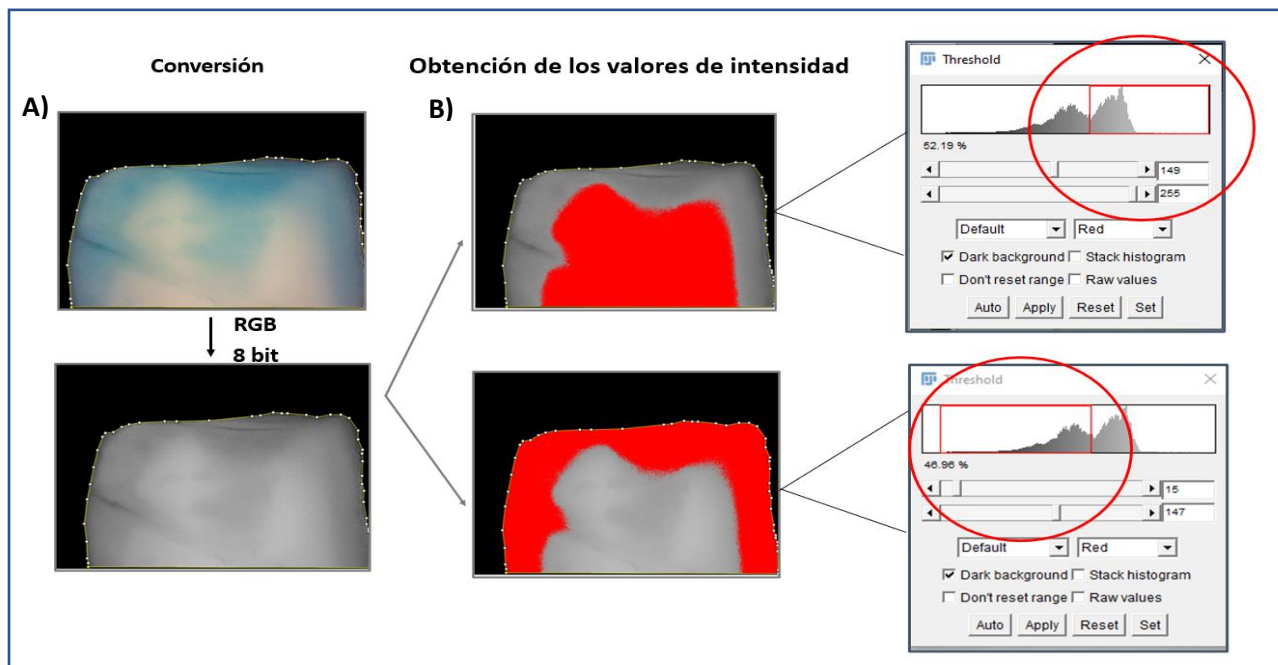
- 1) Retirar los explantos del medio de co-cultivo y realizar dos lavados con el buffer de reacción sin el reactivo X-Gluc.
- 2) Transferir los explantos a pequeños frascos de vidrio e incubar en el buffer de reacción GUS. Sellar con film para evitar la evaporación e incubar en estufa durante ON a 37 °C en oscuridad.
- 3) Lavar con etanol 70 %. En el caso de las hojas, realizar los lavados necesarios para producir la decoloración de la clorofila presente en los tejidos y poder observar las zonas transformadas con mayor claridad.

- 4) Evaluar visiblemente la presencia de precipitado azul sobre el tejido como indicador de la actividad GUS.

### Procesamiento y extracción de datos

En la figura 24 se muestra parte del análisis digital de imágenes mediante el software ImageJ, el cual permitió obtener los valores de intensidad de píxeles a partir de las imágenes de los cotiledones. A la derecha de la Figura, señalado con el círculo rojo, se encuentra el histograma que muestra la distribución de frecuencias de los valores de intensidad de los píxeles.

Hacia la derecha del histograma se ubican los píxeles con mayores valores de intensidad. Se observa que al seleccionar estos píxeles y comparar con la imagen original RGB, corresponden a la zona del cotiledón donde no hay tinción azul o esta es de menor intensidad. Por el contrario, al seleccionar los valores que se encuentran hacia la izquierda del histograma, es decir aquellos de menor valor de intensidad, la zona del cotiledón seleccionada presenta la mayor intensidad de tinción azul, comparando con la imagen RGB original.



**Figura 24. Procesamiento de las imágenes de cotiledones mediante el software ImageJ** A) Conversión de la imagen original (RGB) a 8 bit. B) Obtención de los valores de intensidad. Los círculos rojos señalan el histograma con distintos valores de intensidad.

## **Protocolo de ImageJ para el análisis de cotiledones**

### **Medición de cotiledones de tratamientos control:**

- 1) Abrir la imagen del control en ImageJ mediante el comando "File → Open..."
- 2) Convertir la imagen RGB a 8 bits mediante el comando "Image → Type → 8-bit", para trabajar con una escala de grises.
- 3) Realizar un análisis exploratorio de la imagen mediante el comando "Image → Adjust → Threshold". Probar el umbral que arroja automáticamente el software y ajustar manualmente en caso de ser necesario.
- 4) Delimitar la región de interés (ROI) mediante la herramienta de Selección libre.
- 5) Comparar la imagen con la imagen original (RGB) y modificar el umbral mediante el comando "Image → Adjust → Threshold" hasta delimitar las zonas azules/celestes, que quedarán destacadas en color rojo. Esta región quedará delimitada por los valores de umbral mínimo y máximo.

### **Medición de la zona de coloración azul en controles:**

- 6) Realizar la medición de la zona azul de cotiledón control a través de "Histogram". Previo a la medición, utilizar el comando "Analyze → Set Measurements → Limit to threshold" para realizar el análisis únicamente en la zona definida por el umbral en la zona delimitada.
- 7) Utilizar el comando "Analyze → Histogram". Registrar los valores obtenidos, incluyendo los valores de intensidad y el número de píxeles utilizando el comando "Edit → Select All → Edit → Copy".

### **Medición de la zona total del cotiledón:**

- 8) Establecer un máximo de umbral de 255 antes de obtener el histograma para obtener todos los datos de intensidad a partir del mínimo. Luego utilizar el comando "Analyze → Histogram" y registrar valores como en el punto 7.

Repetir los pasos 1-7 para todas las imágenes de los tratamientos control.

### **B- Medición de cotiledones de tratamientos "GUS"**

- 1) Abrir la imagen en ImageJ mediante el comando "File → Open..." Prestar atención a las áreas con coloración azul, indicativas de una posible transformación, y evitar la medición de áreas que no deben ser consideradas.
- 2) Convertir la imagen RGB a 8 bits mediante el comando "Image → Type → 8-bit".
- 3) Realizar un análisis exploratorio de la imagen mediante el comando "Image → Adjust → Threshold". Probar el umbral que arroja automáticamente el software y ajustar manualmente en caso de ser necesario, disminuyendo el valor umbral hasta que quede cubierta el área completa. En este punto queda definido el valor de umbral mínimo.

### **Medición del área total del cotiledón**

- 4) A partir de la imagen donde quedó establecido el umbral, seleccionar la ROI mediante la herramienta de Selección libre. Delimitar la zona a medir evitando que queden dentro, zonas del fondo que estuvieran coloreadas de rojo.
- 5) Utilizar "Analyze → Set Measurements → Limit to threshold". Luego medir mediante el comando "Analyze → Histogram". De esta forma se obtendrá el número total de píxeles que comprende el cotiledón (para ese umbral establecido) y quedarán a fuera zonas del fondo que pudiera verse también destacadas en color rojo.
- 6) A través de la ventana de Histogram, registrar los valores obtenidos, incluyendo los valores de intensidad y el número de píxeles utilizando el comando Edit → Select All → Edit → Copy. Además, registrar el valor de Count, que corresponde al número total de píxeles.

### **Análisis de la zona azul del cotiledón**

- 7) Comparar la imagen con la imagen original (RGB) y ajustar el umbral mediante el comando "Image → Adjust → Threshold" hasta delimitar las zonas azules/celestes, que quedarán destacadas en color rojo. Esta región quedará delimitada por los valores de umbral mínimo y máximo. El objetivo es delimitar la zona en donde teóricamente se produjo la transformación.
- 8) Abrir la ventana de Histogram y registrar los valores obtenidos.

### **Medición del número de píxeles y área de la zona transformada**



9) Ajustar el valor umbral indicando un valor mínimo (determinado en el paso 3), y como valor máximo indicar el valor umbral mínimo registrado para el control correspondiente. Los píxeles con valores de intensidad comprendidos entre este rango de umbral serán considerados como píxeles positivos (+) para la transformación.

10) Realizar la medición mediante “Analyze → Histogram”. A través de la ventana de “Histogram”, registrar el valor de Count y los valores de intensidad de píxeles.

### **Armado de tabla Excel**

Para registrar los valores obtenidos en el análisis, armar una tabla con las siguientes columnas:

Tratamiento: indicar el número de tratamiento

Tipo: si es control o GUS

Cotiledón: número de cotiledón, que tomará como valores 1,2 o 3

Foto: número de foto analizada

Superficie: que cara del cotiledón fue analizada, es decir que podrá ser adaxial o abaxial

Zona: representa qué zona del cotiledón fue analizada. Esta podrá ser:

- Total, cuando los datos de intensidad de píxeles correspondan al total de la superficie el cotiledón.
- Azul, zona que tiene coloración azul, ya sea en el control o en un tratamiento de transformación
- Azul+, únicamente en tratamientos de transformación que dieran positivo para GUS (ver Item B:

Medición de Tratamientos GUS)

Min. Umbral: el número min de umbral considerado para obtener los datos del histograma.

Max. Umbral: el número máximo de umbral considerado para obtener los datos del histograma.

Intensidad: con valores de 0 a 255

FA (frecuencia absoluta): número de píxeles para cada valor de intensidad.

