

**OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE REGENERACIÓN *IN VITRO* Y TRANSFORMACIÓN  
GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EN *LOTUS TENUIS***

Trabajo Final de Grado  
de la alumna



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

Pergamino, 6 de diciembre de 2024

**OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS DE REGENERACIÓN *IN VITRO* Y TRANSFORMACIÓN  
GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EN *LOTUS TENUIS***

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**FLORENCIA GISELLE GUTIÉRREZ**

Aprobada por el Tribunal Evaluador

María Aurora Maciel  
**Evaluador/a**

María Laura Federico  
**Evaluador/a**

Erika Mroginski  
**Evaluador/a**

María Lorena Roldán  
**Co-Director/a**

María Agustina Affinito  
**Director/a**

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

Pergamino, 6 de diciembre de 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires por brindarme formación de calidad y por convertirse en mi segunda casa durante estos años.

A mi directora Agos, por estar siempre disponible para responder mis dudas, por confiar en mí y transmitirme seguridad. A mi codirectora Lore, por su paciencia al explicarme cada detalle y por su buena predisposición.

A los integrantes del laboratorio de biotecnología de la EEA INTA Pergamino por permitirme compartir el espacio y por su amabilidad.

A mi docente de secundaria, Marisol, que despertó mi interés por la Genética. A mis docentes de la facu, sobre todo a aquellos que confiaron en mí para ser ayudante, por permitirme participar y por brindarme herramientas, principalmente a Susi y a Majo.

A mis padres, hermanos y abuelos, por apoyarme durante toda la carrera y por estar presentes con sus buenos deseos antes de cada examen. A mi mamá y a mi abuela, por sus mensajes a diario. A mis tíos y primos por estar presentes a la distancia. A Nico, por esperarme con tanta felicidad después de cada viaje. A Reina, por ser mi compañera de cursada virtual durante la pandemia.

A mis facuamigos, por los días de estudio, mates y viajes compartidos. A Viqui, por brindarme un hogar en Junín y por su compañía durante mi primer año. A Joha, por festejar cada uno de mis logros como si fuera suyo. A Cande, por ser mi compañera de cursada hasta el último día. Gracias por ser incondicionales.

A mis amigos de siempre: Sole, Peti, Diego, Romi y Meli, por seguir presentes a lo largo de los años.

A mis compañeros de trabajo, en especial a Cin, por su apoyo en la última parte de este recorrido.

Y a todas las personas que, de una y otra forma, estuvieron presentes en esta etapa.

## PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Gutiérrez, F.G., López Miró, D., Roldán, M. L., Affinito M.A. (2024). Regeneración *in vitro* y transformación de *Lotus tenuis*: efecto del genotipo, el ambiente de cultivo y la cepa bacteriana. III Congreso Multidisciplinario de la UNNOBA. Junín, Argentina.
- Gutiérrez, F.G., López Miró, D., Roldán, M. L., Affinito, M. A., Díaz Paleo, A.H. (2023). Regeneración y elongación de tallos *in vitro* a partir de un genotipo de *Lotus tenuis* cultivado en tres ambientes. LI Congreso Argentino de Genética y I Jornadas Regionales SAG-CENTRO. Río Cuarto, Argentina.
- Gutiérrez, F.G., López Miró, D., Roldán, M. L., Affinito M.A. (2023). La regeneración *in vitro* de *Lotus tenuis* depende del genotipo utilizado y del ambiente de cultivo de la fuente de explante. VIII Jornada de Jóvenes Investigadores de la UNNOBA. Pergamino, Argentina.
- Gutiérrez, F.G., López Miró, D., Decker, V., Affinito, M.A., Roldán, M.L. (2023). Eficiencia de transferencia de ADN de distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación de *Lotus tenuis*. XIV Simposio Redbio Argentina “Biotecnología para un mundo en cambio”. Buenos Aires, Argentina.
- Gutiérrez, F.G., Roldán, M.L., Affinito, M.A., Díaz Paleo, A.H. (2022). Regeneración y elongación de tallos *in vitro* de cinco genotipos de *Lotus tenuis*. I Simposio de Ciencias Agrarias de INTA “Innovando Ciencia: Nuevas tecnologías aplicadas al mejoramiento genético”. Modalidad virtual.
- Gutiérrez, F.G., Affinito, M. A., Roldán, M. L., Maciel, M. A., Díaz Paleo, A. H. (2022). Optimización de técnicas de regeneración *in vitro* y transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en *Lotus tenuis* (Wald et. Kit). L Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA. Corrientes, Argentina.



4.3.3. Transformación de <i>L. tenuis</i> .....	32
4.3.3.1. Crecimiento y preparación de <i>A. tumefaciens</i> .....	32
4.3.3.2. Preparación de los folíolos de <i>L. tenuis</i> y co-cultivo con <i>Agrobacterium</i> .....	33
4.3.3.3. Visualización de la transferencia del ADN-T mediante la técnica histoquímica de <i>GUS</i> .....	35
4.3.3.4. Evaluación de la sobrevivencia de los explantes post-transformación .....	36
4.4. Análisis estadístico .....	36
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Regeneración y elongación <i>in vitro</i> de distintos genotipos de <i>L. tenuis</i> .....	39
5.1.1. Regeneración <i>in vitro</i> .....	39
5.1.2. Elongación de tallos .....	43
5.2. Regeneración y elongación <i>in vitro</i> del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> crecido en distintos ambientes .....	47
5.2.1. Regeneración <i>in vitro</i> .....	47
5.2.2. Elongación de tallos .....	50
5.3. Transformación de <i>L. tenuis</i> mediante <i>A. tumefaciens</i> .....	54
5.3.1. Transformación bacteriana .....	54
5.3.2. Transformación de <i>L. tenuis</i> .....	55
5.3.2.1. Visualización de la transferencia del ADN-T mediante la técnica histoquímica de <i>GUS</i> .....	56
5.3.2.2. Evaluación de la sobrevivencia de los explantes post-transformación .....	57
6. DISCUSIÓN.....	60
7. CONCLUSIONES .....	64
8. BIBLIOGRAFÍA.....	65
9. ANEXOS.....	84
Anexo I. Protocolo de ImageJ para el análisis de área regenerada .....	84
Anexo II. Protocolo para generar células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	86
Anexo III. Protocolo de extracción de ADN plasmídico .....	87
Anexo IV. Composición del sustrato X-Gluc .....	89

<b>Anexo V.</b> Valores medios de regeneración y elongación de cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> .....	90
<b>Anexo VI.</b> Valores medios de regeneración y elongación del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> .....	91

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Cálculo del porcentaje de regeneración .....	26
<b>Ecuación 2.</b> Cálculo del porcentaje de transferencia de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> empleadas en la transformación .....	36
<b>Ecuación 3.</b> Modelo estadístico lineal para la variable porcentaje de regeneración en el ensayo de genotipos .....	37
<b>Ecuación 4.</b> Modelo estadístico lineal para la variable área regenerada en el ensayo de genotipos .....	37
<b>Ecuación 5.</b> Modelo estadístico lineal para el ensayo de transformación.....	38
<b>Ecuación 6.</b> Cálculo de la escala de trabajo realizado por ImageJ.....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Lotus tenuis</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Parte de la región pampeana y la actividad ganadera en la República Argentina .....	9
<b>Figura 3.</b> Procesos morfogénicos obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de diferentes explantes ...	11
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del plásmido Ti tipo octopina de <i>A. tumefaciens</i> .....	15
<b>Figura 5.</b> Diagrama esquemático de los sistemas de vectores utilizados en la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium</i> .....	16
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de las plantas .....	24
<b>Figura 7.</b> Cultivo <i>in vitro</i> de <i>L. tenuis</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Elongación de tallos regenerados de un genotipo de <i>L. tenuis</i> .....	27
<b>Figura 9.</b> Genotipo de <i>L. tenuis</i> crecido en distintos ambientes .....	28
<b>Figura 10.</b> Mapa y región T-DNA del vector pCambia 2301 .....	30
<b>Figura 11.</b> Técnica de transformación de folíolos <i>L. tenuis</i> .....	34
<b>Figura 12.</b> Folíolos tratados y decolorados con X-Gluc .....	35
<b>Figura 13.</b> Regeneración de folíolos en medio MR con agente selectivo a 60 días de la transformación .....	36
<b>Figura 14.</b> Regeneración de distintos genotipos de <i>L. tenuis</i> a los 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 91 días de ensayo.....	41
<b>Figura 15.</b> Regeneración de folíolos de los cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> evaluados a los 49 días de ensayo .....	42
<b>Figura 16.</b> Área regenerada promedio de folíolos de distintos genotipos de <i>L. tenuis</i> a los 63 días de ensayo .....	43
<b>Figura 17.</b> Número de tallos por explante de los cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> evaluados a los 100 días de ensayo y error estándar asociado .....	44
<b>Figura 18.</b> Altura promedio de tallos por explante de los cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> evaluados a los 100 días de ensayo y error estándar asociado .....	45
<b>Figura 19.</b> Elongación de tallos de los cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> a los 60 días del traspaso del tejido morfogénico a medio MS 0,5X .....	46
<b>Figura 20.</b> Regeneración de folíolos del genotipo PampaWT de <i>L. tenuis</i> provenientes de tres ambientes ( <i>in vitro</i> , en sala de crecimiento e invernáculo) a los 17, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días de ensayo .....	48
<b>Figura 21.</b> Regeneración de folíolos del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> proveniente de tres ambientes ( <i>in vitro</i> , en sala de crecimiento e invernáculo) a los 49 días de ensayo .....	49
<b>Figura 22.</b> Área regenerada promedio de folíolos del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> provenientes de tres ambientes ( <i>in vitro</i> , en sala de crecimiento e invernáculo) a los 32 días de ensayo .....	50

<b>Figura 23.</b> Número de tallos por explante de los cinco genotipos de <i>L. tenuis</i> evaluados a los 100 días de ensayo y error estándar asociado .....	51
<b>Figura 24.</b> Altura promedio de tallos por explante de folíolos del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> crecido en tres ambientes ( <i>in vitro</i> , en sala de crecimiento e invernáculo) evaluados a los a los 64 días del cultivo <i>in vitro</i> y error estándar asociado .....	52
<b>Figura 25.</b> Elongación de tallos a partir de folíolos del genotipo PWt crecido <i>in vitro</i> , en sala de crecimiento e invernáculo, a 60 días del traspaso del tejido morfogénico a medio MS 0,5X .....	53
<b>Figura 26.</b> Transformación de <i>A. tumefaciens</i> y extracción del plásmido pCambia 2301 .....	55
<b>Figura 27.</b> Expresión transitoria promedio de <i>gusA</i> en folíolos PWt transformados con las cepas EHA105, AGL1 y GV3101 .....	57
<b>Figura 28.</b> Diagrama de dispersión del porcentaje de explantes con expresión transitoria y el porcentaje de explantes resistentes a kanamicina post-transformación .....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resistencia a antibióticos y factor de dilución en medio LB de las cepas de <i>A. tumefaciens</i> empleadas para la transformación bacteriana con el vector pCambia 2301.....	31
<b>Tabla 2.</b> Cebadores utilizados para la validación por PCR de la presencia del plásmido pCambia 2301 en distintas cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....	32
<b>Tabla 3.</b> Comportamiento promedio de los genotipos PWt, 2297, P1, P2 y E3 de <i>L. tenuis</i> para las variables regeneración, área regenerada y número y altura de tallos por explante .....	39
<b>Tabla 4.</b> Comportamiento promedio del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> proveniente de tres ambientes ( <i>in vitro</i> , sala de crecimiento e invernáculo) para la variable regeneración y número y altura de tallos por explante.....	47
<b>Tabla 5.</b> Reactivos y concentraciones para la preparación del buffer X-Gluc.....	89
<b>Tabla 6.</b> Promedios de regeneración de los distintos genotipos de <i>L. tenuis</i> y error estándar asociado .....	90
<b>Tabla 7.</b> Promedios de elongación de los distintos genotipos de <i>L. tenuis</i> y error estándar asociado .....	90
<b>Tabla 8.</b> Promedios de regeneración del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> proveniente de tres ambientes y error estándar asociado .....	91
<b>Tabla 9.</b> Promedios de elongación del genotipo PWt de <i>L. tenuis</i> proveniente de tres ambientes y error estándar asociado .....	91

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

µg: microgramo

µL: microlitro

µM: micromolar

%m/v: porcentaje masa en volumen

2iP: N<sup>6</sup>-Δ<sup>2</sup>-isopentenil-adenina

Ab<sup>r</sup>: resistencia a antibióticos

ADN: ácido desoxirribonucleico

ANA: ácido α-naftalenacético

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

BAP: 6-bencilaminopurina

cab/ha: cabezas por hectárea

CaCl<sub>2</sub>: cloruro de calcio

CaMV 35S: promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor

*chv*: virulencia cromosómica

C<sub>i</sub>: concentración inicial

cm: centímetro

cm<sup>2</sup>: centímetro cuadrado

CRISPR/Cas9: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas/Caspasa 9

CV: coeficiente de variación

DCA: diseño completamente aleatorizado

ddi: días desde inicio del ensayo

DGC: Di Rienzo Guzmán Casanoves

dMS: días desde el traspaso del explante a medio MS 0,5X

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTP: desoxirribonucleótido

E3: Esmeralda 3

E.E.: error estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EtOH: etanol

*gfp*: proteína verde fluorescente  
goi: gen de interés  
*GUS/gusA/uidA*:  $\beta$ -glucoronidasa  
H<sub>2</sub>O: agua  
HCl: ácido clorhídrico  
hs: horas  
I: invernáculo  
IBA: ácido indolbutírico  
iv: *in vitro*  
K: potasio  
K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>: ferricianuro de potasio  
K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O: ferrocianuro de potasio  
KanR: resistencia a kanamicina  
Km: kanamicina  
L: litro  
LB: medio Luria-Bertani  
*LtNHX1*: transportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> *exchange* de *Lotus tenuis*  
M: molar  
mg: miligramo  
Mg<sup>2+</sup>: catión magnesio  
min: minuto  
mL: mililitro  
MLM: modelo lineal general y mixto  
mm: milímetro  
mM: milimolar  
MR: medio de regeneración  
MS: medio Murashige y Skoog  
Na: sodio  
NaCl: cloruro de sodio  
NaOH: hidróxido de sodio  
ng: nanogramo  
nm: nanómetro

*nptII*: neomicina fosfotransferasa II  
NOS: promotor de nopalina sintasa  
OD<sub>600</sub>: densidad óptica a 600 nanómetros  
ON: *Over Night*  
ori: origen de replicación  
p: probabilidad  
P1: Pampa 1  
P2: Pampa 2  
pb: pares de bases  
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa  
PEG: polietilenglicol  
PGR: reguladores de crecimiento vegetal  
pH: potencial de Hidrógeno  
PWt: Pampa Wild-type  
px: píxel  
rpm: revoluciones por minuto  
S: sala de crecimiento  
SDS: dodecilsulfato sódico  
seg: segundo  
T-DNA: ADN de transferencia  
TDZ: thidiazurón  
TE: Tris-EDTA  
T<sub>m</sub>: temperatura de *annealing*  
TNOS: terminador de nopalina sintasa  
Ti: inductor de tumores  
V<sub>f</sub>: volumen final  
vol: volumen  
X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónico, sal ciclohexilamonio

## RESUMEN

*Lotus tenuis* es una leguminosa forrajera de importancia en suelos con limitantes edafoclimáticas como la salinidad y los anegamientos transitorios, característicos de la Pampa Deprimida. Para favorecer la cría de ganado en estos suelos es necesario disponer de cultivares de alta productividad con tolerancia incrementada a estreses abióticos, lo cual se puede alcanzar con el apoyo de herramientas biotecnológicas. Por su importancia, *L. tenuis* constituye una especie atractiva para implementar la técnica de edición génica. Sin embargo, para poder aplicarla, es necesario contar con protocolos de transformación genética que garanticen altas frecuencias de regeneración *in vitro* y transferencia de ADN. La regeneración *in vitro* puede estar influenciada por diversos factores, como el genotipo y el ambiente, mientras que la eficiencia de la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* depende, en gran medida, de la cepa utilizada.

El objetivo de este trabajo fue optimizar técnicas de regeneración *in vitro* y transformación mediada por *A. tumefaciens* en *L. tenuis* a fin de que puedan ser utilizadas para realizar edición génica. Para esto, en una primera etapa, se comparó la capacidad de regeneración y elongación de tallos *in vitro* de cinco genotipos de diversos orígenes utilizando folíolos como explante: uno del cultivar Esmeralda de la empresa Gentos (E3), tres del cultivar Pampa INTA (P1, P2, PWt) y uno de una familia de medios hermanos del programa de Mejoramiento Genético de INTA EEA Pergamino (2297). Se determinó el porcentaje de regeneración hasta los 91 días de ensayo, el área regenerada a los 63 días de ensayo y el número y altura de tallos/explante (mm) a los 100 días de ensayo y a los 60 días del pasaje de los explantes a medio MS 0,5X. Se analizaron los datos mediante ANOVA o prueba de Kruskal Wallis y pruebas de comparaciones múltiples. Los genotipos que alcanzaron mayor regeneración en menor tiempo fueron 2297 y PWt ( $p < 0,05$ ), que a su vez presentó mayor número de tallos y mayor altura, en conjunto con P1. Considerando estos resultados se escogió al genotipo PWt para, en una segunda etapa, comparar con la misma metodología, su capacidad de regeneración y elongación de tallos *in vitro* en tres ambientes: invernáculo, sala de crecimiento e *in vitro*. Se determinó el porcentaje de regeneración hasta los 56 días de ensayo, el área regenerada a los 32 días de ensayo y el número y altura de tallos/explante (mm) a los 64 días y a los 60 días del pasaje de los explantes a medio MS 0,5X. Nuevamente, se analizaron los datos mediante ANOVA o prueba de Kruskal Wallis,

y pruebas de comparaciones múltiples. Los folíolos provenientes de plantas *in vitro* se destacaron para las variables evaluadas ( $p < 0,05$ ), por lo que se utilizaron en una última etapa para comparar la eficiencia de transferencia de ADN de cuatro cepas de *A. tumefaciens* (AGL1, EHA105, GV3101 y LBA4404). Para esto se utilizó el plásmido pCambia2301 que permite la expresión del gen reportero *gusA*. En primera instancia, se llevó a cabo la transformación de las cepas AGL1, EHA105 y LBA4404 utilizando el vector pCambia2301, mientras que la cepa GV3101 portadora del plásmido fue cedida por el Instituto de Genética "Ewald A. Favret". La presencia del plásmido se confirmó mediante PCR para el gen de selección *nptII* y el gen reportero *gusA*. Folíolos de PWt se agitaron en suspensiones bacterianas competentes, siguiendo un protocolo publicado en bibliografía. La transformación se repitió cinco veces por cepa y se determinó el porcentaje de folíolos con expresión transitoria a los 4 días mediante observación bajo la lupa (10X), considerando positivos a aquellos con coloración azul. Se realizó ANOVA y prueba de comparaciones múltiples. La cepa LBA4404 no presentó folíolos positivos. El porcentaje de expresión transitoria utilizando GV3101 ( $45,3 \% \pm 3,3$ ) resultó similar al de AGL1 ( $49,6 \% \pm 3,2$ ) y menor al de EHA105 ( $79,6 \% \pm 2,7$ ). Por lo tanto, la cepa EHA105 resultó más eficiente en la transferencia de T-DNA. La expresión transitoria se correlacionó con la resistencia de los explantes al agente selectivo kanamicina a los 60 y 90 días post-transformación. Este trabajo permitió establecer un protocolo eficiente para la transformación de folíolos de *L. tenuis*, provenientes del genotipo PWt cultivado en condiciones *in vitro*, utilizando la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*. Se logró una eficiencia de transformación transitoria cercana al 80 %, lo cual representa un avance significativo para poder realizar edición génica en esta especie.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Importancia de *Lotus tenuis*

*Lotus tenuis* Waldst. et Kit., conocida vulgarmente como lotus, trébol pata de pájaro o lotus de hoja angosta, es una leguminosa herbácea, alógama y perenne (Miñón *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002). Su morfología consta de hojas con cinco folíolos lanceolados angostos, dos ubicados en la base del pecíolo y tres en la parte terminal, y de una raíz pivotante con ramificaciones que dan origen a raíces laterales con nódulos, producto de la infección por bacterias nitrificantes (Miñón *et al.*, 1990). En ausencia de competencia por luz, la especie presenta crecimiento postrado, sin embargo, sus tallos adquieren porte erecto cuando se asocia a pastizales altos (Beuselinck *et al.*, 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio & Fernández, 2006) (Figura 1.A). A pesar de carecer de órganos de propagación vegetativa, los tallos tendidos sobre el suelo húmedo pueden desarrollar raíces adventicias (Vignolio & Fernández, 1997). La planta presenta coloración verde azulada (Carámbula & Bermúdez, 1998) con flores amarillas de corto pedicelo agrupadas de una a seis en umbelas (Lambrechtsen *et al.*, 1986; Miñón *et al.*, 1990; Vignolio *et al.*, 2002) (Figura 1.B). La floración de *L. tenuis* comienza en primavera y se prolonga hasta fines del verano, cuando produce frutos y semillas (Vignolio & Fernández, 2006). Los frutos son vainas dehiscentes de color castaño oscuro (Miñón *et al.*, 1990) con forma cilíndrica achatada, que contienen un promedio entre 12 y 16 semillas (Lambrechtsen *et al.*, 1986; Vignolio & Fernández, 2006; Vignolio *et al.*, 2002).



**Figura 1. *L. tenuis*. A:** Hábito de crecimiento. Lefnaer, S. (2020). **B:** Vástago. Moro, A. (2004).

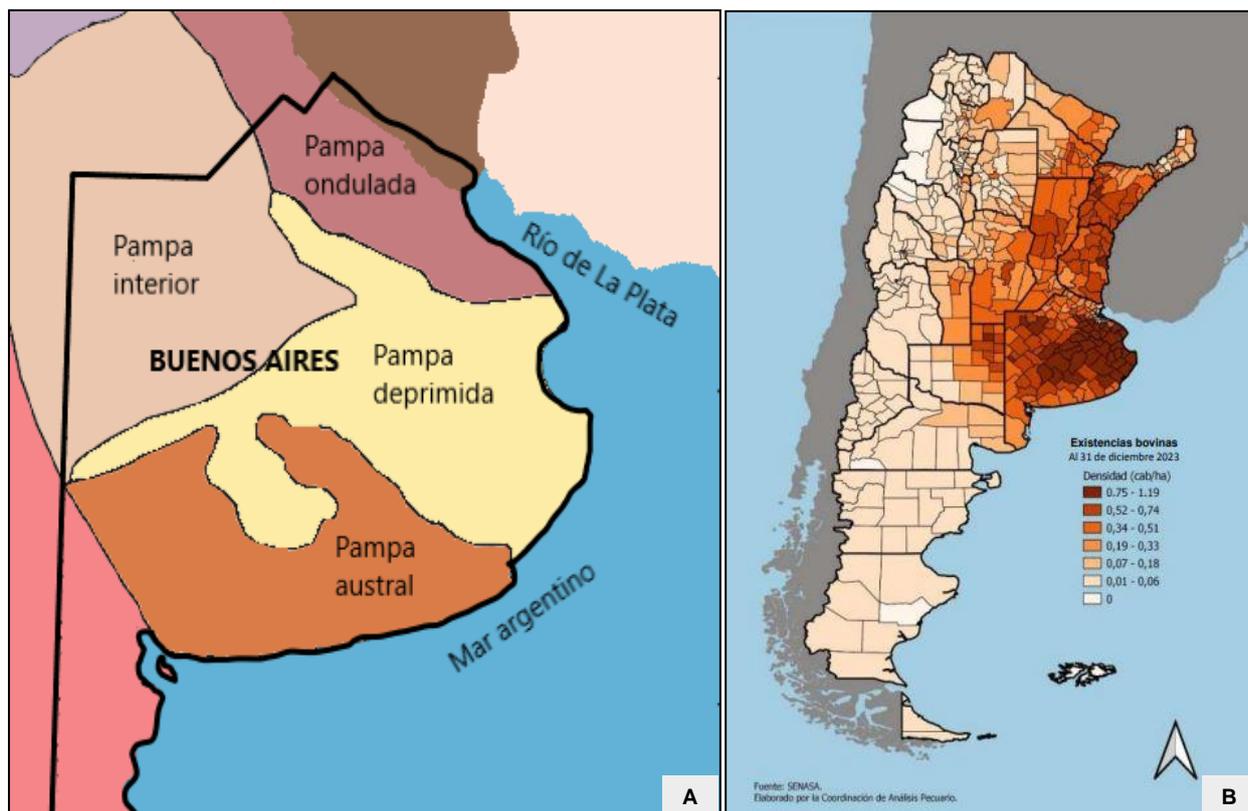
Presenta autoincompatibilidad (Lundqvist, 1993), reproducción sexual y fecundación predominantemente cruzada y entomófila, por lo que la acción de insectos polinizadores, principalmente la abeja doméstica *Apis mellifera*, resulta imprescindible para la producción de semillas (Miñón *et al.*, 1990). No obstante, es posible obtener algunas semillas viables por autopolinización (Montes, 1988).

Es considerada una especie diploide, distintos autores han reportado  $2n=2x=12$  como número cromosómico de la especie (Baltisberger, 1990; Lövkvist & Hultgård, 1999), aunque en algunos trabajos se han encontrado poblaciones  $2n=18$  (Celotto & Sanso, 2008) y  $2n=24$  (Yan *et al.*, 1989).

La especie es nativa de Europa y Asia Menor (Lambrechtsen *et al.*, 1986) y la mayor diversidad de especies del género *Lotus* se ubica en la Cuenca del Mediterráneo, posible lugar de origen (Seaney & Henson, 1970). Fue introducida en Argentina en el siglo XX, alrededor de 1930 (Burkart, 1952), y se desconoce si el ingreso de sus semillas se produjo de manera voluntaria y no declarada, o de forma involuntaria, mezclada con semillas de otras especies forrajeras importadas o junto con las heces de animales provenientes de Europa (Valverde, sin año). Actualmente, se halla naturalizada en los ambientes pastoriles de la Pampa Deprimida (Vignolio & Fernández, 2006) (Figura 2.A), caracterizados por presentar suelos heterogéneos con limitantes como salinidad, alcalinidad, baja infiltración

de agua e inundaciones periódicas (Miñón *et al.*, 1990). Es común que se encuentre en simbiosis bacteriana con cepas de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*, interacción que le otorga la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Balatti, 1996). *L. tenuis* crece en suelos con un amplio rango de pH que se extiende entre 5,5 y 9,8, moderado contenido de sodio y baja concentración de fósforo (Mendoza *et al.*, 2000; Montes, 1988; Stoffella *et al.*, 1998). Su crecimiento resulta menos afectado que el de otras especies forrajeras frente a variaciones en la temperatura debidas a los cambios de estación (Arcioni *et al.*, 1985; Ayers, 1948) y se han observado plantas que resisten por debajo de los 0 °C como también al congelamiento del agua (Vignolio *et al.*, 1999; Vignolio *et al.*, 1994). Las poblaciones tolerantes al anegamiento presentan modificaciones morfológicas y anatómicas en raíces y tallos (Mendoza *et al.*, 2005; Striker *et al.*, 2006; Striker *et al.*, 2005; Vignolio & Fernández, 1997; Vignolio *et al.*, 1999; Vignolio, *et al.*, 1994).

Desde la segunda mitad del siglo XX, sobre todo desde la década del '90 con el crecimiento de la producción de soja, existe en el país una gran expansión agrícola, en desmedro de otras actividades agropecuarias (Coppi, 2010). Es por esto que la ganadería se desplazó a suelos con limitantes edafoclimáticas (Figura 2.B), como las zonas bajas e inundables con problemas de halomorfismo de la Pampa Húmeda (Lavado, 2007). En esta región se ubica la Cuenca del Río Salado, una de las principales áreas ganaderas del país (Colombet, 2017; Vázquez & Rojas, 2006). Un elevado porcentaje de los suelos de esta zona son salino-alcalinos e hidromórficos (Matteucci, 2012), con escasez de nutrientes y alternancia de períodos de inundaciones y sequías, que afectan seriamente las capacidades de producción agropecuarias y derivan en una pérdida de producción de forraje (Batista *et al.*, 2005; Paruelo *et al.*, 2010). Por lo tanto, desarrollar cultivares de especies forrajeras de buena productividad con tolerancia a estreses abióticos, ya sea en forma convencional o con el apoyo de herramientas biotecnológicas, es actualmente un objetivo central en los programas de mejoramiento genético. En este contexto, *L. tenuis* es económicamente importante por su aporte a la oferta forrajera de los sistemas ganaderos ya que presenta una buena adaptación en áreas donde predominan gramíneas de bajo valor nutricional y no prosperan especies leguminosas más importantes como la alfalfa, convirtiéndola en una buena alternativa (Clua *et al.*, 1997; Pesqueira, 2009; Teakle, 2008).



**Figura 2. Parte de la región pampeana y la actividad ganadera en la República Argentina. A:** La región pampeana y sus sub-regiones en la provincia de Buenos Aires. *Mapa adaptado de la publicación de Bilenca et al. (2012).* **B:** Densidad de bovinos en la República Argentina al 31 de diciembre de 2023. La distribución de existencias bovinas se mide en **cab/ha**. *Mapa elaborado por la Coordinación de Análisis Pecuario (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía de la Nación).*

## 1.2. Regeneración *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende el conjunto de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Mroginski & Roca, 1991). El cultivo *in vitro* se apoya en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella y por lo tanto cuenta con el potencial para regenerar una nueva planta completa (Fert & Paul, 2000). En referencia a las ventajas de este grupo de técnicas, cabe mencionar que permiten la producción masiva de plantas libres de patógenos, a bajo costo, en espacios reducidos y tiempos cortos, bajo condiciones controladas con enfoques

comerciales y agroindustriales, además de la producción de material vegetal para el establecimiento de cultivos y la generación de metabolitos secundarios (Bonilla-Morales & Hernández-Castañeda, 2012; Tavazza *et al.*, 2015). Como desventaja, la conservación y multiplicación *in vitro* durante un tiempo prolongado puede resultar en cambios genéticos y dar lugar a una progenie con alteraciones en lugar de conservar las adaptaciones genotípicas a sus condiciones naturales (Daskalova *et al.*, 2011). Lo anterior se debe a que el cultivo *in vitro* puede inducir la aparición de eventos mutacionales como consecuencia de las nuevas condiciones ambientales impuestas, que resultan estresantes para las células sometidas a la técnica (Phillips *et al.*, 1994). Tales variaciones se describieron bajo el concepto de *variación somaclonal* (Larkin & Scowcroft, 1981).

En el cultivo *in vitro*, la regeneración de células somáticas vegetales puede ocurrir por dos procesos (Llorente, 2002). Una de las vías morfogénicas es la embriogénesis somática, que consiste en la obtención de embriones similares a los cigóticos, sin que medie la fertilización de las gametas (Radice, 2010), es decir, a partir de células somáticas (Yang & Zhang, 2010). La formación de los embriones somáticos puede involucrar una fase de callo previa (embriogénesis indirecta) o desarrollarse sin requerir que se forme callo (embriogénesis directa) (Sharp *et al.*, 1980).

En contraste con la embriogénesis somática, la organogénesis comprende el desarrollo de tallos, raíces o flores, cuya formación es inducida a partir de una célula o de un grupo de células capaces de mantenerse en activa división (Radice, 2010). Consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraizan mediante la formación y proliferación de meristemas radicales (Jiménez González, 1998). Según el modo de ocurrencia, la organogénesis puede ser directa con la formación de brotes a partir del explante utilizado, sin la intervención de la etapa de callo; o indirecta, en los que se observa la formación previa de callos en el explante (desdiferenciación del tejido), y generación de brotes a partir de la diferenciación del tejido calloso (George & Debergh, 2008) (Figura 3). El proceso se desarrolla mediante la inclusión de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento (Krikorian, 1991). La proporción entre auxinas y citoquininas permite regular la organogénesis o la desdiferenciación, en general, cuando la relación auxina/citoquinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a



Para el establecimiento de los cultivos es necesario tener en cuenta las características del material de partida, el medio de crecimiento, las condiciones de incubación y la asepsia (Mroginski *et al.*, 2010). En este sentido, el explante puede consistir de hojas, raíces, embriones cigóticos, anteras, hipocótilos, epicótilos, cotiledones, entre otros segmentos vegetales. Para una elección apropiada del mismo debe considerarse el objetivo del cultivo y la época del año, como así también la posibilidad de contaminación, la edad fisiológica, el tamaño, el genotipo y el ambiente de procedencia del explante (Mroginski *et al.*, 2010). Mroginski *et al.* (2010) plantearon que las tasas de contaminación pueden reducirse cultivando explantes de plantas donantes crecidas en invernadero y evitando el uso de explantes sucios (raíces, rizomas), provenientes de plantas crecidas en macetas o en el campo, cuya desinfección no se logra realizar correctamente. Asimismo, señalaron que la época del año está asociada a la posibilidad de proliferación de microorganismos, como así también al grado de dormición de ciertos explantes (como yemas, por ejemplo). En diversos cultivos se ha demostrado que la regeneración es genotipo-dependiente y depende también del tipo y la edad del explante (Espasandin *et al.*, 2010; Monthey *et al.*, 2021; Wan *et al.*, 1988). El potencial organogénico de un explante resulta inversamente proporcional a su edad fisiológica (Alleweldt & Radler, 1962), siendo los explantes de mayor tamaño los que presentan una capacidad de regeneración superior respecto a los más pequeños, caracterizados por contar con menor viabilidad (Litz & Jarret, 1991). Un factor determinante en la obtención y el crecimiento de nuevos órganos *in vitro* es el genotipo del material de partida (Radice, 2010). Bajo idénticas condiciones medioambientales, se observó variación entre plantas pertenecientes a distintos cultivares de una misma especie en las respuestas *in vitro* de un determinado explante, por lo que resulta importante tener en cuenta la variabilidad genotípica de las plantas (Mroginski & Roca, 1991). Por otro lado, varios autores han reportado que el entorno del cual proviene el explante tiene efectos sobre su capacidad de regeneración (Barbón-Rodríguez, 2003; Danoso, 1998; Jiménez-Martínez *et al.*, 2013).

El medio de cultivo se compone de una fuente de carbono, nutrientes minerales, sustancias vitamínicas, reguladores del crecimiento y un agente gelificante en medios semisólidos, requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. La incubación se debe llevar a cabo en condiciones ambientales controladas en lo que respecta a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene. La asociación entre el medio

y el explante, y las condiciones físicas de incubación conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), que pueden destruir el cultivo, competir con el explante por el medio o modificarlo (Mroginski & Roca, 1991). Por lo anterior, resulta determinante trabajar en condiciones asépticas o de esterilidad. Según el propósito del cultivo, puede existir una fase de aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*, durante la cual deberán controlarse los parámetros ambientales externos, diferentes a los del cuarto de cultivo, con el objetivo de minimizar la deshidratación y estimular la fotosíntesis (Mroginski *et al.*, 2010).

### **1.3. Transformación genética vegetal**

La transformación genética vegetal es una técnica que permite introducir en plantas genes provenientes de otras especies y/o modificar la expresión de genes presentes en su genoma (M. L. Díaz *et al.*, 2010). En la actualidad existe una amplia diversidad de sistemas de transformación genética, clasificados en métodos directos o indirectos, dependiendo del mecanismo utilizado para efectuar la transferencia del material genético hacia la célula vegetal (Mohan Babu *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2009).

#### **1.3.1. Métodos directos o físicos de transformación**

Estos métodos permiten la introducción del ADN exógeno desnudo en el genoma mediante un medio físico o químico. El surgimiento de estas técnicas se debió a que en ciertas especies de importancia económica no pueden utilizarse métodos indirectos (M. L. Díaz *et al.*, 2010). La biobalística constituye uno de los métodos más difundidos y consiste en el bombardeo de tejidos con microproyectiles de oro o tungsteno cubiertos con ADN o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir (Sanford, 1988). Otro método de la misma categoría es la electroporación, que comprende la aplicación de un campo eléctrico (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012) y genera la desestabilización de las membranas, induciendo en ellas poros reversibles por los que se produce el paso de macromoléculas, fuga de iones, escape de metabolitos y mayor absorción de ADN por parte de las células (Fox *et al.*, 2006; Krassowska & Filev, 2007). Tales poros también pueden ser generados durante el proceso de sonicación (Mehier-Humbert *et al.*, 2005) o bien de manera química aplicando sustancias como polietilenglicol (PEG), fosfato de calcio y poly-L-omotina (B. Chakrabarty *et al.*, 2008). En otra técnica, el material a transferir es

encapsulado en una esfera conformada por varias bicapas de lípidos o liposoma, que facilita su pasaje a la célula vegetal por endocitosis (Rao *et al.*, 2009).

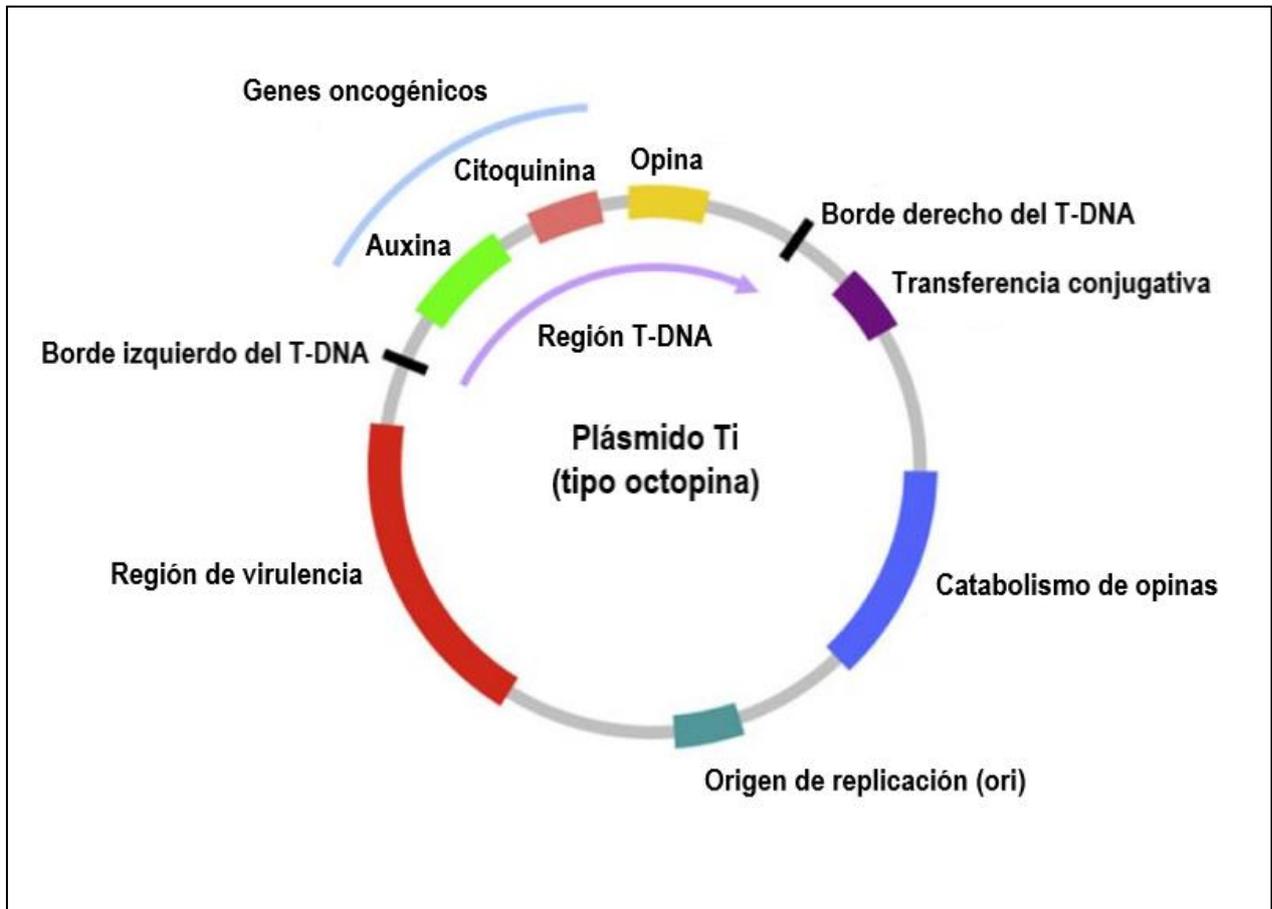
### **1.3.2. Métodos indirectos de transformación**

Se trata de técnicas basadas en la utilización de vectores biológicos, aprovechando sus características naturales de patogenicidad en plantas para introducir genes de interés al genoma vegetal (Rao *et al.*, 2009; Veluthambi *et al.*, 2003). El método más estudiado y utilizado es mediado por *Agrobacterium* spp. (Hwang *et al.*, 2017), sin embargo, los vectores virales constituyen un segundo método de transformación indirecta (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). Esta clase de vectores puede diseñarse mediante dos estrategias: introduciendo el gen foráneo dentro del virus completo, o bien, eliminando o sustituyendo regiones virales, además de realizar la inserción del gen de interés. Luego, estos vectores pueden ser empleados en la transfección de la planta, como partícula madura o como copias del vector viral (Gleba *et al.*, 2007; Gleba *et al.*, 2004).

#### **1.3.2.1. Transformación mediada por *A. tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria gram negativa del suelo que infecta a las plantas a partir de heridas (Hwang *et al.*, 2017). La capacidad de virulencia de *A. tumefaciens* depende de la presencia del plásmido inductor de tumores (Ti) (Figura 4), que alberga un segmento de ADN (T-DNA) (Subramoni *et al.*, 2014), transferido naturalmente por la bacteria a las células vegetales (Francis & Spiker, 2005). Las labores de trasplante, mantenimiento o la acción de insectos y nemátodos del sistema radical generan heridas en las plantas (Arguedas, 2009), que al ser dañadas liberan compuestos fenólicos, azúcares neutros y ácidos, necesarios para la reparación tisular (Winans, 1992). En la naturaleza, *Agrobacterium* reconoce estas señales derivadas de la planta, encargadas de mediar su quimiotaxis hacia el sitio dañado (Kado & Hooykaas, 1991; Wright *et al.*, 1998) y activa la transcripción de genes *vir* involucrados en la transferencia e integración del T-DNA en el núcleo de las células vegetales (Subramoni *et al.*, 2014). Por su parte, la región T-DNA del plásmido alberga oncogenes para la síntesis de reguladores de crecimiento (Körber *et al.*, 1991) y genes de la síntesis de opinas (M. L. Díaz *et al.*, 2010), a diferencia de los genes responsables del catabolismo de opinas, que se hallan en otro sector del plásmido (Carbonero Zalduegui, 1997). Los genes *rep* codifican para el mantenimiento del plásmido, mientras que los productos de *tra* y *trb* participan en su transferencia conjugativa hacia las

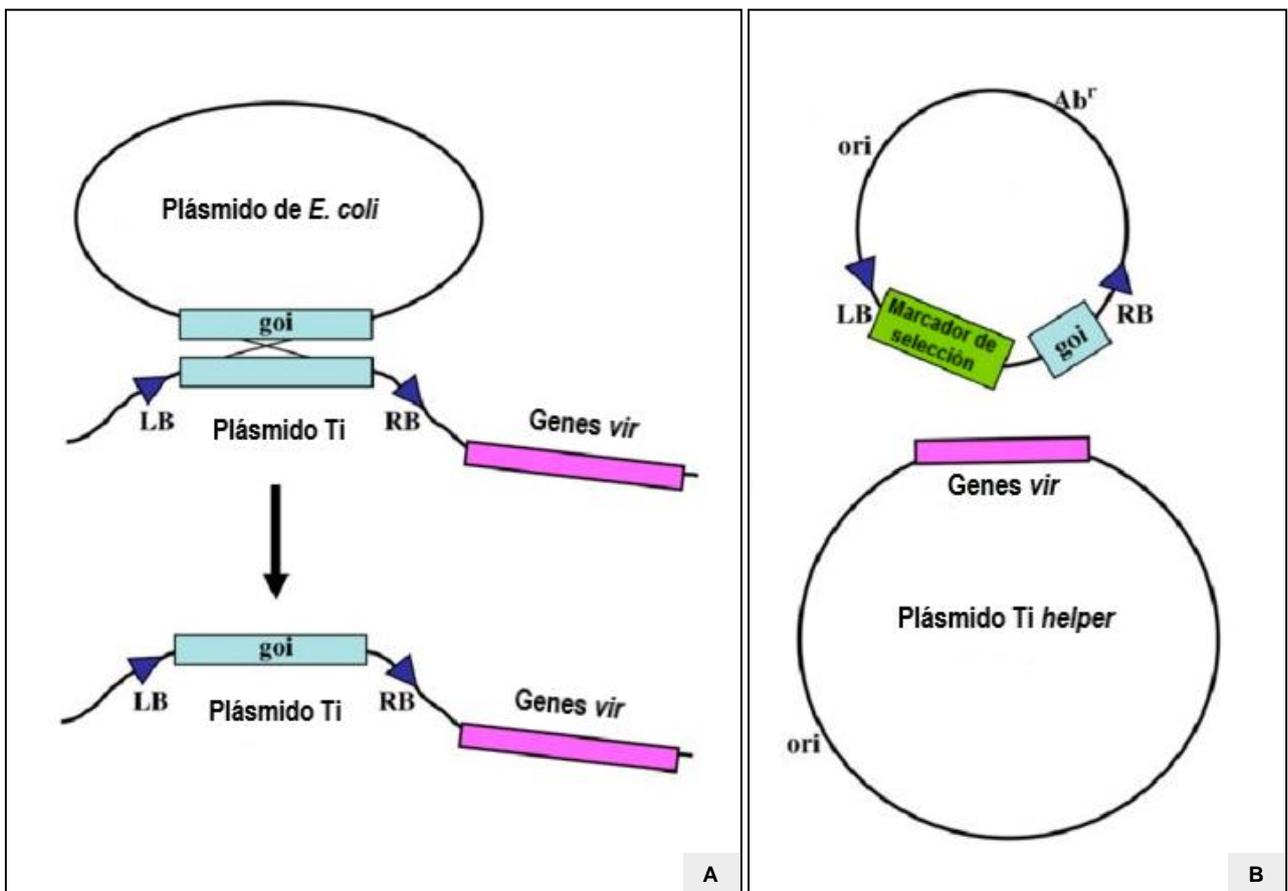
agrobacterias receptoras (Christie, 2000). Por otro lado, los genes de virulencia cromosómica (*chv*) se ubican fuera del plásmido Ti y sus productos están involucrados en la síntesis de oligosacáridos extracelulares, que permiten que *Agrobacterium* se adhiera a los huéspedes vegetales (Cangelosi *et al.*, 1989).



**Figura 4. Representación esquemática del plásmido Ti tipo octopina de *A. tumefaciens*. Ilustración adaptada de Păcurar *et al.* (2011).**

Debido a que la inducción de tumores en plantas no suele ser un resultado previsto en los experimentos biotecnológicos, se han elaborado cepas curadas o desarmadas, derivadas de *Agrobacterium* (De Saeger *et al.*, 2021), que permiten suprimir este tipo de respuesta. Las cepas curadas no contienen al plásmido Ti, mientras que las cepas desarmadas conservan el plásmido, pero se han eliminado o inactivado los genes oncogénicos por lo que se consideran avirulentas (De Saeger *et al.*, 2021). Estas cepas logran infectar células vegetales nuevamente al reintroducir en ellas un plásmido Ti modificado, el cual contiene en la región T-DNA el gen de interés y los genes marcadores (Hwang *et al.*, 2017).

Asimismo, se distinguen dos clases de vectores capaces de mediar la transgénesis (Petri Serrano, 2005). Por un lado, el sistema de vector cointegrado, compuesto por un plásmido de *E. coli* portador del gen de interés y por el plásmido Ti de *Agrobacterium* portador de un fragmento del plásmido de *E. coli*. Al transferir el plásmido de *E. coli* a *Agrobacterium*, el gen de interés se traslada al plásmido Ti debido al proceso de recombinación homóloga (Figura 5.A). Por su parte, el sistema de vector binario se halla constituido por dos plásmidos dentro de *Agrobacterium*: un plásmido Ti *helper* portador únicamente de la región *vir* y un plásmido portador del gen de interés (Figura 5.B).



**Figura 5. Diagrama esquemático de los sistemas de vectores utilizados en la transformación genética mediada por *Agrobacterium*.** **A:** Estrategia de vector cointegrado. **B:** Estrategia de vector binario. **goi:** Gen de interés, **LB:** Borde izquierdo del T-DNA, **RB:** Borde derecho del T-DNA, **ori:** Origen de replicación, **Ab<sup>r</sup>:** Gen de resistencia a antibióticos. *Ilustraciones adaptadas de la publicación de Lee & Gelvin (2008).*

Tras un ensayo de transformación, no todas las células diana son transformadas, por lo que resulta necesario establecer un protocolo de selección que impida o reduzca la aparición de escapes o brotes no transformados (Petri Serrano, 2005). En este sentido, se confieren

características distintivas a las células modificadas genéticamente mediante el uso de genes marcadores, que permiten reconocerlas y seleccionadas (Miki & McHugh, 2004). Hay dos clases de genes marcadores: los de selección y los reporteros; ambos se introducen en la construcción junto al gen de interés que se busca expresar en la planta. Los genes de selección confieren una ventaja a las células transformadas frente a las no transformadas en un medio selectivo, para que lleguen a diferenciarse y den lugar a un individuo completo. El agente selectivo suele ser un antibiótico o un herbicida. El gen de la neomicina fosfotransferasa (*nptII*) es uno de los genes de selección usualmente utilizados y confiere resistencia frente a aminoglicósidos como la kanamicina. Por su parte, los genes reporteros otorgan una característica a las células transformantes que permite distinguirlas de las no transformadas. En general, codifican enzimas que actúan sobre sustratos cromogénicos, fluorogénicos, emisores de fotones o radiactivos, de tal manera que cuando se añade su sustrato al medio se logra identificar visualmente a las células transformadas. Los reporteros más usuales son el gen de la  $\beta$ -glucoronidasa (*uidA* o *gusA*), que hidroliza  $\beta$ -glucurónidos (Vancanneyt *et al.*, 1990), y el de la proteína verde fluorescente (*gfp*) (Chiu *et al.*, 1996), que al ser excitada con luz azul o ultravioleta emite una fluorescencia verde y permite detectar las células transformadas de una manera no destructiva sin necesidad de añadir ningún sustrato al medio (Petri Serrano, 2005).

Los genes marcadores no deberían expresarse en la bacteria ya que de lo contrario sería imposible detectar si la expresión del gen se debe a células del material vegetal o a la expresión de la proteína en *Agrobacterium* (Petri Serrano, 2005). Para evitar esta expresión se recurre a la introducción de un intrón en el gen reportero de tal manera que solo puede ser expresado correctamente en una célula eucariota, ya que la bacteria carece del sistema de maduración de ARN mensajero necesario para la eliminación de dicho intrón. Otra estrategia planteada, consiste en colocar los genes bajo el control de un promotor específico de eucariotas como el CaMV35S (del Virus del Mosaico de la Coliflor). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, de manera que la proteína que está bajo su control se expresa continuamente, o bien, pueden ser inducibles, de forma que el gen solo se expresa en determinadas condiciones, por ejemplo, frente al agregado de un sustrato específico, debido a un aumento de la temperatura o tras un cambio en el pH.

La transformación se puede clasificar en transitoria o estable (Hwang *et al.*, 2017). La transformación transitoria no requiere la incorporación del transgén al genoma del huésped

y la expresión de este T-DNA suele durar pocos días (Jones *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2008; Tsuda *et al.*, 2012; Wroblewski *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2014), permitiendo observar resultados en un corto período de tiempo (Hwang *et al.*, 2017). Por su parte, la transformación estable requiere que el T-DNA se integre al genoma de la célula huésped para que posteriormente se transmita a la siguiente generación (Bent, 2006; Gelvin, 2006; Rivero *et al.*, 2014; Tague & Mantis, 2006), por lo que se trata de un proceso largo que en muchos casos exige técnicas de cultivo de tejidos para el crecimiento de plantas completas a partir de células o tejidos transformados (Hwang *et al.*, 2017). Aunque con los marcadores genéticos se seleccionan las células y los individuos que han sido transformados, para disponer de una prueba definitiva de la integración de los transgenes se utilizan técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés) (Petri Serrano, 2005) o el *Southern Blot* (Southern, 1975). Si estas pruebas otorgan un resultado positivo, la integración de los transgenes al genoma de la planta se considera irrefutable.

Existen dos clases de métodos de transformación con *Agrobacterium*: *in vitro*, que implica el cultivo de células y tejidos vegetales seguido de la regeneración de la planta, e *in planta*, que prescinde de esta etapa, ya que los individuos transformantes provienen de células vegetales que se mantienen intactas en la planta (Chumakov & Moiseeva, 2012), como por ejemplo la inmersión de yemas florales (*floral dip* o *spray floral*), la inoculación de tejido meristemático y la transformación de semillas, entre otros (Chumakov & Moiseeva, 2012).

#### **1.3.2.1.1. Factores que afectan la eficiencia de transformación mediada por *Agrobacterium***

Existen diversos factores que influyen en la eficiencia de transformación mediada por *Agrobacterium*, entre los que se encuentran la temperatura, la luz, el uso de inductores de genes de virulencia (Valderrama *et al.*, 2005), el genotipo de la planta, la cepa de *Agrobacterium*, el tipo de construcción del vector, la composición del medio de inoculación, la concentración de células bacterianas (Cheng *et al.*, 2004), el tiempo de co-cultivo (Ramírez *et al.*, 2009), los genes marcadores (Opabode, 2006) y el medio de selección (Petri Serrano, 2005).

Diferentes condiciones de iluminación pueden afectar factores fisiológicos que a su vez influyen en la competencia por la transferencia de T-DNA e incluyen: el nivel de hormonas

de la planta, la proliferación celular y el estadio del ciclo celular (Villemont *et al.*, 1997). El intervalo de temperatura adecuado para la transformación de *Agrobacterium* está limitado por la tolerancia de las proteínas que participan en la transferencia del T-DNA (Chumakov & Moiseeva, 2012). La inducción de los genes *vir* ocurre a 25 °C, mientras que la transferencia del T-DNA se produce a 19 °C (Fullner *et al.*, 1996). El co-cultivo comprende el tiempo de exposición del explante a la bacteria (Degiovanni *et al.*, 2010) y requiere temperaturas cercanas o inferiores a 25 °C (Valderrama *et al.*, 2005) debido a que valores superiores generan necrosis tisular y reducción de la tasa de transformación (Salas *et al.*, 2001; R. Chakrabarty *et al.*, 2002). Asimismo, cerca de los 32 °C ocurre un cambio conformacional de la proteína VirA, involucrada en la regulación de los genes *vir* (Jin *et al.*, 1993).

El genotipo vegetal también puede influir significativamente en el éxito de la transformación, debido a las características fisiológicas y genéticas de las plantas de partida (Chumakov & Moiseeva, 2012). En este sentido, la célula vegetal puede ser altamente susceptible o no susceptible a la infección por *Agrobacterium*, dependiendo del genotipo de la planta huésped y de la cepa bacteriana empleada (Jordan & Hobbs, 1994).

La concentración óptima de células de *A. tumefaciens* constituye otro parámetro relevante a tener en cuenta en cualquier protocolo de transformación (Gurlitz *et al.*, 1987). En este sentido, valores de concentración inferiores al óptimo pueden reducir la transferencia de ADN, mientras que valores superiores al mismo pueden causar la muerte del explante diana. La cepa de *A. tumefaciens* utilizada en la transferencia de ADN puede influir significativamente en la eficiencia de la transformación genética (Chumakov & Moiseeva, 2012). La virulencia, así como la estructura y la organización del T-DNA y los genes *vir* pueden ser distintos entre una cepa y otra, lo que afectaría su capacidad de infección (Grant *et al.*, 2003). Las más utilizadas son GV3101, LBA4404, EHA101, EHA105 y AGL-1 (De Saeger *et al.*, 2021) y poseen diferencias en relación a la organización de su genoma, presentando distintos *backgrounds* cromosómicos (De Saeger *et al.*, 2021) y diferentes plásmidos Ti (Hellens *et al.*, 2000). Respecto a las características del vector utilizado, se ha observado que las construcciones más largas y complejas dan como resultado frecuencias de transformación más bajas y una regeneración más lenta (Richael & Rommens, 2012). Por su parte, el empleo de un gen reportero biológico o trazador vital (Chiu *et al.*, 1996) en las construcciones permite realizar un seguimiento de los eventos de transformación *in vivo*

(Petri Serrano, 2005). Por el contrario, la utilización de otros genes reportero no vitales para confirmar la transformación no permite detectar la tasa de supervivencia de los explantes.

En cuanto al medio de co-cultivo, varios autores han demostrado que un pH menor a 5,7 incrementa la virulencia de *Agrobacterium* (James *et al.*, 1993; Alt-Mörbe *et al.*, 1989; Vernade *et al.*, 1988) únicamente durante el periodo de inducción de virulencia de la bacteria, antes de la transformación (Petri Serrano, 2005). Asimismo, un incremento del pH en el medio tras 10 o 20 hs desde el inicio de la inducción, bloquea la expresión de los genes de virulencia (Vernade *et al.*, 1988). Con el objetivo de inducir la expresión de los genes *vir* y facilitar la transformación se ha utilizado glucosa, azacitidina (Boase *et al.*, 1998; R. Chakrabarty *et al.*, 2002), galactosa (Cangelosi *et al.*, 1990), acetosiringona (AS) y  $\alpha$ -hidroxiacetosiringona (OH-AS) (Hooykaas & Schilperoort, 1984; Stachel *et al.*, 1985). Por otro lado, mientras que el co-cultivo prolongado promueve la colonización excesiva de los explantes por parte de *A. tumefaciens*, lo cual puede generar alta mortalidad por sobreinfección bacteriana, reduciendo la eficiencia de transformación (Ramírez *et al.*, 2009; Wardhani *et al.*, 2019), un período insuficiente de co-cultivo no permite observar expresión transitoria en los explantes (Ramírez *et al.*, 2009).

La concentración del agente selectivo y el momento de aplicación de la selección afectan la transformación y por lo tanto la aparición de individuos transformados (Petri Serrano, 2005). Por lo general se suele utilizar la concentración umbral del agente selectivo que inhibe totalmente la regeneración en material sin transformar (Mante *et al.*, 1991). Asimismo, es importante que los explantes sean transferidos al medio de selección pasado un tiempo durante el cual el T-DNA se integra al genoma vegetal (Serrano, 2005). Asimismo, dependiendo del tipo de marcador utilizado se puede evaluar la evolución de transformación transitoria a estable. Wang *et al.* (1997) observaron que la inserción de intrones en un gen marcador permitió mejorar el control del crecimiento de *Agrobacterium* durante el proceso de transformación.

El tipo y la edad fisiológica del explante, el método inductor de daño empleado y la presencia de reguladores de crecimiento son factores que adquieren relevancia en la transformación *in vitro*. Si bien distintos tipos de explantes pueden utilizarse como diana en la transformación con *Agrobacterium*, el material de partida debe ser apto para la regeneración y permitir la recuperación de plantas transgénicas enteras (Karami, 2008).

Asimismo, distintos tejidos, órganos y células de una misma planta pueden diferir en su susceptibilidad a *Agrobacterium*. El estado fisiológico del explante influye en gran medida en la tasa de transformación. En este sentido, se ha observado mayor éxito utilizando como explante tejidos en activa división (Schuerman & Dandekar, 1993), por lo que varios autores han empleado callos embriogénicos, hipocótilos y cotiledones (Mante *et al.*, 1991). Por lo general, en los sistemas mediados por *Agrobacterium* los explantes son sometidos a daño físico, lo cual influye en la eficiencia de la transformación (Rashid *et al.*, 1996). Según el método utilizado, las heridas se pueden originar durante el curso normal de la preparación del explante (Horsch *et al.*, 1985), o bien, empleando pistolas de partículas (Bidney *et al.*, 1992), jeringas cargadas con *Agrobacterium* (Chee *et al.*, 1989) o sonicación (Trick & Finer, 1997). Los reguladores de crecimiento vegetal (PGR) son esenciales en la transformación de las plantas (Karami, 2008). La competencia para la transformación puede estar ausente o ser baja en explantes recalcitrantes, sin embargo, puede mejorarse mediante tratamientos con PGR (Geier & Sangwan 1996; Sangwan *et al.*, 1992; Valvekens *et al.*, 1988; Villemont *et al.*, 1997). Asimismo, un explante puede adquirir susceptibilidad a *Agrobacterium* tras su precultivo en un medio con reguladores (Chateau *et al.*, 2000; Potrykus, 1990; Sangwan *et al.*, 1992; Valvekens *et al.*, 1988). En cuanto al efecto de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes sobre la transformación, Carvalho *et al.* (2004) observaron que embriones de sorgo provenientes de plantas criadas en un ambiente óptimo mostraron cierto crecimiento durante el co-cultivo y resultaron menos afectados negativamente por la inoculación con *Agrobacterium*, además de responder más rápidamente al cultivo de tejidos y contar con mayor probabilidad de supervivencia. Por el contrario, los explantes obtenidos de plantas crecidas en condiciones subóptimas, como estrés hídrico y baja temperatura, no mostraron ningún crecimiento aparente durante el co-cultivo y, a menudo, murieron después del co-cultivo.

#### **1.4. Regeneración *in vitro* y transformación genética de *L. tenuis***

La expresión de un marcado carácter heterocigótico en las poblaciones silvestres limitó el mejoramiento genético convencional en algunas especies del género *Lotus* (Kade *et al.*, 2003). El cultivo *in vitro* puede ser una alternativa para obtener progenie genéticamente homogénea y libre de enfermedades a partir de una sola planta (Suman, 2017). Además, la selección de células y callos de *Lotus* en medios que contienen hormonas constituye una herramienta útil para la selección de variantes de origen somaclonal en programas de

mejoramiento genético (Damiani *et al.*, 1985; Nikolić *et al.*, 1997; Swanson, 1983), de manera similar a lo que se ha observado para otras especies vegetales (Oger & Dessaux, 2003). Asimismo, el cultivo *in vitro* forma parte de los protocolos de transformación genética de las especies del género. El éxito de la misma depende de una alta frecuencia de regeneración, que varía entre especies o dentro de una especie determinada de *Lotus* (Oger & Dessaux, 2003). Por lo tanto, el genotipo resulta un aspecto clave para determinar la capacidad de regeneración del cultivo, lo cual requiere determinar las condiciones apropiadas para cada uno (Gökçe & Süleymanpaper, 2020; Oger & Dessaux, 2003). Se han realizado estudios de regeneración con *L. tenuis* (Espasandin *et al.*, 2010; Piccirilli *et al.*, 1988), *Lotus pedunculatus* Cav. (Pupilli *et al.*, 1990), *Lotus japonicus* (Regel) K. Larsen (Handberg & Stougaard, 1992; Lombardi *et al.*, 2003), *Lotus angustissimus* L. (Nenz *et al.*, 1996), *Lotus maritimus* (Gökçe & Süleymanpaper, 2020) y en particular con *L. corniculatus*, la especie más importante del género desde el punto de vista agronómico, cuyo cultivo *in vitro* se realiza desde los años 70 (Akashi, Hoffmann-Tsay & Hoffmann, 1998; Damiani, *et al.*, 2008; Nikolić *et al.*, 2006; Orcen, 2013).

Los protocolos desarrollados para la transformación de *Lotus* se basan en la sensibilidad de la mayoría de las especies del género a la transferencia de genes mediada por *A. tumefaciens* (Akashi, Uchiyama *et al.*, 1998; Oger *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 1996) o *A. rhizogenes* (Damiani *et al.*, 1993; Handberg & Stougaard, 1992; Nenz *et al.*, 1996; Oger *et al.*, 1996; Petit *et al.*, 1987; Stiller *et al.*, 1997). Esto no implica necesariamente que otros métodos, como el bombardeo de partículas, no funcionen de manera eficiente, sin embargo, el sistema *Agrobacterium* representa una solución versátil, barata y sencilla (Swanson *et al.*, 1990). La incorporación de la ingeniería genética como una alternativa aplicable a los planes de mejoramiento ha permitido reportar la transformación genética mediada por *Agrobacterium* en *L. angustissimus* (Nenz *et al.*, 1996), *L. corniculatus* (Armstead & Webb 1987; Bellucci *et al.*, 2000; Damiani *et al.*, 1993, 2008), *L. japonicus* (Aoki *et al.*, 2002; P. Díaz *et al.*, 2005; Lohar *et al.*, 2001; Stiller *et al.*, 1997) y *L. tenuis* (Damiani *et al.*, 1993; Espasandin *et al.*, 2010).

El protocolo de regeneración y transformación mediada por *A. tumefaciens* cepa GV3101 en *L. tenuis* (Espasandin *et al.*, 2010) fue aplicado exitosamente por el grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología de la unidad integrada UNNOBA-INTA en la obtención de líneas que presentan sobreexpresión del gen *LtNHX1* (Affinito *et al.*, 2021), pero dicho

protocolo presentó baja eficiencia, por lo que su optimización resultó necesaria. De manera previa a la realización de esta tesis, se comenzó a trabajar en la optimización del protocolo, por ejemplo, mediante la incorporación de acetosiringona en la transformación. Asimismo, se venía utilizando un genotipo derivado del cultivar Pampa INTA, por lo que en el presente trabajo se evaluaron otros genotipos de ese u otro origen en su capacidad de regeneración y elongación de tallos y se estudió si su lugar de cría afectaba los mismos. Además, se comparó la eficiencia de distintas cepas de *A. tumefaciens* en el proceso de transformación, evaluando la expresión transitoria del gen reportero *GUS*, que codifica la enzima  $\beta$ -glucoronidasa (Janssen & Gardner, 1990).

## **HIPÓTESIS**

En *Lotus tenuis*, la regeneración *in vitro* utilizando folíolos como explante depende del genotipo y del lugar de cría de la planta donadora del explante; y la eficiencia de transformación genética depende de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* utilizada.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Optimizar técnicas de regeneración *in vitro* y transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* en *Lotus tenuis* a fin de que puedan ser utilizadas para realizar edición génica.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar la capacidad de regeneración y elongación *in vitro* de genotipos de *L. tenuis* de diversos orígenes utilizando folíolos como explantes.
- Evaluar la eficiencia de regeneración y elongación *in vitro* de un genotipo de *L. tenuis* crecido en distintos ambientes (invernáculo, sala de crecimiento, *in vitro*).
- Comparar la eficiencia de transferencia de ADN de distintas cepas de *A. tumefaciens* al transformar folíolos de *L. tenuis* utilizando el gen reportero *GUS*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Pergamino de INTA (EEA INTA Pergamino).

### 4.1. Regeneración y elongación *in vitro* de distintos genotipos de *L. tenuis*

#### 4.1.1. Crecimiento de las plantas madres o donadoras del explante

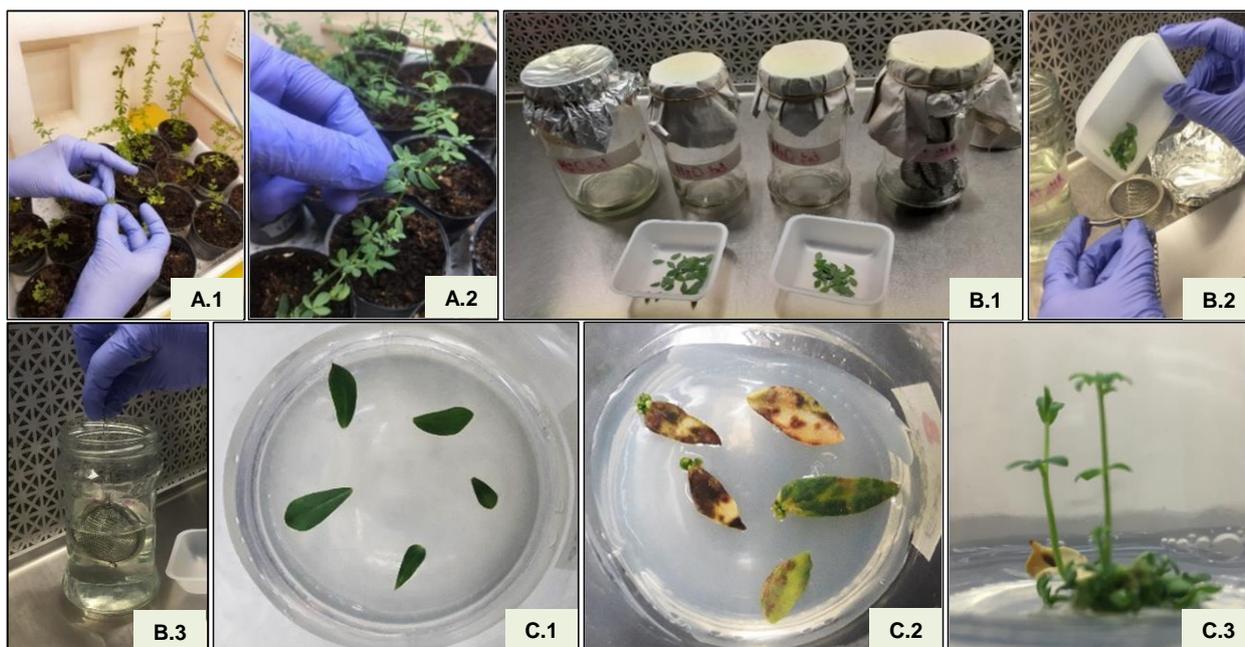
Se criaron en sala de crecimiento cinco genotipos de *L. tenuis* de diversos orígenes: uno proveniente del cultivar Esmeralda de la empresa Gentos (E3), tres del cultivar Pampa INTA (P1, P2 y PWt), y uno de la familia de medios hermanos 2297 del programa de Mejoramiento Genético de INTA Pergamino (2297). Se acondicionaron en macetas individuales usando como sustrato mezcla de tierra y perlita (2:1) a 24 °C con fotoperiodo de 16 hs de luz (Figura 6).



**Figura 6. Crecimiento de las plantas madres.** Ejemplares correspondientes a los cinco genotipos de *L. tenuis* ubicados en macetas en sala de crecimiento.

#### 4.1.2. Cultivo *in vitro*

Se tomaron 35 folíolos de cada genotipo y se esterilizaron con hipoclorito de sodio 2 g/L durante 5 min en flujo laminar horizontal. Posteriormente, se realizaron sucesivos lavados con agua bidestilada estéril y se colocaron en frascos conteniendo medio de regeneración semisólido (MR), a razón de cinco folíolos por frasco (Figura 7). El medio MR se compuso del medio basal MS 1X (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con las hormonas 6-bencilaminopurina 4,5 mg/L y ácido  $\alpha$ -naftalenacético 93  $\mu$ g/L, solución de vitaminas 1X (Sigma, EEUU), anfotericina 1,25 mg/L y agar 3 % (Espasandin *et al.*, 2010). Se dispusieron en un diseño completamente aleatorizado (DCA) en cuarto de cultivo a 22 °C y ciclo de 16 hs luz - 8 hs oscuridad. Se controló la regeneración una vez por semana y cuando el tejido morfogénico presentó un tamaño mayor a 5 mm, se traspasó a frascos con medio MS 0,5X para permitir la elongación de tallos.



**Figura 7. Cultivo *in vitro* de *L. tenuis*.** **A:** Obtención de material vegetal. **A.1** y **A.2:** Corte de folíolos de cinco genotipos de *L. tenuis* criados en sala de crecimiento. **B:** Esterilización de folíolos. **B.1:** Preparación de frascos con hipoclorito de sodio y agua bidestilada. **B.2:** Traspaso de folíolos a filtro de metal. **B.3:** Realización de lavados. **C:** Ensayo de regeneración y elongación. **C.1:** Disposición de folíolos en frascos con medio MR. **C.2:** Folíolos en regeneración. **C.3:** Elongación de tallos en medio MS 0,5X.

#### 4.1.3. Variables evaluadas

Se determinaron las siguientes variables:

- Porcentaje de regeneración: se calculó por frasco a los 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 91 días de ensayo según la ecuación:

$$\% \text{ de regeneración} = \frac{\text{Folículos con regeneración}}{\text{Folículos por frasco}} \times 100$$

**Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de regeneración.** Folículos con regeneración: explantes con presencia de tejido morfogénico. Folículos por frasco: explantes con y sin regeneración.

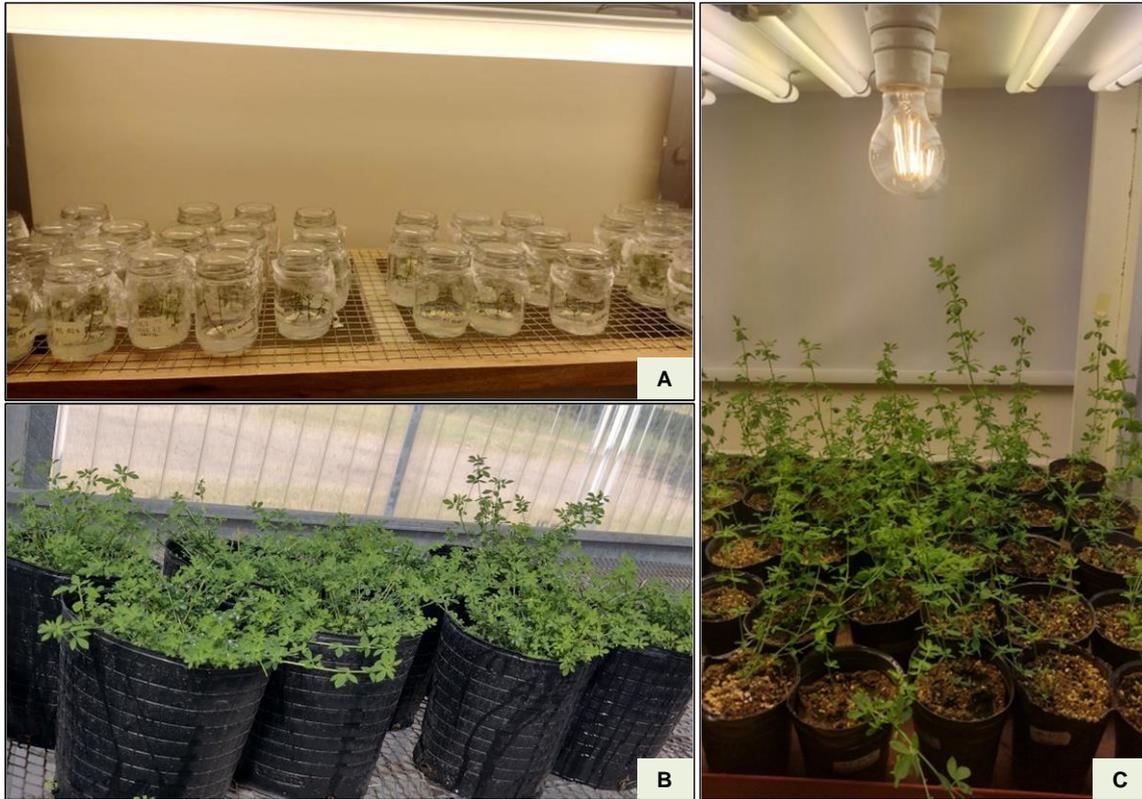
- Área regenerada (cm<sup>2</sup>): se determinó el área promedio por frasco a los 63 días de ensayo a partir del análisis de imágenes con el programa *ImageJ*. Para obtener los valores de la variable en unidades de área (cm<sup>2</sup>) se determinó una escala según Anexo I.
- Número de tallos por explante y altura de los mismos: los datos se registraron en dos momentos. En primer lugar, a los 100 días de iniciado el ensayo (100 ddi) se realizó el recuento de tallos de cada explante dentro del frasco con medio MR y se determinó su altura (mm) utilizando una regla. En segundo lugar, a medida que cada explante alcanzó 60 días del pasaje a MS 0,5X, fueron retirados de los frascos y colocados sobre una placa, donde se registró el número de tallos de cada uno y se determinó su altura utilizando regla (Figura 8). Posteriormente se descartaron, dando por concluido el ensayo.



**Figura 8. Elongación de tallos regenerados de un genotipo de *L. tenuis*. A:** Dentro de frasco para el registro a los 100 días de ensayo. **B:** Fuera del frasco transcurridos 60 días del pasaje a MS 0,5X.

#### **4.2. Regeneración y elongación *in vitro* del genotipo de *L. tenuis* previamente seleccionado crecido en distintos ambientes**

Una vez determinado el genotipo con mayor porcentaje de regeneración y elongación *in vitro*, se evaluó el lugar de cría del material de partida: explantes (folíolos) provenientes de plántulas crecidas *in vitro* (iv) (Figura 9.A), de plantas crecidas en invernáculo (I) (Figura 9.B) y de plantas crecidas en sala de crecimiento (S) (Figura 9.C). El genotipo se propagó vegetativamente y se creció en macetas con tierra y perlita (2:1) en sala de crecimiento y en invernáculo. Por otra parte, a partir de los explantes *in vitro* regenerados en la Sección 4.1.2, se cortaron tallos de 2-4 cm de largo y se incubaron en condiciones de esterilidad con ácido indolbutírico (IBA) 100 ppm durante 2 hs. Posteriormente, se pasaron a medio MS 0,5X y sirvieron como fuente de los explantes criados *in vitro* (iv).



**Figura 9. Genotipo de *L. tenuis* crecido en distintos ambientes.** Plantas del genotipo seleccionado crecidas en **A:** Cuarto *in vitro*, **B:** Invernáculo, **C:** Sala de crecimiento.

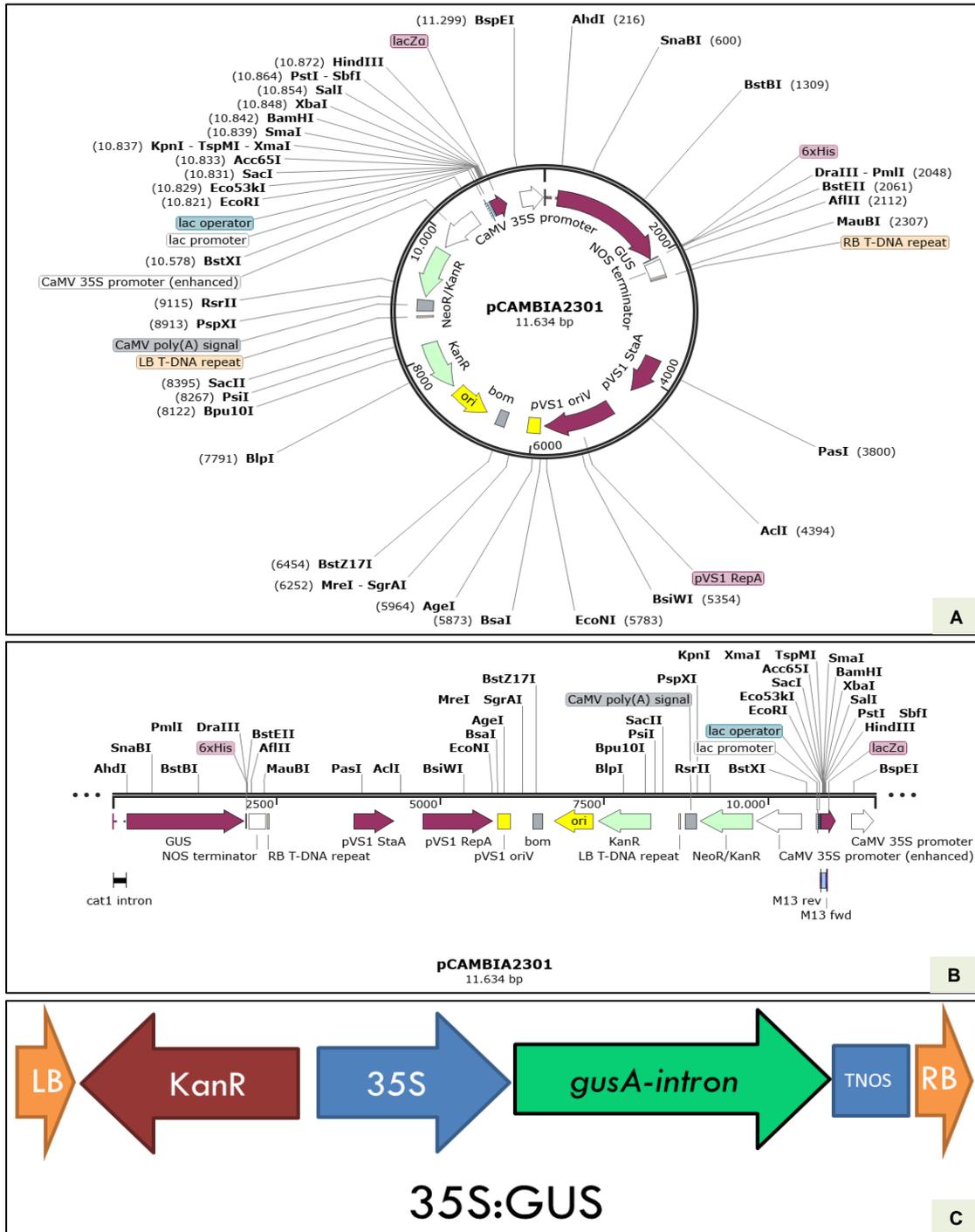
Finalmente, se utilizó la misma metodología que la descrita en la Sección 4.1.2 a excepción de los folíolos provenientes de plantas obtenidas *in vitro* en condiciones axénicas que se colectaron dentro del flujo laminar y no se esterilizaron. En este caso, se tomó con una pinza la planta del genotipo selecto previamente regenerado *in vitro*, y se colocó sobre placa de Petri. Los folíolos se cortaron con la ayuda de pinzas y bisturí.

El registro de las variables se realizó de la misma manera que en el ensayo anterior (Sección 4.1.3). El porcentaje de regeneración promedio se consideró a los 17, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días, mientras que el área regenerada promedio se evaluó a los 32 días de ensayo. Por su parte, el número promedio de tallos por explante y la altura promedio de los mismos se midieron a los 64 días de ensayo y a los 60 días del pasaje a MS 0,5X.

### 4.3. Transformación de *L. tenuis* mediante *Agrobacterium tumefaciens*

#### 4.3.1. Vector pCambia 2301

Para la transformación de folíolos de *L. tenuis* se utilizó el vector binario pCambia 2301 de 11634 pb (Figura 10). Los bordes izquierdo y derecho flanquean la región T-DNA de 5391 pb (Escoffié, 2003), que porta el gen reportero *gusA* (*uidA*) y el gen de selección *nptII*, ambos bajo el control transcripcional del promotor constitutivo CaMV35S (May, 2015). El gen reportero *gusA* codifica para la enzima  $\beta$ -glucoronidasa, que cliva al sustrato X-Gluc y genera una coloración azul índigo fácilmente detectable mediante la prueba histoquímica de *GUS*. Para asegurar que el gen solo se exprese en células eucariotas, y no aparezcan falsos positivos en la prueba por expresión en *A. tumefaciens*, se introdujo el intrón de la catalasa vegetal entre los exones de *GUS* (Gilissen *et al.*, 1998) constituyendo la construcción *gusA*-intrón. Durante el procesamiento del ARN inmaduro, el intrón del gen *GUS* es eliminado por *splicing* en la célula vegetal, pero esto no ocurre en las células procariontas, por lo que no se detecta la actividad de *GUS* en las bacterias que contienen la construcción. Por otro lado, el gen *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) otorga resistencia al antibiótico kanamicina utilizado para la selección de bacterias y plantas transformadas (Escoffié, 2003).



**Figura 10. Mapa y región T-DNA del vector pCambia 2301. A:** Conformación circular; **B:** Conformación lineal. Figuras obtenidas con el programa *SnapGene Viewer* (<https://snappgene.com/snappgene-viewer>). **C:** T-DNA. *KanR* (*nptII*): cassette que contiene al gen marcador selectivo que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II y confiere resistencia a kanamicina, con su promotor y terminador; 35S: promotor CaMV35S; *gusA*-intron: gen reportero que codifica la enzima  $\beta$ -glucoronidasa; TNOS: terminador de nopalina sintasa (NOS); LB: borde izquierdo; RB: borde derecho.

#### 4.3.2. Transformación bacteriana con pCambia 2301

Se generaron células competentes de *A. tumefaciens* cepas AGL1, EHA105 y LBA4404 y se transformaron con el plásmido mediante el método *freeze-thaw* (ver Anexo II). Para esto, se mezclaron 500 µL de células competentes con 2 µL del vector, se incubaron a 37 °C durante 2 min en un baño de agua y se colocaron 60 min en hielo mezclando cada 15 min. Luego, se adicionó 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) estéril y se incubó a 28 °C con agitación a 250 rpm durante 120 min. El medio LB se compone de triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L (Sambrook *et al.*, 1989). Posteriormente, se centrifugó 30 seg a 6000 rpm, se descartó el sobrenadante y se distribuyeron las bacterias en placas de Petri con LB-agar 14 g/L y los antibióticos correspondientes para la selección según la cepa (Tabla 1) y kanamicina para la selección del plásmido (50 µg/mL). Se incubaron 2 días a 28 °C y se realizó extracción de ADN plasmídico de las colonias resistentes a los antibióticos según lo indicado por Green & Sambrook (2016) (ver Anexo III).

Cepa	Agente selectivo	Concentración del agente selectivo	Dilución en LB en la transformación
AGL1	Rifampicina	12,5 µg/mL	1/10000
EHA105		25 µg/mL	1/40000
GV3101	Rifampicina	25 µg/mL	1/40000
	Gentamicina	50 µg/mL	
LBA4404	Rifampicina	50 µg/mL	1/1000
	Estreptomicina	100 µg/mL	

**Tabla 1. Resistencia a antibióticos y factor de dilución en medio LB de las cepas de *A. tumefaciens* empleadas para la transformación bacteriana con el vector pCambia 2301.**

Se realizó PCR con cebadores específicos (Tabla 2) para corroborar que las colonias contenían el plásmido pCambia 2301. Las células competentes de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens* fueron gentileza del Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF, INTA).

Nombre del cebador	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
gusA	TAGAAACCCCAACCCGTGAAA	58	326
	TGGCGTATAGCCGCCCTGAT		
nptII	GATGTTTCGCTTGGTGGTCG	58	402
	CAAGATGGATTGCACGCAGG		

**Tabla 2. Cebadores utilizados para la validación por PCR de la presencia del plásmido pCambia 2301 en distintas cepas de *A. tumefaciens*.** Se indica la secuencia, la temperatura de *annealing* (Tm) y el tamaño del amplicón que genera el par de cebadores en pares de bases (pb).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de reacción de 12,5 µL. En cada reacción se utilizó 0,13 µL de cada dNTP 200 µM, 1,67 µL de *Buffer* Taq 10X, 0,67 µL de Mg<sup>2+</sup> 2,5 mM, 0,26 µL de cada cebador 10 mM, 0,11 µL de Taq ADN Polimerasa Pegasus (PB-L, Argentina) y 30 ng de ADN templado. Se llevaron a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (ThermoFisher, Estados Unidos), utilizando el siguiente perfil de PCR: 1 min a 95 °C; 35 ciclos de 15 seg a 95 °C, 30 seg a la temperatura de *annealing* y 30 seg a 72 °C; y una etapa final de extensión de 7 min a 72 °C. El producto de amplificación fue resuelto en gel de agarosa 0,8 %, teñido con bromuro de etidio (0,5 g/mL).

#### 4.3.3. Transformación de *L. tenuis*

Se utilizó el protocolo de transformación genética de Espasandin *et al.* (2010), con modificaciones.

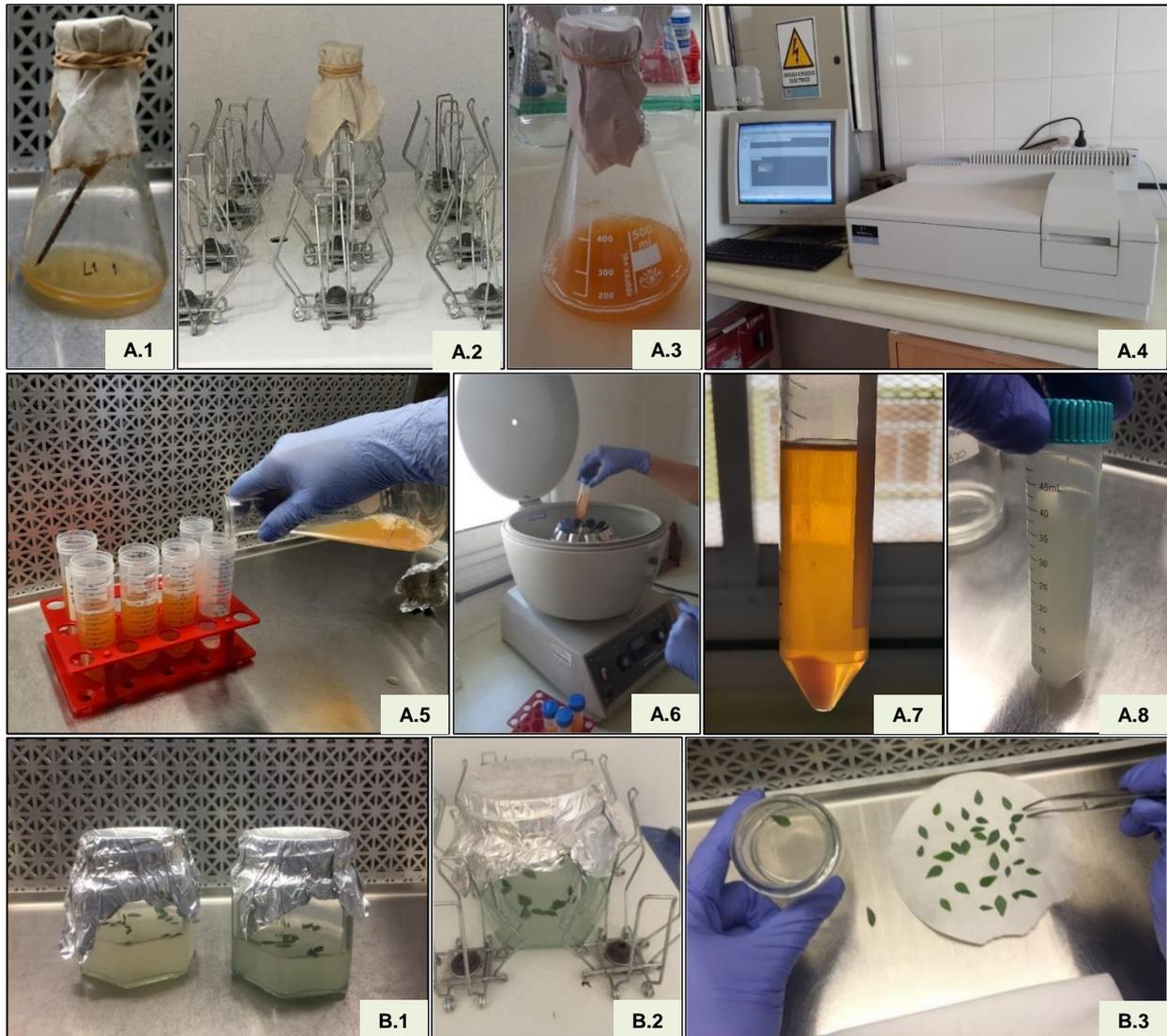
##### 4.3.3.1. Crecimiento y preparación de *A. tumefaciens*

Se prepararon cultivos de *A. tumefaciens* cepas GV3101, EHA105, LBA4404 y AGL-1 con el plásmido pCambia 2301 (Figura 11.A.1-8). El crecimiento de los cultivos se realizó a 28 °C en placas de Petri con medio LB-agar suplementado con antibióticos de selección correspondientes a cada cepa. Dos días antes de la transformación, se inocularon 2 mL de medio LB y antibióticos con una colonia. El preparado se incubó a 28 °C en agitación a 250 rpm ON (del inglés *Over Night*, durante la noche). Al día siguiente, se realizó una dilución en medio LB con antibióticos según la cepa y se incubó a 28 °C a 250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> (del inglés *Optical Density*, densidad óptica a 600 nm) de 0,4. Luego, el cultivo bacteriano se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Pasado este tiempo, se descartó el

sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 mL de medio MR líquido con acetosiringona 100  $\mu$ M. Finalmente, se cultivó en oscuridad por 60 min en agitación a 250 rpm y 28 °C, logrando de esta manera células competentes para infectar los folíolos.

#### **4.3.3.2. Preparación de los folíolos de *L. tenuis* y co-cultivo con *Agrobacterium***

Se obtuvieron 250 folíolos del genotipo seleccionado cultivado *in vitro*. Cada una de las cuatro suspensiones bacterianas competentes, obtenidas según la Sección 4.3.3.1, se incubaron con 50 folíolos en oscuridad durante 15 min a 250 rpm y 28 °C. Posteriormente, se escurrieron sobre papel de filtro estéril y se colocaron en placas de Petri con medio MR semisólido y acetosiringona 200  $\mu$ M (Figura 11.B.1-3). Los 50 folíolos restantes se colocaron directamente en placas de Petri con medio MR semisólido como control negativo de transformación. El co-cultivo se realizó durante 4 días en oscuridad a 22 °C.



**Figura 11. Técnica de transformación de folíolos *L. tenuis*.** **A:** Crecimiento y preparación de las cepas de *A. tumefaciens* portadoras del plásmido pCambia 2301. **A.1:** Inóculo bacteriano en medio LB suplementado con antibióticos. **A.2:** Agitación del preparado en incubadora a 250 rpm y 28 °C ON. **A.3:** Dilución del cultivo de *A. tumefaciens* crecido ON. **A.4:** Determinación de la densidad óptica del cultivo bacteriano en espectrofotómetro. **A.5:** Preparación de tubos con cultivo para centrifugación. **A.6:** Centrifugación del cultivo a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. **A.7:** Precipitado de bacterias obtenido por centrifugación. **A.8:** *Pellet* resuspendido en medio MR líquido con acetosiringona 100 µM. **B:** Preparación de los folíolos de *L. tenuis* y co-cultivo con *Agrobacterium*. **B.1:** Inmersión de folíolos en la suspensión bacteriana. **B.2:** Agitación del preparado en incubadora a 250 rpm durante 15 min a 28 °C. **B.3:** Secado de folíolos en papel de filtro para su posterior co-cultivo.

#### 4.3.3.3. Visualización de la transferencia del ADN-T mediante la técnica histoquímica de *GUS*

La detección del gen *gusA* (*uidA*) se basó en la actividad que presenta la  $\beta$ -glucuronidasa para catalizar la hidrólisis de X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónico, sal ciclohexilamonio) (Escoffié, 2003). La solución de X-Gluc se preparó con dimetilformamida a una concentración de 100 mg/mL a partir de la mezcla de sustrato (ver Anexo IV). Transcurridos los 4 días de co-cultivo, la mitad de los folíolos se colocó en tubos cónicos y se les adicionó la solución de coloración X-Gluc. Se incubó ON a 37 °C en oscuridad y se extrajeron los pigmentos mediante sucesivos lavados de concentraciones crecientes de etanol. La enzima interactuó con el sustrato y por dimerización oxidativa produjo un precipitado azul (May, 2015) observado en los folíolos transformados (Figura 12).



**Figura 12. Folíolos tratados y decolorados con X-Gluc.** Los explantes con tinción presentan expresión transitoria del gen *gusA*.

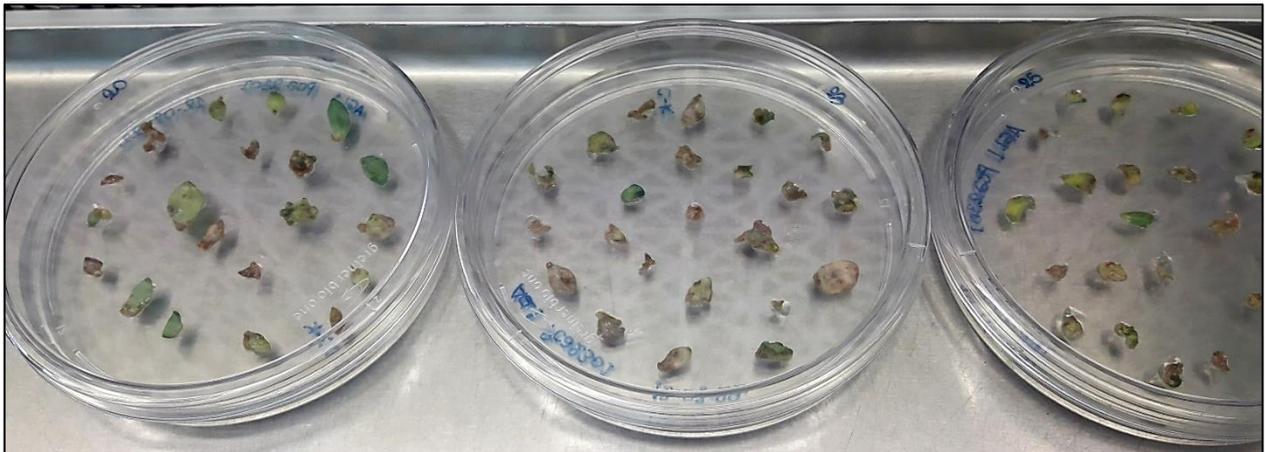
Se determinó el porcentaje de transferencia de cada cepa a partir del recuento de folíolos con coloración azul mediante su observación bajo la lupa (10X) según la ecuación:

$$\% \text{ de transferencia} = \frac{N^{\circ} \text{ de folíolos con tinción}}{N^{\circ} \text{ de folíolos observados}} \times 100$$

**Ecuación 2. Cálculo del porcentaje de transferencia de las cepas de *A. tumefaciens* empleadas en la transformación.** Folíolos con tinción: explantes positivos para la coloración X-Gluc. Folíolos observados: explantes positivos y negativos para la tinción examinados bajo lupa.

#### 4.3.3.4. Evaluación de la sobrevivencia de los explantes post-transformación

La otra mitad de los folíolos se colocó en medio MR con cefotaxima 400 µg/mL y kanamicina 25 µg/mL para permitir la regeneración de aquellos que hubieran sido transformados. A los 60 y a los 90 días se determinó la sobrevivencia de los explantes (Figura 13).



**Figura 13. Regeneración de folíolos en medio de regeneración (MR) con agente selectivo a 60 días de la transformación.** Los explantes corresponden al tratamiento con la cepa AGL1 de *A. tumefaciens*.

#### 4.4. Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante distintos procedimientos del *software* InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Se determinó si las variables presentaban distribución normal mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y mediante Q-Q plots de los residuos. También se realizaron gráficos de dispersión de los residuos *versus* los valores predichos. Se ajustaron modelos para heterogeneidad de variancias y/o datos correlacionados mediante el módulo de

modelos lineales generales y mixtos (MLM). En los casos en los que los datos no resultaron normales o no pudieron ajustarse por MLM, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Se utilizó un nivel de probabilidad de 0,05 para evaluar el grado de significancia estadística. Cuando se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), se aplicó el test de comparaciones múltiples DGC (prueba de formación de grupos excluyentes, Di Rienzo *et al.*, 2002) cuando se realizó ANOVA y el test de comparaciones múltiples de a pares de Conover cuando se realizó la prueba de Kruskal Wallis.

En el ensayo de genotipos se realizaron siete repeticiones por genotipo en un diseño experimental completamente aleatorizado. Para el análisis del porcentaje de regeneración se realizó ANOVA de dos factores (genotipo y tiempo) considerando medidas repetidas en el tiempo, utilizando estructura autorregresiva de orden 1 entre los errores del mismo frasco y varianza residual diferente en los distintos tiempos. Se siguió el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \varphi_j + (\gamma\varphi)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

**Ecuación 3. Modelo estadístico lineal para la variable porcentaje de regeneración en el ensayo de genotipos.**  $Y_{ijk}$ : Observación debida al  $i$ -ésimo genotipo en la  $j$ -ésima fecha.  $\mu$ : Media general.  $\gamma_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo genotipo.  $\varphi_j$ : Efecto de la  $j$ -ésima fecha.  $(\gamma\varphi)_{ij}$ : Efecto de la interacción entre el  $i$ -ésimo genotipo y la  $j$ -ésima fecha.  $\varepsilon_{ijk}$ : Error de la  $ijk$  observación.

Para el área regenerada se realizó ANOVA de un factor (genotipo) considerando varianza residual diferente en los distintos genotipos, según el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \kappa_i + \varepsilon_{ij}$$

**Ecuación 4. Modelo estadístico lineal para la variable área regenerada en el ensayo de genotipos.**  $Y_{ij}$ : Observación debida al  $i$ -ésimo genotipo.  $\mu$ : Media general.  $\kappa_i$ : Efecto del  $i$ -ésimo genotipo.  $\varepsilon_{ij}$ : Error de la  $ij$  observación.

Para el número de tallos y altura promedio de los mismos a los 100ddi y 60dMS, se aplicó la prueba de Kruskall Wallis debido a que los datos no eran normales ni pudieron ajustarse.

En el ensayo de comparación de lugares de cría de las plantas madres o donadoras de explantes se realizaron siete repeticiones por lugar en un diseño experimental completamente aleatorizado. Para el análisis del porcentaje de regeneración se realizó ANOVA de dos factores (lugar y tiempo) considerando medidas repetidas en el tiempo, utilizando estructura autorregresiva de orden 1 entre los errores del mismo frasco y varianza residual diferente en los distintos tiempos; para el área regenerada se realizó ANOVA de un factor (lugar), considerando varianza residual diferente para los distintos lugares de cría y para el número de tallos y altura promedio, la prueba de Kruskall Wallis. Los modelos estadísticos utilizados fueron similares a aquellos considerados en el ensayo de comparación de genotipos, pero considerando los efectos de los lugares de cría de las plantas madres.

En el ensayo de transformación se realizaron cinco repeticiones del protocolo con cada cepa. Para el análisis del porcentaje de folíolos con expresión transitoria obtenido con cada cepa se realizó ANOVA de un factor (cepa) y test de comparaciones múltiples DGC. La variable se analizó utilizando el siguiente modelo estadístico lineal:

$$Y_{ij} = \mu + \kappa_i + \varepsilon_{ij}$$

**Ecuación 5. Modelo estadístico lineal para el ensayo de transformación.**  $Y_{ij}$ : Observación debida a la  $i$ -ésima cepa.  $\mu$ : Media general.  $\kappa_i$ : Efecto de la  $i$ -ésima cepa.  $\varepsilon_{ij}$ : Error de la  $ij$  observación.

Se calculó el coeficiente de variación de los porcentajes de expresión transitoria por cepa y el coeficiente de correlación de Pearson entre el porcentaje de explantes con expresión transitoria y el porcentaje de explantes resistentes al agente de selección, kanamicina, a los 60 y 90 días de la transformación.

## RESULTADOS

### 5.1. Regeneración y elongación *in vitro* de distintos genotipos de *L. tenuis*

El primer ensayo consistió en evaluar el comportamiento promedio de distintos genotipos de *L. tenuis* a partir del análisis de las variables morfológicas presentadas en la Sección 4.1.3. Se encontraron diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) para todas las variables estudiadas excepto para el área regenerada a los 63 días de ensayo (Tabla 3). Asimismo, se observaron diferencias significativas entre fechas ( $p < 0,05$ ) e interacción significativa entre los genotipos y la fecha de evaluación ( $p < 0,05$ ) para la regeneración.

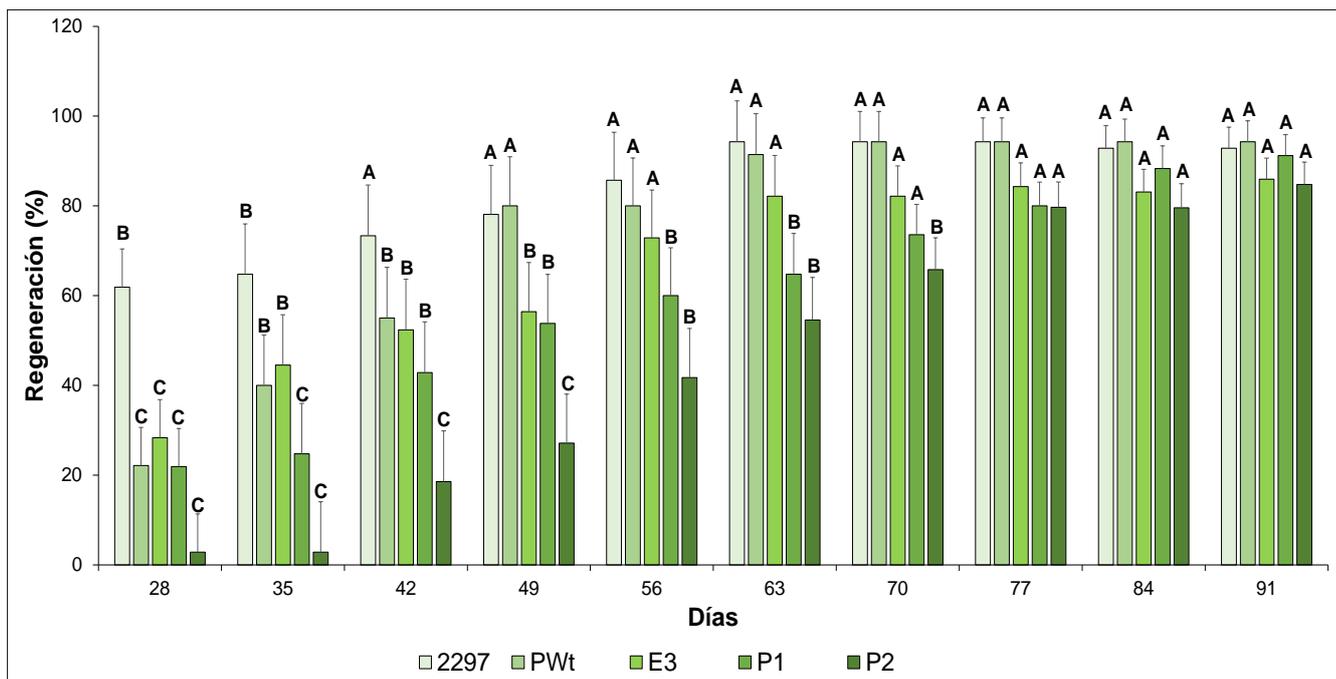
Variable	Momento de evaluación	Media	E.E.	Análisis p-valor
Regeneración (%)	Semanal hasta 91 ddi	61,74	1,80	Genotipo: 0,0007 Fecha: <0,0001 Genotipo*Fecha: 0,0278
Área regenerada (cm <sup>2</sup> )	63 ddi	0,0779	0,0077	Genotipo: 0,1602
Número de tallos/explante	100 ddi	1,43	0,26	Genotipo: <0,0001
	60 dMS	9,10	1,36	Genotipo: <0,0001
Altura promedio de tallos/explante (mm)	100 ddi	1,44	0,32	Genotipo: <0,0001
	60 dMS	4,21	0,69	Genotipo: <0,0001

**Tabla 3. Comportamiento promedio de los genotipos PWt, 2297, P1, P2 y E3 de *L. tenuis* para las variables regeneración, área regenerada y número y altura de tallos por explante.** Media, error estándar (E.E.), coeficiente de variación (CV) y p-valor para genotipo, fecha e interacción genotipo\*fecha, cuando corresponde. ddi: Días desde inicio del ensayo; dMS: Días desde el traspaso del explante a medio MS 0,5X.

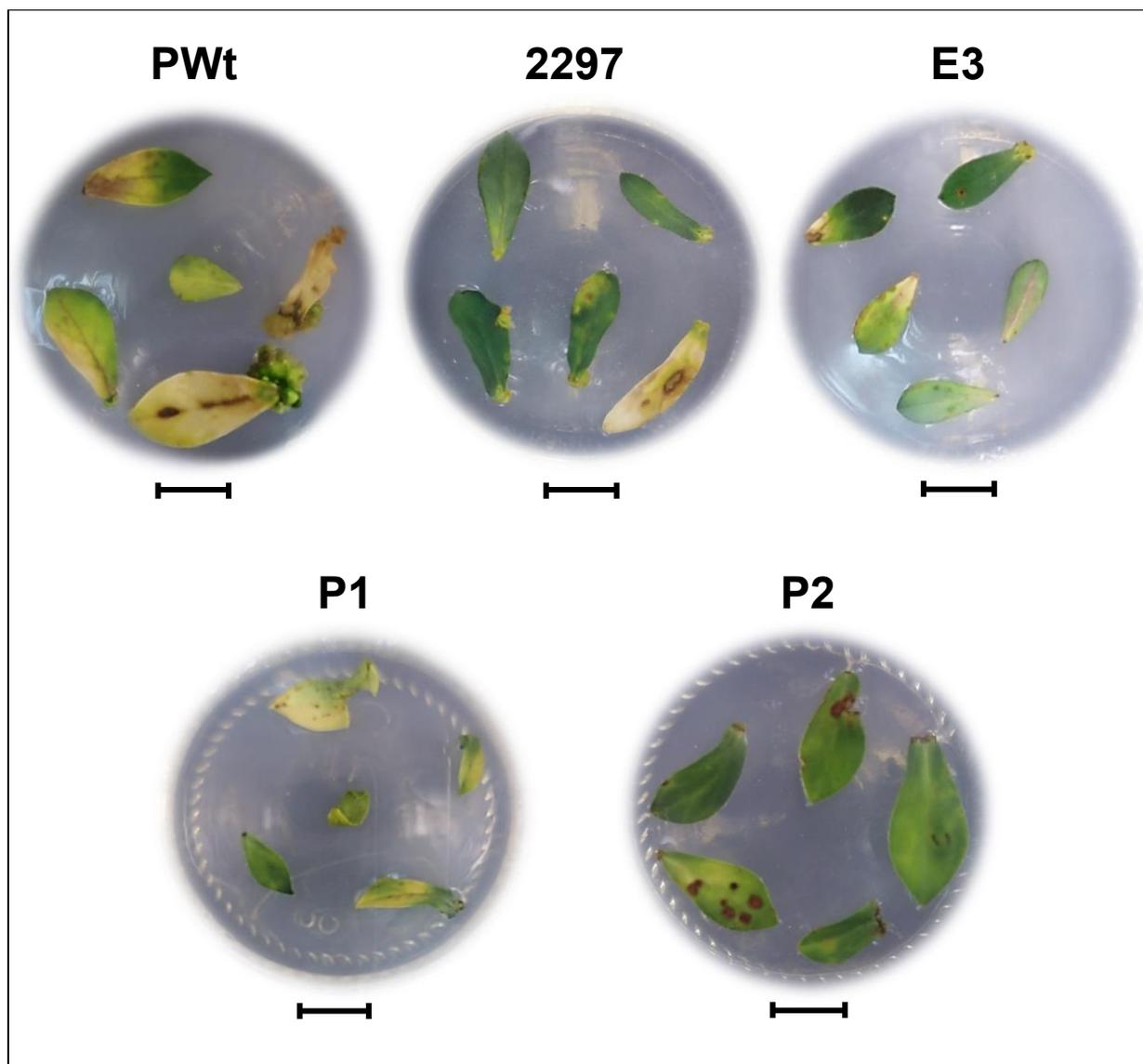
#### 5.1.1. Regeneración *in vitro*

Para evaluar si la regeneración *in vitro* era dependiente del genotipo del explante, se registró semanalmente el porcentaje de regeneración de los folíolos hasta los 91 días de ensayo y se midió su área regenerada a los 63 días. La Figura 14 muestra que el genotipo

2297 presentó porcentajes significativamente mayores a los demás genotipos hasta los 42 días de ensayo. Puede observarse que a los 28 días, alcanzó una regeneración del  $62 \pm 9$  % (ver Anexo V), mientras que el resto de los genotipos no superó el 30 %. Tras una semana, el genotipo 2297 no incrementó considerablemente su porcentaje de regeneración ( $65 \pm 11$  %) mientras que los genotipos PWt y E3 superaron el 40 %. Por su parte, P1 y P2 mantuvieron una regeneración inferior al 30 %. A los 42 días, el genotipo 2297 logró una regeneración de  $73 \pm 11$  %, mientras que PWt, E3 y P1 mostraron valores entre el 40 % y el 55 %, y P2 no logró alcanzar el 20 %. Una semana después, los genotipos 2297 y PWt se diferenciaron del resto con porcentajes de aproximadamente 80 % (Figura 15). En las siguientes semanas, los demás genotipos fueron acercándose a estos dos y dejaron de presentar diferencias significativas con ellos, hasta que a los 77 días, todos los genotipos presentaron valores similares de regeneración, superando el 80 %. A los 91 días, todos los genotipos alcanzaron una regeneración superior al 85 %. Cabe destacar que una vez que cada genotipo superó aproximadamente el 70 % de regeneración, el porcentaje no presentó incrementos significativos durante el resto del ensayo. En este sentido, los genotipos que lograron una regeneración superior al 70 % en menor tiempo fueron 2297 (42 días) y PWt (49 días).

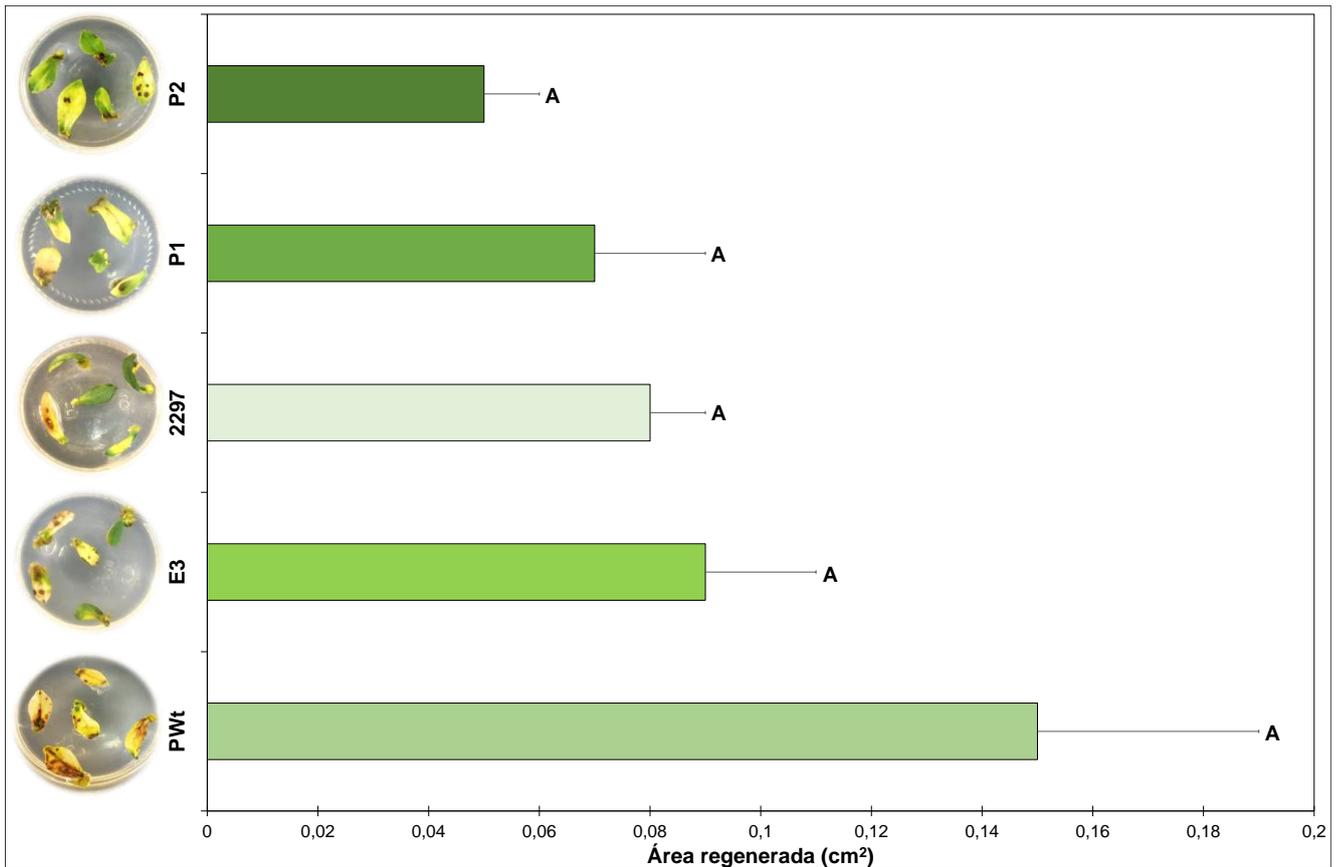


**Figura 14. Regeneración de distintos genotipos de *L. tenuis* a los 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 91 días de ensayo.** La regeneración se expresa en %. 2297: Genotipo de una familia de medios hermanos de INTA E3: Genotipo proveniente del cultivar Esmeralda, PWt, P1 y P2: Genotipos provenientes del cultivar Pampa INTA. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.



**Figura 15. Regeneración de folíolos de los cinco genotipos de *L. tenuis* evaluados a los 49 días de ensayo. Barra: 1 cm.**

Los folíolos provenientes de distintos genotipos no presentaron valores significativamente diferentes entre sí para el área regenerada a los 63 días ( $p > 0,05$ ). Cabe aclarar que, si bien en la Figura 16 puede observarse cierta tendencia que indica mayor área regenerada de PWt, el conjunto de datos correspondiente a este genotipo presenta dispersión. En este sentido, a causa de la variabilidad presente, no se encontraron diferencias significativas entre el área regenerada de PWt y la del resto de los genotipos. Los valores medios de regeneración se detallan en el Anexo V.

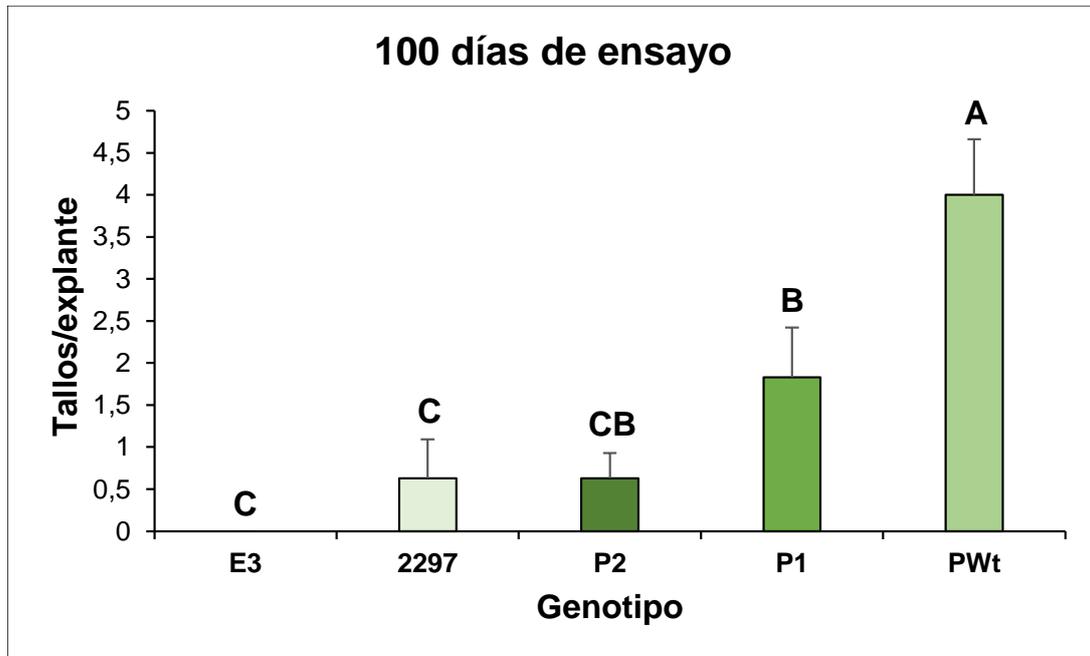


**Figura 16. Área regenerada promedio de folíolos de distintos genotipos de *L. tenuis* a los 63 días de ensayo.** El área se expresa en  $\text{cm}^2$ . Las barras indican medias y error estándar. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

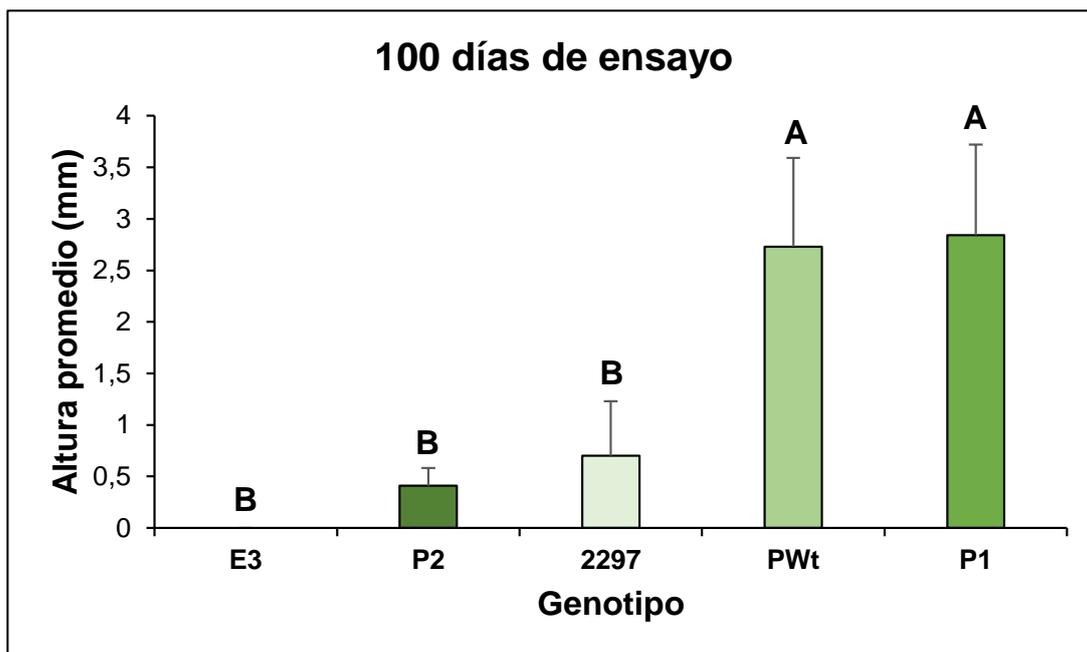
### 5.1.2. Elongación de tallos

Para determinar si la elongación *in vitro* resultaba dependiente del genotipo, se registró el número de tallos por explante y la altura de los mismos a los 100 días de ensayo y a los 60 días del traspaso de tejido morfogénico a medio MS 0,5X. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los genotipos para ambas variables evaluadas a los 100 días de iniciado el ensayo. En la Figura 17 se puede observar que PWt presentó mayor número de tallos por explante que los demás genotipos con un promedio  $4,00 \pm 0,66$  tallos (ver Anexo V). Por su parte, P1 y P2 mostraron un número de tallos similar entre sí y significativamente inferior que PWt. Así mismo, el genotipo 2297 tuvo un comportamiento similar a P2 para la misma variable. Debe destacarse que en el período de tiempo ensayado el genotipo E3 no desarrolló tallos. A partir de la Figura 18 se puede observar que los genotipos destacados por presentar mayor altura de los tallos regenerados fueron P1, con

una altura media de  $2,84 \pm 0,88$  mm, y PWt, que presentó una altura promedio de  $2,73 \pm 0,86$  mm. Entre ellos no se evidenciaron diferencias significativas para esta variable, pero resultaron superiores a los demás genotipos. En este sentido, P2 y 2297 mostraron un comportamiento similar entre sí respecto a la altura de los tallos.



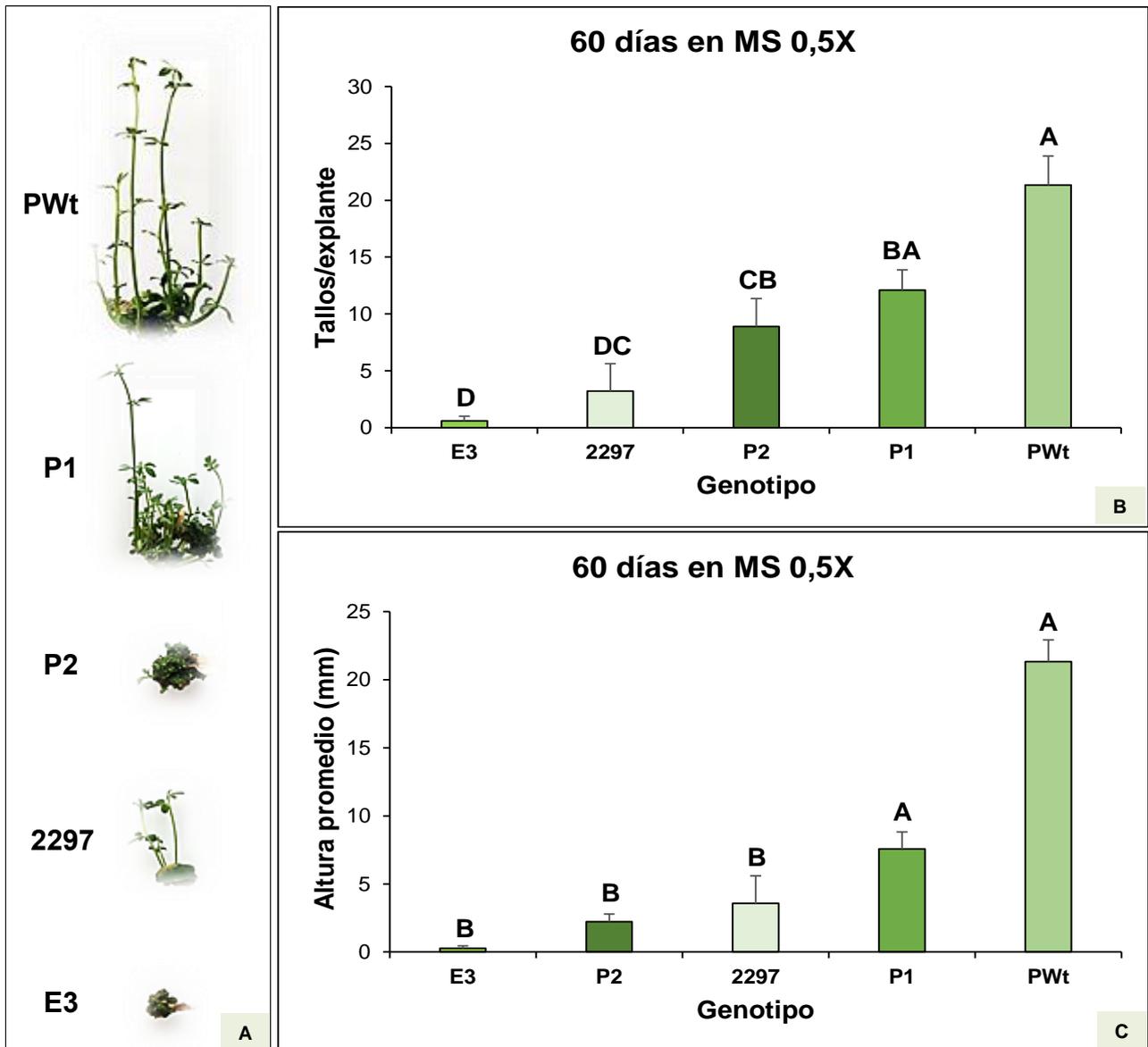
**Figura 17. Número de tallos por explante de los cinco genotipos de *L. tenuis* evaluados a los 100 días de ensayo y error estándar asociado. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples de a pares de Conover.**



**Figura 18. Altura promedio de tallos por explante de los cinco genotipos de *L. tenuis* evaluados a los 100 días de ensayo y error estándar asociado.** La altura se expresa en mm. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples de a pares de Conover.

Cada explante regenerado fue quitado del frasco a los 60 días de su traspaso a medio MS 0,5X, se contó el número de tallos por explante y se midió su altura (Figura 19.A). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los genotipos en el número y la altura de tallos por explante. La Figura 19.B muestra que PWt y P1 no presentaron diferencias significativas en el número de tallos por explante, con valores medios de  $21,33 \pm 2,56$  y  $12,1 \pm 1,79$  tallos, respectivamente (ver Anexo V). Por su lado, P2 se comportó de forma similar a P1, aunque su número de tallos promedio fue inferior al de PWt. E3 y 2297 presentaron valores promedio inferiores a PWt y P1. De acuerdo con la Figura 19.C los genotipos que mostraron mayor altura fueron PWt, con una altura media de  $21,33 \pm 1,6$  mm, y P1, con una altura promedio de  $7,57 \pm 1,26$  mm. Por su parte, E3, P2 y 2297 mostraron un comportamiento similar entre sí para la misma variable. En general, el comportamiento entre genotipos para la altura de los tallos regenerados resultó semejante al observado a los 100 días de ensayo. Sin embargo, a diferencia de lo observado en ese momento, el genotipo E3 desarrolló tallos, pese a mostrar el menor número y altura de estos en conjunto con el genotipo 2297. Asimismo, PWt y P1 no presentaron diferencias

significativas entre sí para ninguna de las dos variables, resultando superiores al resto de los genotipos.



**Figura 19. Elongación de tallos de los cinco genotipos de *L. tenuis* a los 60 días del traspaso del tejido morfogénico a medio MS 0,5X. A:** Tallos regenerados a partir de folíolos de los cinco genotipos. MS: medio de elongación. **B:** Número de tallos por explante y error estándar asociado. **C:** Altura promedio de tallos por explante y error estándar asociado. La altura se expresa en mm. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples de a pares de Conover.

## 5.2. Regeneración y elongación *in vitro* del genotipo PWt de *L. tenuis* crecido en distintos ambientes

El segundo ensayo consistió en evaluar el comportamiento promedio del genotipo PWt de *L. tenuis* proveniente de distintos ambientes, a partir del análisis de las variables morfológicas presentadas en la Sección 4.1.3. Se encontraron diferencias significativas entre ambientes ( $p < 0,05$ ) para todas las variables estudiadas, excepto para el número de tallos y la altura promedio de los mismos a los 60 días del traspaso del tejido morfogénico a MS 0,5X (Tabla 4). Asimismo, se observó diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre fechas e interacción significativa ( $p < 0,05$ ) entre los ambientes y la fecha de evaluación para la regeneración.

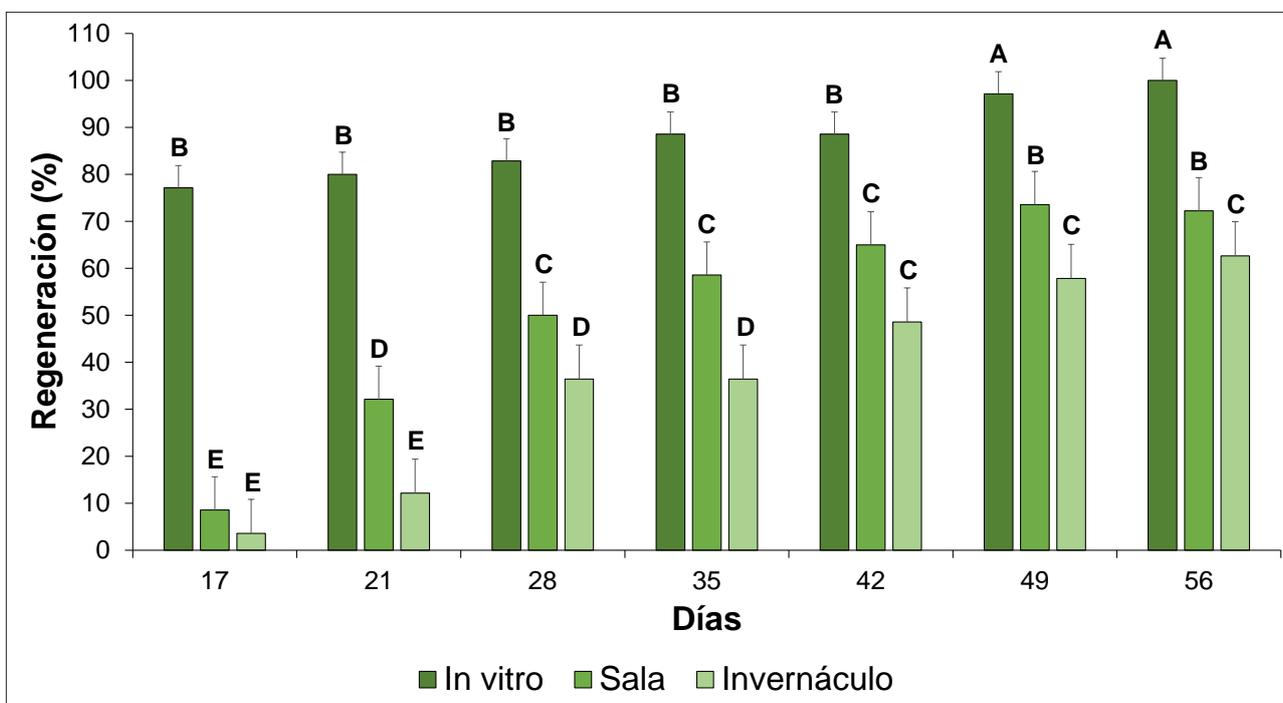
Variable	Momento de evaluación	Media	E.E.	Análisis estadístico p-valor
Regeneración (%)	Semanal hasta 56 ddi	58,49	2,66	Lugar: <0,0001 Fecha: <0,0001 Lugar*Fecha: <0,0001
Área regenerada (cm <sup>2</sup> )	32 ddi	0,0929	0,0260	Lugar: 0,0006
Número de tallos/explante	64 ddi	5,32	0,76	Lugar: <0,0001
	60 dMS	45,50	5,50	Lugar: 0,1172
Altura promedio de tallos/explante (mm)	64 ddi	1,91	0,28	Lugar: 0,0006
	60 dMS	5,86	0,75	Lugar: 0,4223

**Tabla 4. Comportamiento promedio del genotipo PWt de *L. tenuis* proveniente de tres ambientes (*in vitro*, sala de crecimiento e invernáculo) para la variable regeneración y número y altura de tallos por explante.** Media, error estándar (E.E.) y p-valor para lugar, fecha e interacción lugar\*fecha, cuando corresponde. ddi: Días desde inicio del ensayo; dMS: Días desde el traspaso del explante a medio MS 0,5X.

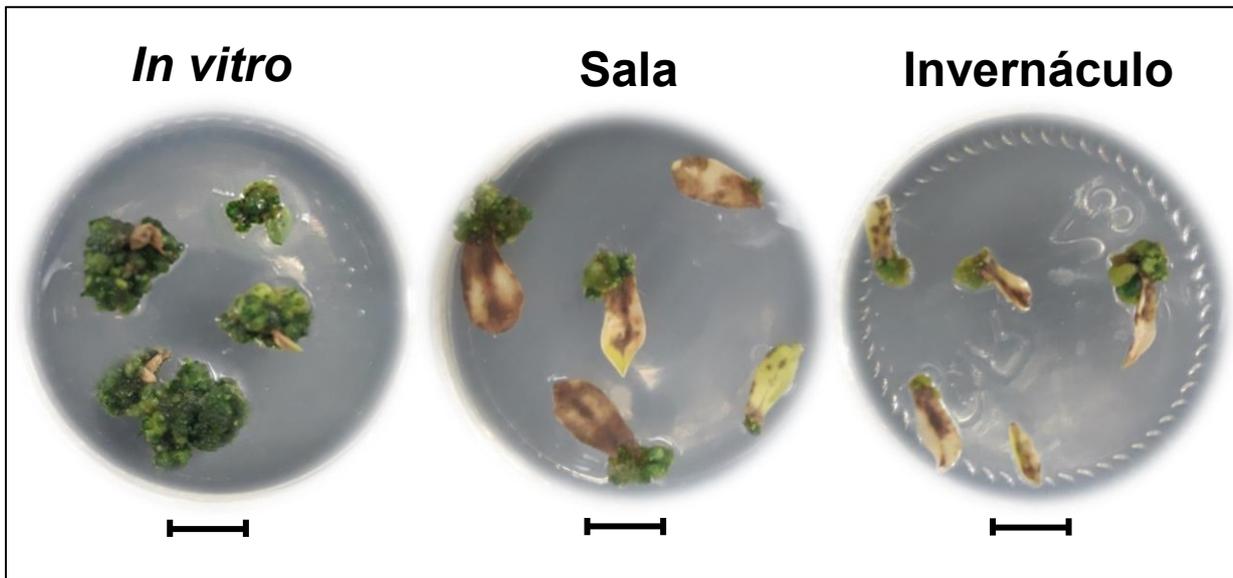
### 5.2.1. Regeneración *in vitro*

Para evaluar si la regeneración *in vitro* de PWt era dependiente del ambiente de donde provino el explante, se registró semanalmente el porcentaje de regeneración de los folíolos

hasta los 56 días de ensayo y se midió su área regenerada a los 32 días. Como se presenta en la Figura 20, se observó que en todos los momentos de evaluación los folíolos provenientes de cultivo *in vitro* presentaron mayor porcentaje de regeneración que los provenientes de sala de crecimiento, y estos a su vez presentaron mayores porcentajes que los de invernáculo. A los 17 días, los folíolos provenientes de *cultivo in vitro* alcanzaron un  $77 \pm 5$  % de regeneración (ver Anexo VI), mientras que los procedentes de sala e invernáculo no superaron el 10 %. A lo largo del tiempo, se fue incrementando el porcentaje de regeneración de los tres orígenes, manteniendo el ranking (Figura 21). Finalmente, a los 56 días, los folíolos procedentes de *cultivo in vitro* alcanzaron el 100 % de regeneración, y los de los ambientes restantes se mantuvieron por debajo del 75 %.

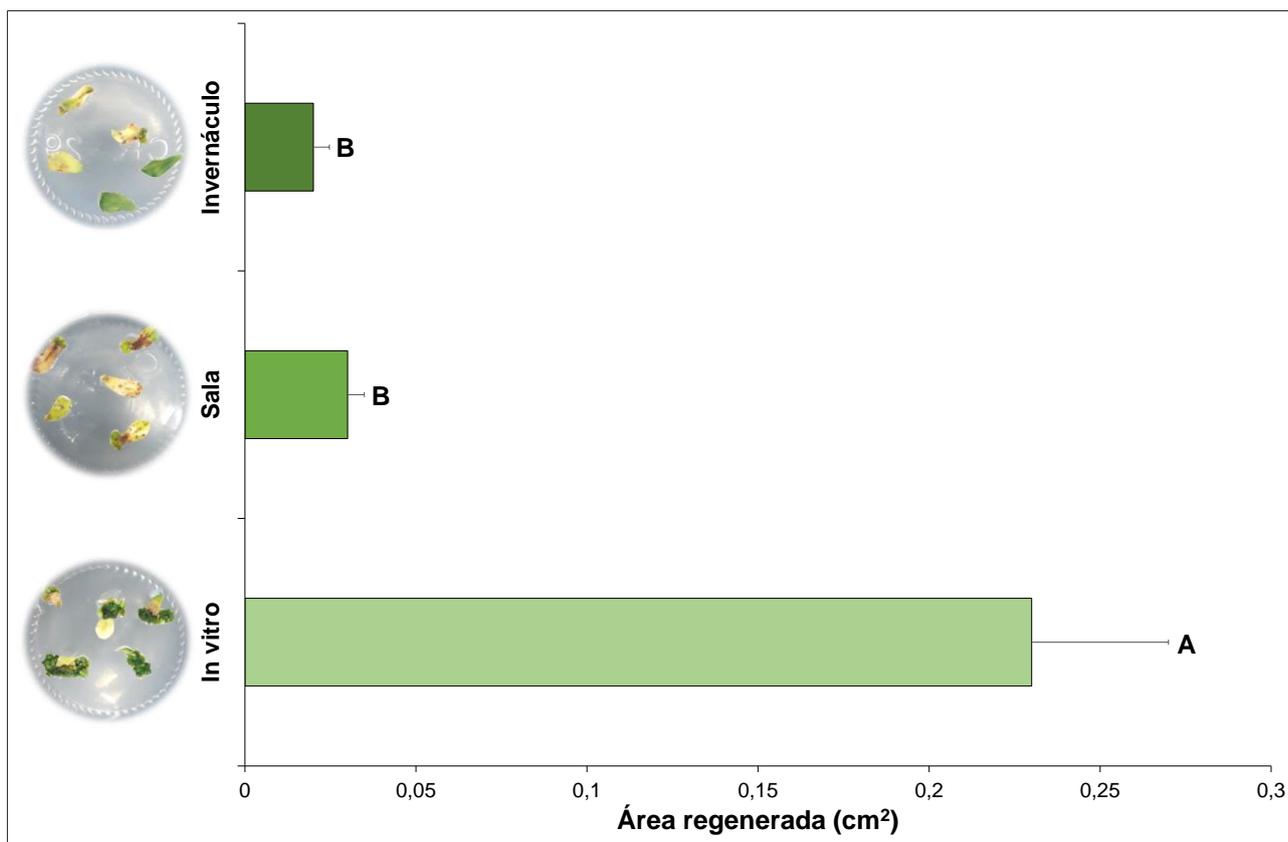


**Figura 20. Regeneración de folíolos del genotipo PWT de *L. tenuis* provenientes de tres ambientes (*in vitro*, en sala de crecimiento e invernáculo) a los 17, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 días de ensayo. La regeneración se expresa en %. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre ambientes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.**



**Figura 21. Regeneración de folíolos del genotipo PWt de *L. tenuis* proveniente de tres ambientes (*in vitro*, en sala de crecimiento e invernáculo) a los 49 días de ensayo. Los explantes crecidos *in vitro* presentaron mayor área regenerada que el resto. Barra: 1 cm.**

Para obtener el valor de área regenerada se utilizó la misma metodología que en el ensayo de genotipos (ver Anexo I). A los 32 días de ensayo, los folíolos crecidos *in vitro* presentaron un área regenerada promedio de  $0,23 \pm 0,04 \text{ cm}^2$  (ver Anexo VI), significativamente superior a aquellos cultivados en sala e invernáculo, que no presentaron diferencias entre ellos, con áreas promedio de  $0,03 \pm 4,90^{-3} \text{ cm}^2$  y  $0,02 \pm 4,70^{-3} \text{ cm}^2$ , respectivamente (Figura 22).



**Figura 22.** Área regenerada promedio de folíolos del genotipo PWt de *L. tenuis* provenientes de tres ambientes (*in vitro*, en sala de crecimiento e invernáculo) a los 32 días de ensayo. El área se expresa en cm<sup>2</sup>. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre ambientes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

### 5.2.2. Elongación de tallos

Para determinar si la elongación *in vitro* de PWt resultaba dependiente del ambiente, se registró el número de tallos por explante y la altura de los mismos en explantes de este genotipo crecido *in vitro*, en sala de crecimiento e invernáculo, a los 64 días de ensayo y a los 60 días del traspaso de tejido morfogénico a medio MS 0,5X. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los ambientes para ambas variables evaluadas a los 64 días de ensayo. En las Figuras 23 y 24 puede observarse que los explantes provenientes de cultivo *in vitro* presentaron un número y altura de tallos significativamente superior que aquellos procedentes de los ambientes restantes, mostrando un promedio de  $8,89 \pm 0,92$  tallos y una altura media de  $2,72 \pm 0,4$  mm (ver Anexo VII). Los explantes crecidos en invernáculo y sala mostraron un comportamiento similar entre sí y no evidenciaron diferencias significativas entre ellos para ambas variables.

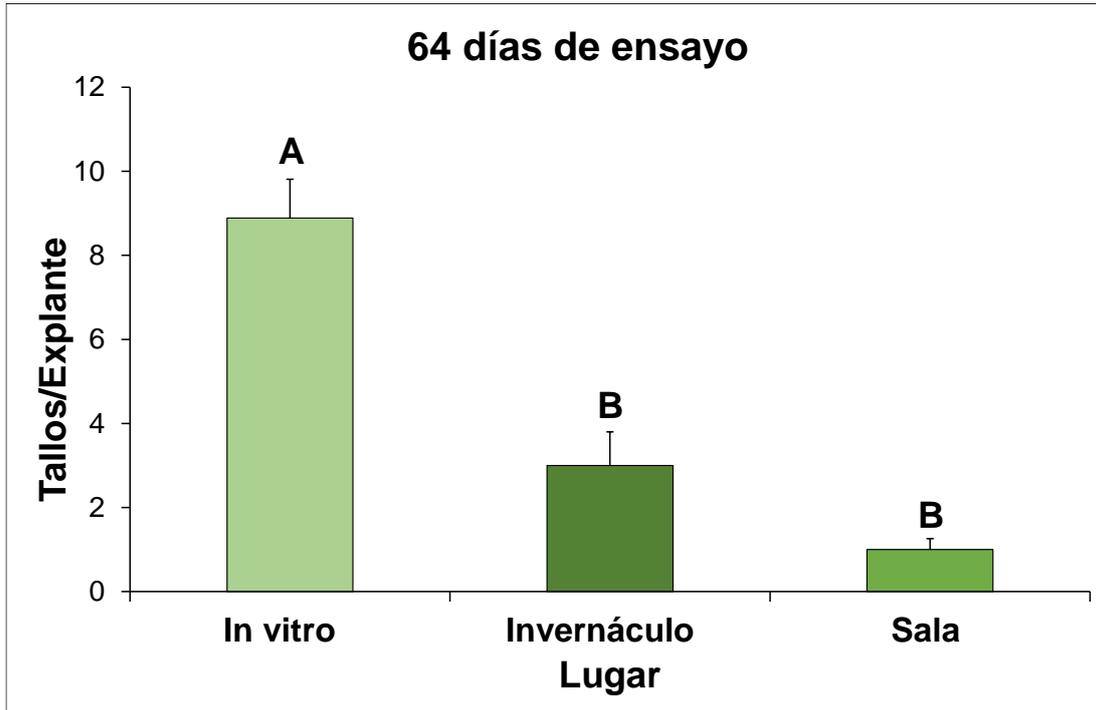


Figura 23. Número de tallos por explante de los cinco genotipos de *L. tenuis* evaluados a los 100 días de ensayo y error estándar asociado. Letras distintas indican diferencias significativas entre ambientes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

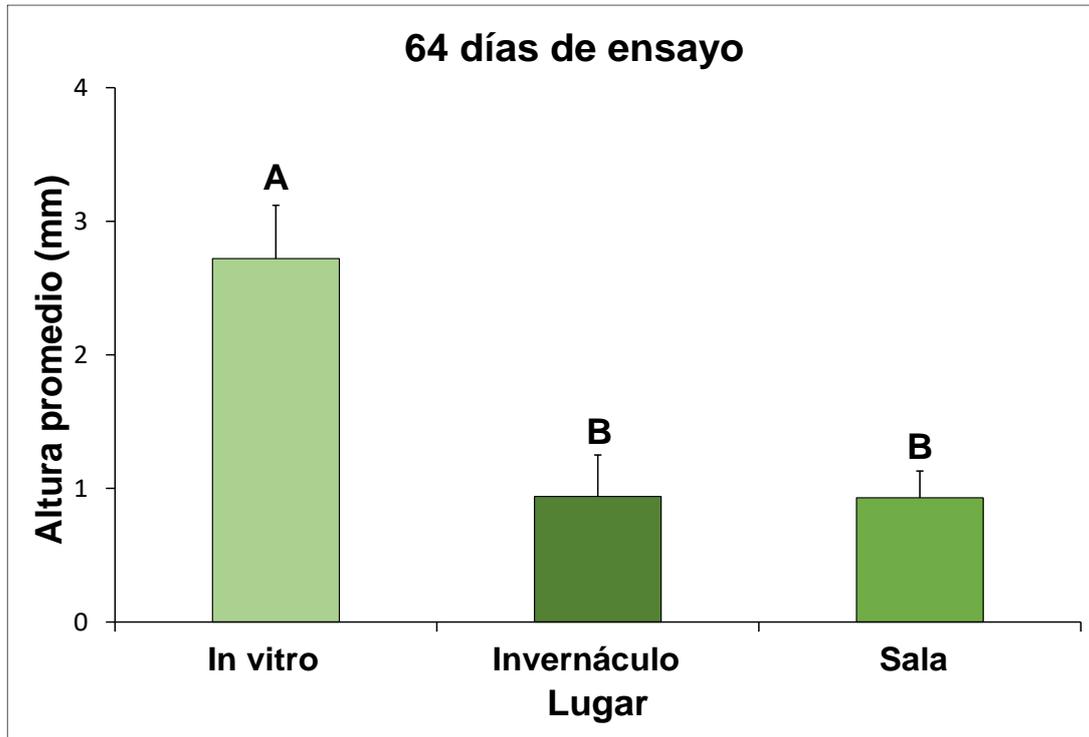
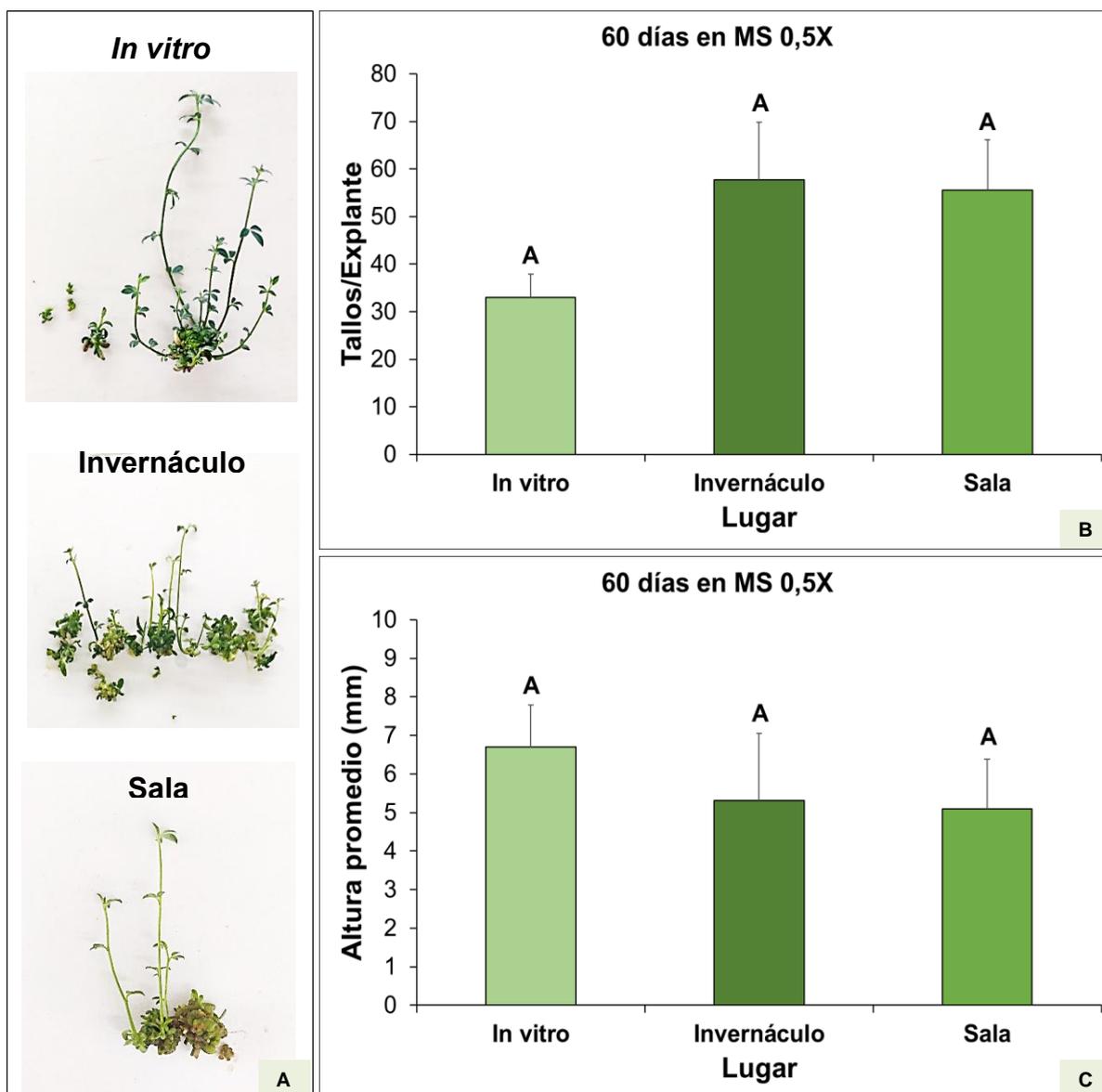


Figura 24. Altura promedio de tallos por explante de folíolos del genotipo PWt de *L. tenuis* crecido en tres ambientes (*in vitro*, en sala de crecimiento e invernáculo) evaluados a los a los 64 días del cultivo *in vitro* y error estándar asociado. La altura se expresa en mm. Letras distintas indican diferencias significativas entre ambientes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

Cada explante regenerado fue retirado del frasco a los 60 días de su traspaso a medio MS 0,5X, se contó el número de tallos por explante y se midió su altura (Figura 25.A). A diferencia de lo observado a los 64 días de ensayo y como se muestra en la Figura 25.B-C, los folíolos provenientes de los distintos ambientes no presentaron diferencias significativas para ninguna de las dos variables ( $p > 0,05$ ). Los valores medios de elongación a los 60 días del traspaso a medio MS 0,5X se hallan especificados en el Anexo VI.

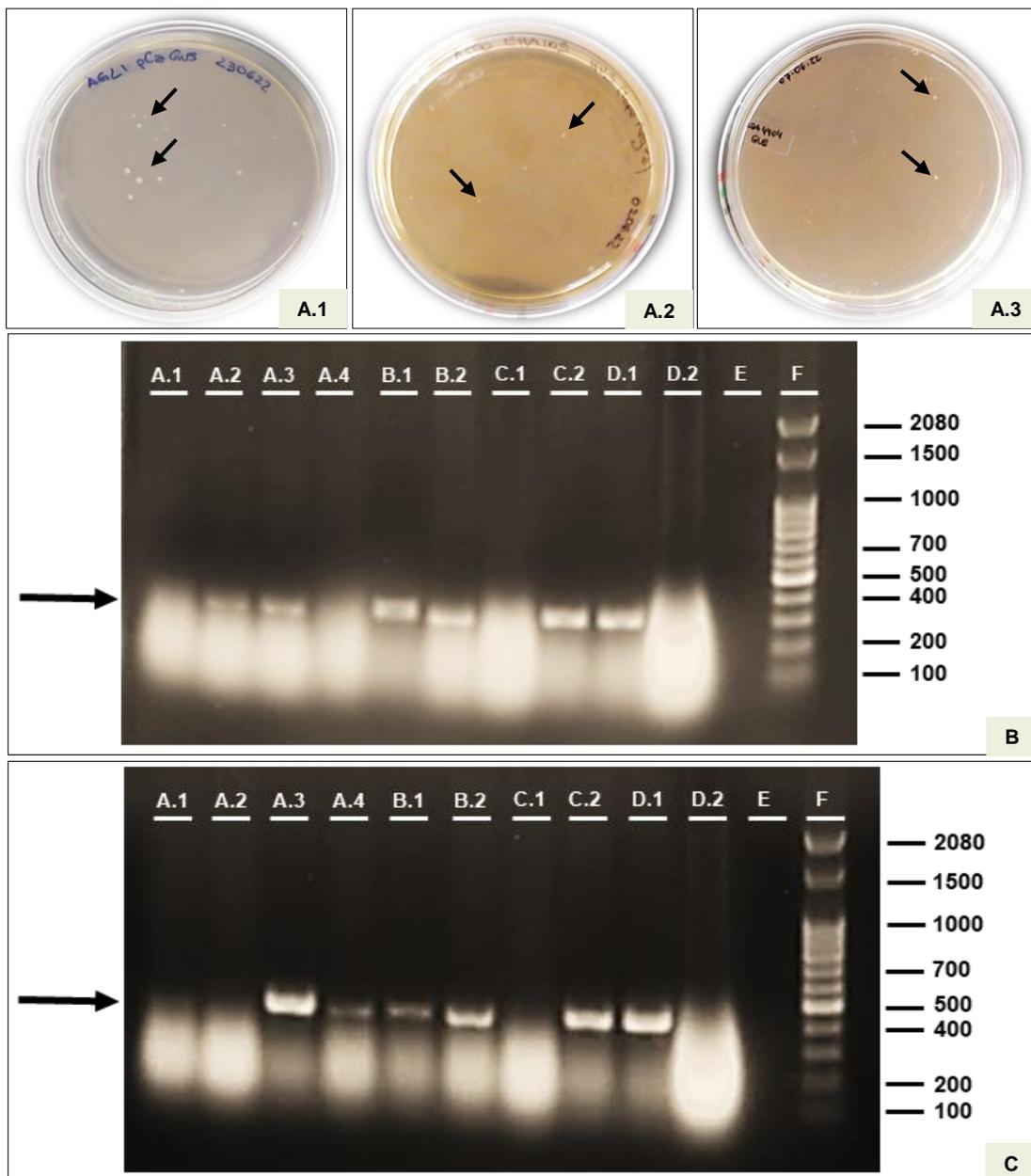


**Figura 25. Elongación de tallos a partir de folíolos del genotipo PWt crecido *in vitro*, en sala de crecimiento e invernáculo, a 60 días del traspaso del tejido morfogénico a medio MS 0,5X. A:** Tallos regenerados a partir de folíolos de PWt crecido en tres ambientes. MS: medio de elongación. **B:** Número de tallos por explante de PWt crecido en tres ambientes y error estándar asociado. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC. **C:** Altura promedio de tallos por explante de PWt proveniente de tres ambientes y error estándar asociado. La altura se expresa en mm. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

### 5.3. Transformación de *L. tenuis* mediante *A. tumefaciens*

#### 5.3.1. Transformación bacteriana

Se logró la transformación de las cepas AGL1, EHA105 y LBA4404 con el plásmido pCambia 2301 mediante el método *freeze-thaw*. Las bacterias transformantes crecieron en medio selectivo con antibióticos para cada cepa y kanamicina (Figura 26.A.1-3). Luego, a través de una PCR se corroboró la presencia del vector en las tres cepas bacterianas. En las Figuras 26.B y 26.C se muestra el perfil electroforético obtenido a partir del ADN plasmídico aislado del cultivo bacteriano. Se observa una banda en la región entre 200 y 400 pb, coincidente con el tamaño esperado para el gen *gusA* (Figura 26.B), y una banda en la región entre 400 y 500 pb, concordante con el tamaño esperado para el gen *nptII* (Figura 26.C), ambos presentes en el vector. Esto permitió confirmar la identidad del plásmido extraído y suponer que se obtuvo una población de bacterias transformantes.

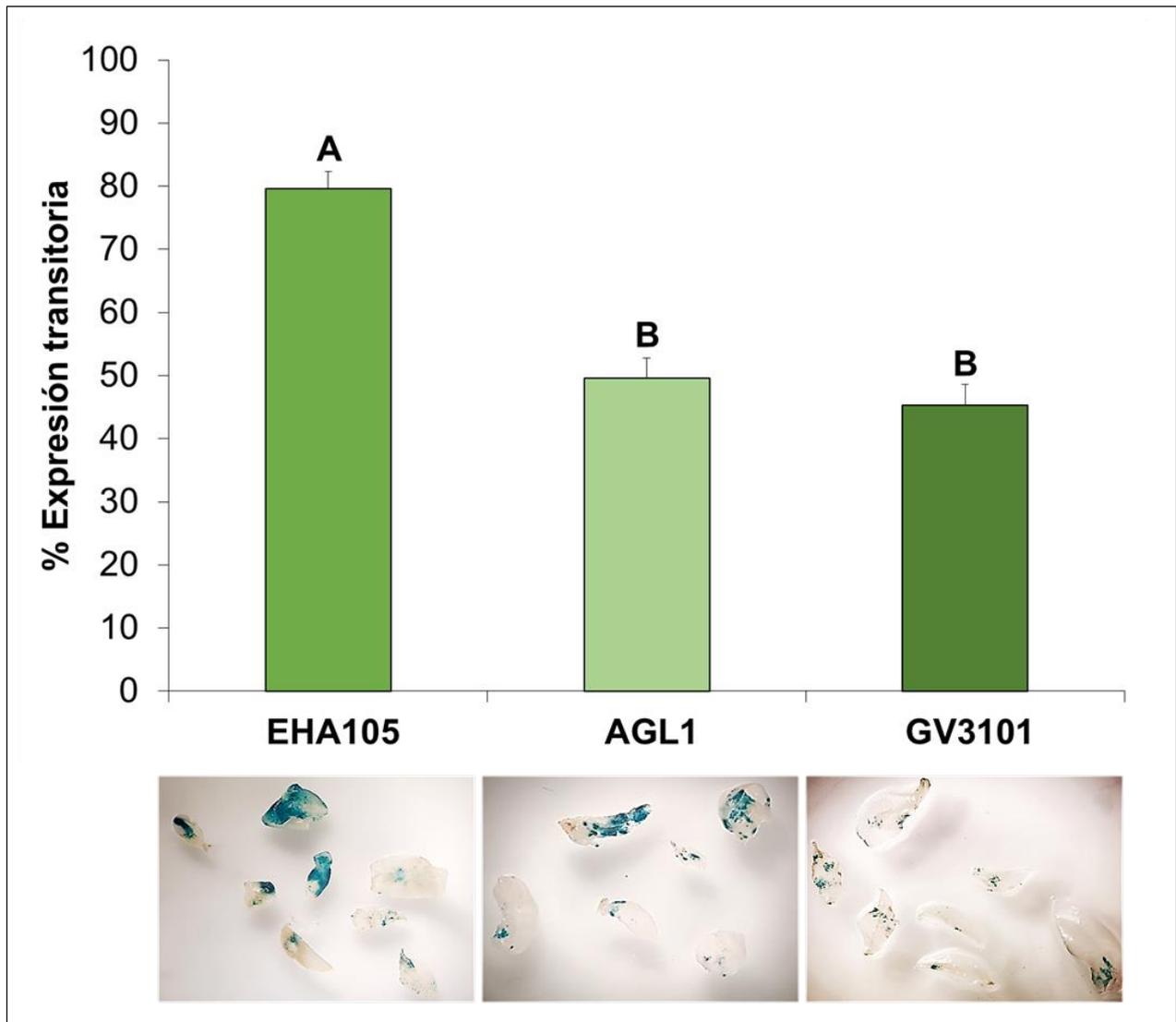


**Figura 26. Transformación de *A. tumefaciens* y extracción del plásmido pCambia 2301. A:** Cepas transformantes de *A. tumefaciens*. **A1:** AGL1. **A2:** EHA105. **A3:** LBA4404. Las flechas indican algunas colonias crecidas en medio LB suplementado con antibióticos según la cepa y Km. **B y C:** Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %). Carriles: A.1-4: Cepa AGL1; B.1-2: Cepa EHA105; C.1-2: Cepa LBA4404; D.1: Control positivo (GV3101 con el plásmido); D.2: Control negativo (ADN de *Agrobacterium* sin el plásmido); E: Blanco (reacción de PCR sin ADN); F: Marcador de peso molecular (qLadder 100pb precisión, PB-L, Argentina). **B:** Productos de amplificación con cebadores específicos para el gen *gusA* del plásmido. La flecha indica la presencia de una banda de aproximadamente 300 pb, coincidente con el tamaño esperado de la región amplificada de *gusA* (326 pb). **C:** Productos de amplificación con cebadores específicos para el gen *nptII* del vector. La flecha indica la presencia de una banda de aproximadamente 400 pb, coincidente con el tamaño esperado de la región amplificada de *nptII* (409 pb).

### 5.3.2. Transformación de *L. tenuis*

#### 5.3.2.1. Visualización de la transferencia del ADN-T mediante la técnica histoquímica de *GUS*

Se logró la transformación de folíolos PWt utilizando las cepas GV3101, EHA105 y AGL1 portadoras del plásmido pCambia-2301. Se evaluó el porcentaje de expresión transitoria de *gusA* a partir de los explantes con tinción X-Gluc positiva. La cepa LBA4404 no generó folíolos con coloración azul en las condiciones ensayadas por lo que no se consideró en el análisis estadístico. Se encontraron diferencias significativas entre las cepas restantes ( $p < 0,0001$ ) para la variable analizada. A partir de los porcentajes de folíolos con expresión transitoria de *GUS*, se observó que los valores de transferencia de T-DNA de las cepas AGL1 y GV3101 resultaron estadísticamente similares entre sí y significativamente inferiores que el de la cepa EHA105, que presentó un elevado porcentaje de expresión transitoria de *gusA* en los folíolos transformados (Figura 27). Los mismos, a su vez, presentaron una tinción X-Gluc más intensa que los explantes transformados con AGL1 y GV3101. Se calculó el coeficiente de variación de los porcentajes de expresión transitoria por cepa considerando las repeticiones que se realizaron transformando con cada una, y los valores fueron 15,15; 29,52 y 33,99 para EHA105, AGL1 y GV3101, respectivamente.

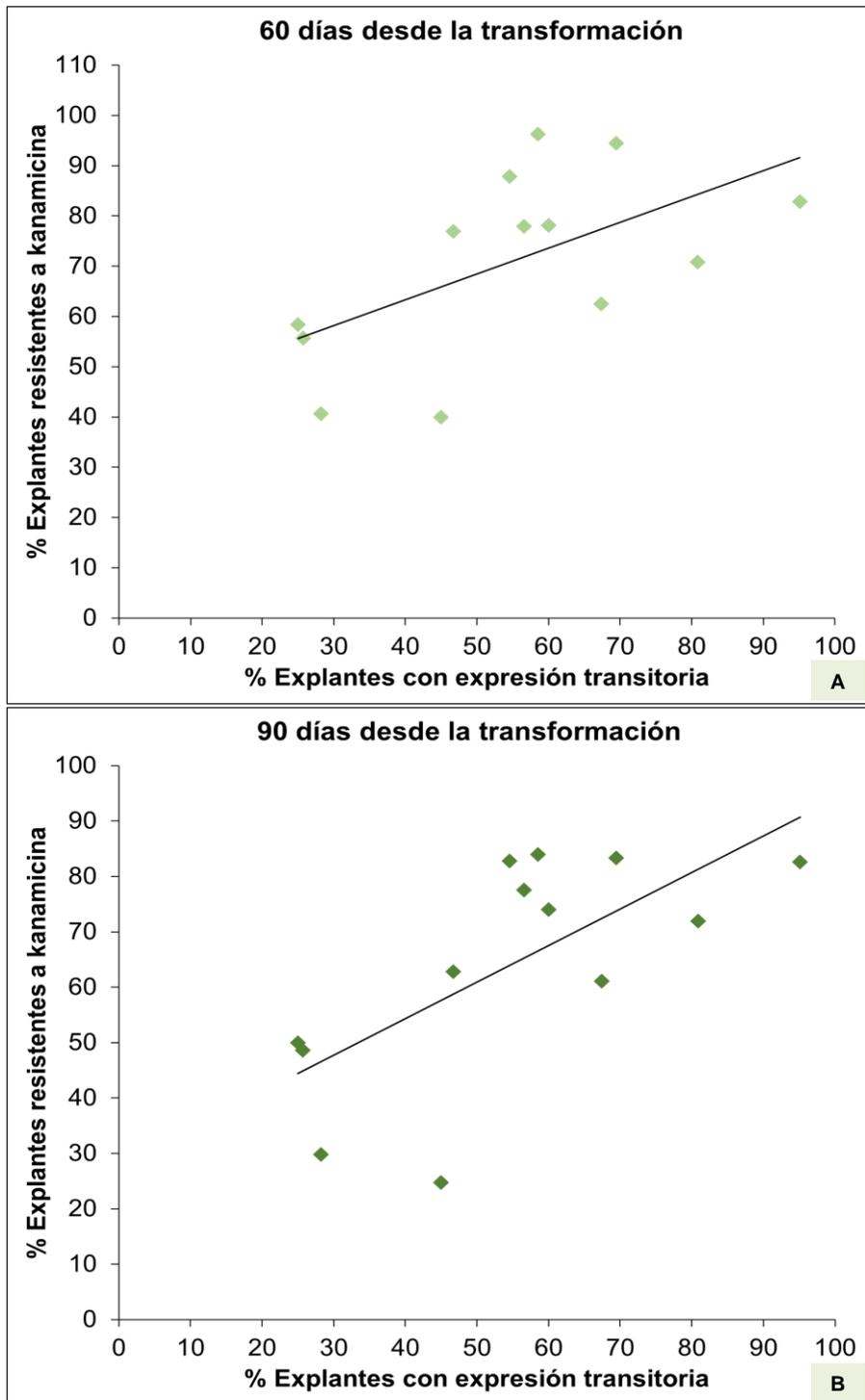


**Figura 27. Expresión transitoria promedio de *gusA* en folíolos PWt transformados con las cepas EHA105, AGL1 y GV3101.** Las imágenes corresponden a la visualización bajo lupa (10X) de los folíolos tratados con el colorante X-Gluc. La expresión transitoria se expresa en % y equivale al porcentaje de folíolos con tinción en distintas fechas del ensayo. Las barras corresponden a las medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

### 5.3.2.2. Evaluación de la sobrevivencia de los explantes post-transformación

Se evaluó la sobrevivencia de los explantes que no se decoloraron y se mantuvieron en MR y agente selectivo (kanamicina) a los 60 y a los 90 días de la transformación y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el porcentaje de explantes con expresión transitoria y el porcentaje de explantes resistentes al antibiótico. Existió una correlación positiva y significativa a los 60 y 90 días de la transformación, con valores de 0,585

( $p=0,036$ ) (Figura 28.A) y 0,683 ( $p=0,010$ ) (Figura 28.B), respectivamente. Sin embargo, se observó mayor correlación a los 90 días de la transformación.



**Figura 28. Diagrama de dispersión del porcentaje de explantes con expresión transitoria y el porcentaje de explantes resistentes a kanamicina post-transformación.** Los explantes considerados se transformaron con las cepas EHA105, AGL1 y GV3101 de *A. tumefaciens*. **A:** 60 días post-transformación. **B:** 90 días post-transformación.

## DISCUSIÓN

Las plantas poseen una notable capacidad regenerativa, atribuida a su alta plasticidad de desarrollo. Esta capacidad puede optimizarse mediante el uso de hormonas vegetales, donde el equilibrio entre auxinas y citoquininas juega un papel clave en la determinación del destino de los órganos en regeneración. Las diferentes especies de *Lotus* presentan variaciones en los reguladores de crecimiento necesarios para inducir la regeneración. Por ejemplo, *L. corniculatus* (Mariotti *et al.*, 1984; Niizeki & Grant, 1971), *L. tenuis* (Piccirilli *et al.*, 1988) y *L. pedunculatus* (Pupilli *et al.*, 1990) requieren tanto una citoquinina como una auxina para regenerar eficientemente. Por otro lado, *L. japonicus* (Handberg & Stougaard, 1992) y *L. corniculatus* (Swanson & Tomes, 1980) responden mejor a bajos niveles de BAP, mientras que *L. angustissimus* produce brotes en presencia de ANA (ácido  $\alpha$ -naftalenacético) combinado con BAP (6-bencilaminopurina) o 2iP ( $N^6$ - $\Delta^2$ -isopenteniladenina) (Nenz *et al.*, 1996). Espasandin (2010) evaluó el potencial regenerativo de *L. tenuis* cultivar Pampa INTA, utilizando cotiledones, raíces y hojas de plántulas de 30 días, cultivadas en medio MS con diversas concentraciones y combinaciones de ANA, BAP y TDZ (thidiazurón). Se observó que los folíolos presentaban una mayor velocidad de crecimiento y calidad cuando se empleaba un balance hormonal de 0,5  $\mu$ M de auxina (ANA) y 20  $\mu$ M de citoquinina (BAP), logrando que el 67 % de los folíolos regenerados formaran tallos. En el presente trabajo, se buscó optimizar la regeneración de *L. tenuis*, partiendo del protocolo surgido a partir de los resultados previamente mencionados.

La capacidad regenerativa está influenciada por la interacción entre factores genéticos, epigenéticos y fisiológicos de cada genotipo. Existe una numerosa cantidad de trabajos que indican una fuerte relación entre la capacidad de regeneración y elongación y el genotipo en diferentes especies como el trigo (Zale *et al.*, 2004), el arroz (Hoque & Mansfield, 2004; Khanna & Raina, 1998), *Primula* ssp. (Schween & Schwenkel, 2003), entre otras. Considerando que el genotipo también resulta uno de los factores más importantes para establecer cultivos *in vitro* exitosos en otras especies forrajeras, como la alfalfa y el trébol (Arcioni *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990), es que se procedió a evaluar distintos genotipos de *L. tenuis*, teniendo de referencia el protocolo previamente descrito por Espasandin *et al.* (2010). Los resultados indicaron que PWt mostró una mayor capacidad de regeneración y elongación de tallos *in vitro* en comparación con los otros genotipos evaluados. Esta ventaja

podría estar relacionada con ciertas características conferidas por el fondo genético, tales como una mayor capacidad para regenerarse y elongarse en un medio semisólido, además de resistencia frente a ciertos patógenos.

Donoso (1998) señaló que las condiciones fisiológicas de la planta donante de explantes tienen una influencia significativa en la respuesta *in vitro*. Factores como la temperatura, la humedad, la concentración de azúcares y la densidad de fotones pueden favorecer un balance adecuado de hormonas endógenas, lo cual mejora la regeneración de los explantes provenientes de cultivo *in vitro* en comparación con plantas donantes cultivadas *ex vitro*, que pueden verse afectadas por variaciones estacionales en los niveles de nutrientes, hormonas y aminoácidos libres (Jiménez-Martínez *et al.*, 2013). Lo mencionado coincide con los resultados presentados en este trabajo, donde los explantes cultivados en las condiciones controladas de cultivo *in vitro* mostraron mayor capacidad de regeneración y elongación de tallos que los provenientes de invernáculo y sala de crecimiento *ex vitro*.

Existen protocolos de transformación de diversas especies del género *Lotus*, utilizando *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes* (Aoki *et al.*, 2002; Armstead & Webb, 1987; Lombardi *et al.*, 2003; Nenz *et al.*, 1996; Stiller *et al.*, 1997). En *L. tenuis*, las plantas transgénicas obtenidas mediante *A. rhizogenes* presentaban un fenotipo alterado (Damiani *et al.*, 1993), pero durante años fue el único protocolo disponible, probablemente debido a que no se encontraban genotipos de buena regeneración. Espasandin *et al.* (2010) lograron desarrollar un protocolo de transformación en la especie mediada por *A. tumefaciens* y reportó eficiencias de entre 10-18 % en folíolos de *L. tenuis* cultivar PWt utilizando la cepa GV3101. Los factores que influyen en la eficiencia de transformación mediada por *Agrobacterium* son diversos. Uno de ellos es el uso de agentes inductores de genes de virulencia. Varios estudios han informado que el rango de hospedadores en los que *Agrobacterium* es capaz de mediar la transformación se ha expandido gracias a la adición de compuestos fenólicos como la acetosiringona, e incluye plantas dicotiledóneas (Rashid *et al.*, 1996; Rohini & Rao, 2000; Wenck *et al.*, 1999) y monocotiledóneas (Cheng *et al.*, 1997; Hiei *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 1996), hongos (De Groot *et al.*, 1998; Piers *et al.*, 1996) y líneas celulares humanas (Kunik *et al.*, 2001). De manera previa a este trabajo, se había incorporado el agregado de acetosiringona al medio de co-cultivo, generando una mayor eficiencia en la transformación respecto al protocolo inicial (Gutiérrez *et al.*, 2022). Otro de los factores que influye en la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es la

cepa empleada. Diversas cepas de *Agrobacterium* se han utilizado para la transformación de leguminosas; por ejemplo, Damiani *et al.* (2008) destacaron la eficiencia de las cepas C58 y LBA4404 para transformar raíces de *L. corniculatus*, mientras que Damiani *et al.* (1993) usaron la cepa LBA9402 de *A. rhizogenes* para transformar *L. tenuis*. Otros estudios han demostrado la eficacia de las cepas LBA4404, AGL0, AGL1 y C58 de *A. tumefaciens* para transformar hipocótilos de la variedad Gifu de *L. japonicus* (Lombardi *et al.*, 2003). Armstead y Webb (1987) transformaron cotiledones de *L. corniculatus* con las cepas C58 y GV3101, y observaron cómo el genotipo de la plántula influía en la respuesta morfogénica. Dado que la expresión transitoria del gen reportero *GUS* permite evaluar diversos factores y establecer condiciones óptimas para maximizar la eficiencia de transformación, se procedió a evaluar la capacidad de transferencia del gen *GUS* mediante distintas cepas de *A. tumefaciens*. Se demostró que la cepa EHA105 fue más eficiente que AGL1, GV3101 y LBA4404 en la transferencia de T-DNA a folíolos de *L. tenuis*, superando en todos los casos el 20 % de folíolos con expresión transitoria de *GUS* y resistentes a la kanamicina a los 90 días de transformación, con máximos de alrededor del 90 %, con excepción de la cepa LBA4404 con la que no se logró transferencia. Es importante destacar que los explantes resistentes al antibiótico a los 60 o 90 días de la transformación presentarían el T-DNA integrado en el cromosoma vegetal, debido a que esta región proveniente del plásmido y transferida por *Agrobacterium* confiere resistencia al agente de selección.

Para poder realizar edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas9, es necesario realizar transformación genética. Posteriormente los transgenes se eliminan mediante segregación mendeliana, heredándose únicamente el resultado de la edición (Mao *et al.*, 2017). Es por esto que, tanto para transformar como para editar un cultivo de interés, se requiere un eficiente protocolo de transformación que no existe para todas las especies o para el que cultivares *elite* (que deberían ser los utilizados idealmente) no presentan la adecuada capacidad de regeneración (Botella, 2019). El hecho de haber hallado, a partir de los resultados de este trabajo, un genotipo de alta regeneración y tener conocimiento sobre el ambiente en el que debería criarse para ser utilizado como fuente de explantes, resulta en una optimización respecto al protocolo inicial, que partía de semillas (Espasandín *et al.*, 2010). Si bien las semillas podrían presentar ventajas debido a su menor posibilidad de contaminación y a los tiempos en los cuales se genera una plántula respecto a la utilización de folíolos, en una especie autoincompatible como *L. tenuis*, en la que los cultivares suelen

ser sintéticas o variedades de polinización abierta, cada semilla constituye un individuo diferente, que, tal como se vio en este trabajo, puede presentar variación en su capacidad de regeneración y elongación. Como desventaja, puede considerarse la posible aparición de variación somaclonal indeseada, inducida por el cultivo *in vitro*, que genere disminuciones en la tasa de crecimiento, fertilidad, y capacidad de regeneración (Ranghoo-Sanmukhiya, 2021). Es por eso que el grupo de trabajo planea el mantenimiento de la planta madre *ex vitro*, para poder reiniciar el proceso cada cierto número de generaciones.

Con respecto al protocolo de transformación, logró obtenerse un 79,6 % promedio de eficiencia de transferencia de ADN en forma transitoria mediante la utilización de la cepa EHA105, lo cual resulta promisorio para aplicaciones futuras de la técnica. De acuerdo a los resultados discutidos, el protocolo desarrollado constituye una alternativa eficaz para la transformación de folíolos de *L. tenuis* y representa un avance significativo hacia la edición génica en esta especie.

## CONCLUSIONES

En *L. tenuis*, la regeneración y la elongación de tallos *in vitro* a partir de folíolos dependió del genotipo de la planta utilizada como fuente de explante. Debido a su desempeño, se seleccionó el genotipo PWt para continuar aplicando la técnica. Asimismo, al comparar explantes provenientes de plantas de PWt crecidas en distintos ambientes se determinó que el hecho de utilizar folíolos provenientes de plantas *in vitro* como material de partida permitió acelerar la regeneración, llegando a aproximadamente un 80 % en 21 días.

Se logró la transformación de distintas cepas de *A. tumefaciens* con el plásmido pCambia2301, lo que permitió comparar su eficiencia de transferencia de ADN a *L. tenuis*. La cepa EHA105 presentó una eficiencia cercana al 80 %, por lo que se prevé su utilización para la transformación con genes de interés agronómico.

Mediante este proyecto se logró sentar las bases para realizar edición génica en *L. tenuis* mediante CRISPR/Cas9. A futuro, se propone corroborar la posibilidad de aplicar dicha técnica mediante el *knockout* del gen *gusA-intrón* en las plantas transformadas obtenidas en este trabajo. De ser factible, se continuará con la puesta a punto de la maquinaria CRISPR-Cas9 para editar genes de interés productivo y comercial.

## BIBLIOGRAFÍA

- Affinito, M. A., Espasandin, F. D., del Vas, M., Alvarez, M. Y., Andrés, A. N., Sansberro, P. A. & Díaz Paleo, A. H. (2021). Functional characterization and intracellular localization of a *Lotus tenuis* NHX antiporter. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 146(3), 565–576.
- Akashi, R., Hoffmann-Tsay, S. S. & Hoffmann, F. (1998). Selection of a super-growing legume root culture that permits controlled switching between root cloning and direct embryogenesis. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(6-7), 758-764.
- Akashi, R., Uchiyama, T., Sakamoto, A., Kawamura, O. & Hoffmann, F. (1998). High-frequency embryogenesis from cotyledons of bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus*) and its effective utilization in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of plant physiology*, 152(1), 84-91.
- Alleweldt, G. & Radler, F. (1962). Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes & growth of plant tissue cultures. *Plant physiology*, 37(3), 376.
- Alt-Mörbe, J., Kühmann, H. & Schröder, J. (1989). Differences in induction of Ti-plasmid virulence genes virG and virD and continued control of virD expression by four external factors. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 2, 301-308.
- Aoki, T., Kamizawa, A. & Ayabe, S. (2002). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Reports*, 21, 238-243.
- Arcioni, S., Damiani, F., Pezzotti, M. & Lupotto, E. (1990). Alfalfa, lucerne (*Medicago* spp.) In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 10. Legumes and oilseed crops I.
- Arcioni, S., Falcinelli, M., Francia, U., Lorenzetti, F., Negri, V. & Veronesi, F. (1985). Qualitative evaluation of spontaneous forage legumes growing in central Italy. *Proceedings of the XV IGC* (pp.1049-1050).
- Arguedas, M. (2009). La “corona de agallas” (*Agrobacterium tumefaciens*). *Kurú: Revista Forestal (Costa Rica)*, 6(16).
- Armstead, I. P. & Webb, K. J. (1987). Effect of age and type of tissue on genetic transformation of *Lotus corniculatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 9, 95-101.

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Ayers, A. D. (1948). Salt tolerance of birdsfoot trefoil. *Journal of the American Society of Agronomy*, 4, 331-334.
- Balatti, P. A. (1996). Interacciones tempranas Rhizobio-leguminosa. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 101.
- Baltisberger, M. (1990). Numeri cromosomici per la flora Italiana. *Informatore Botanico Italiano*, 22, 1208-1230.
- Barbón-Rodríguez, R. (2003). Aspectos relacionados con el ambiente físico y la caracterización molecular de la embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal*, 3(4).
- Batista, W. B., Taboada, M. A., Lavado, R. S., Perelman, S. B. & León, R. J. (2005). Asociación entre comunidades vegetales y suelos en el pastizal de la Pampa Deprimida. *La heterogeneidad de la vegetación de los agroecosistemas*, 113-119.
- Bent, A. (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Agrobacterium protocols*, 87-104.
- Bellucci, M., Alpini, A. & Arcioni, S. (2000). Expression of maize  $\gamma$ -zein and  $\beta$ -zein genes in transgenic *Nicotiana tabacum* and *Lotus corniculatus*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 62, 141-151.
- Beuselinck, P. R., Younes, M. B. & McGraw, R. L. (1986). Taxonomic Investigation of an Accession of *Lotus* spp. *Crop science*, 26(4), 661-664.
- Bidney, D., Scelonge, C., Martich, J., Burrus, M., Sims, L. & Huffman, G. (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 18, 301-313.
- Bilenca, D., Codesido, M., González Fischer, C., Pérez Carusi, L., Zufiaurre, E. & Abba, A. (2012). Impactos de la transformación agropecuaria sobre la biodiversidad en la provincia de Buenos Aires. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 14(2), 189-198.
- Boase, M. R., Butler, R. C. & Borst, N. K. (1998). Chrysanthemum cultivar–*Agrobacterium* interactions revealed by GUS expression time course experiments. *Scientia*

*Horticulturae*, 77(1-2), 89-107.

- Bonilla-Morales, M. M. & Hernández-Castañeda, Ó. I. (2012). Propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea* spp.): Una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Revista Agronomía, Universidad de Caldas, Colombia*, 20(2), 65-76.
- Botella, J. R. (2019). Now for the hard ones: is there a limit on CRISPR genome editing in crops?. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 734-737.
- Burkart, A. (1952). Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. *Editorial ACMÉ AGENCY, Buenos Aires, Argentina*.
- Cangelosi, G. A., Ankenbauer, R. G. & Nester, E. W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6708-6712.
- Cangelosi, G. A., Martinetti, G., Leigh, J. A., Lee, C. C., Thienes, C. & Nester, E. W. (1989). Role for *Agrobacterium tumefaciens* ChvA Protein in Export of  $\beta$ -1,2-Glucan. *Journal of Bacteriology*, 171, 1609-1615.
- Carámbula, M. & Bermúdez, R. (1998). ¿Qué *Lotus* es este?: Una guía para identificar los distintos *Lotus* presentes en el país. *Revista Plan Agropecuario*, 80, 34-36, 199.
- Carbonero Zalduegui, P. (1997). Plantas transgénicas. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 91(2), 115-120.
- Carvalho, C. H. S., Zehr, U. B., Gunaratna, N., Anderson, J., Kononowicz, H. H., Hodges, T. K. & Axtell, J. D. (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of sorghum: factors that affect transformation efficiency. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 259-269.
- Celotto, A. I. & Sanso, A. M. (2008). Análisis cromosómico aplicado a la diferenciación de *Lotus glaber* y *L. corniculatus* (*Fabaceae*). *Estudio Rolando, Análisis de Semillas*, 2(7), 93-95.
- Chakrabarty, B., Ghoshal, A. K. & Purkait, M. K. (2008). Effect of molecular weight of PEG on membrane morphology and transport properties. *Journal of membrane science*, 309(1-2), 209-221.
- Chakrabarty, R., Viswakarma, N., Bhat, S. R., Kirti, P. B., Singh, B. D. & Chopra, V. L. (2002).

*Agrobacterium*-mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *Journal of Biosciences*, 27, 495-502.

Chateau, S., Sangwan, R. S. & Sangwan-Norreel, B. S. (2000). Competence of *Arabidopsis thaliana* genotypes and mutants for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer: role of phytohormones. *Journal of experimental botany*, 51(353), 1961-1968.

Chee, P. P., Fober, K. A. & Slightom, J. L. (1989). Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant physiology*, 91(3), 1212-1218.

Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S., Zhou, H., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., Conner, T. W. & Wan, Y. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant physiology*, 115(3), 971-980.

Cheng, M., Lowe, B. A., Spencer, T. M., Ye, X. & Armstrong, C. L. (2004). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 31-45.

Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. & Sheen, J. (1996). Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology*, 6(3), 325-330.

Christie, P. J. (2000). *Agrobacterium* and plant cell transformation. *Encyclopedia of Microbiology*, 1, 86-103.

Chumakov, M. I. & Moiseeva, E. M. (2012). Technologies of *Agrobacterium* plant transformation *in planta*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 657-666.

Clua, A. A., Gimenez, D. O. & Fernández, L. V. (1997). Increase in forage yield in narrowleaf birdsfoot trefoil (*Lotus tenuis* Waldst & Kit ex Willd) in a permanent pasture with foliar applied gibberellic acid (GA3), and phosphorus. *Plant growth regulation*, 21, 223-228.

Colombet, A. (2017). *Agregado de semillas de Lotus tenuis, en la estepa de halófitas de la Pampa Deprimida*. Doctoral dissertation. Universidad Nacional de La Plata.

Coppi, G. O. (2010). La agriculturización en el contexto de una nueva ruralidad: Nuevos actores pluriactivos en el departamento Río Primero de la provincia de Córdoba. *Geograficando*, 6(6).

Damiani, F., Mariotti, D., Pezzotti, M. & Arcioni, S. (1985). Variation among plants

- regenerated from tissue culture of *Lotus corniculatus* Z. *Pflanzenzuchtg*, 94, 332-339.
- Damiani, F., Nenz, E., Paolocci, F. & Arcioni, S. (1993). Introduction of hygromycin resistance in *Lotus* spp. through *Agrobacterium rhizogenes* transformation. *Transgenic Research*, 2(6), 330-335.
- Damiani, F., Paolocci, F. & Arcioni, S. (2008). Genetic Transformation of *Lotus* Species. In P. B. Kirti (Ed.), *Handbook of new technologies for genetic improvement of legumes* (pp. 301–315). CRC Press/Taylor and Francis Group.
- Daskalova, E., Dontcheva, S., Yahoubian, G., Minkov, I. & Toneva V. (2011). A strategy for conservation and investigation of the protected resurrection plant *Haberlea rhodopensis* Friv. *BioRisk*, 6, 41–60.
- De Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J. & Beijersbergen, A. G. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature biotechnology*, 16(9), 839-842.
- De Saeger, J., Park, J., Chung, H. S., Hernalsteens, J. P., Van Lijsebettens, M., Inzé, D., Van Montagu, M. & Depuydt, S. (2021). *Agrobacterium* strains and strain improvement: Present and outlook. *Biotechnology Advances*, 53, 107677.
- Degiovanni, B., Víctor, M., Martínez, R., César, P. & Motta, O. (2010). *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina*. Ciat.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, G., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. (2020). Infostat - Software estadístico. In *Universidad Nacional de Córdoba, Argentina* (No. 2020). Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo, J. A., Guzmán, A. W. & Casanoves, F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7(2), 129–142. <https://doi.org/10.1198/10857110260141193/METRICS>
- Díaz Granados, C. & Chaparro-Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61.
- Díaz, M. L., Zappacosta, D. C., Franzone P. M. & Ríos, R. D. (2010). Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. In: G. Levitus, V. Echenique, C.

- Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. pp. 243-257.
- Díaz, P., Borsani, O. & Monza, J. (2005). *Lotus*-related species and their agronomic importance. *Lotus japonicus handbook*, 25-37.
- Donoso, I. (1998). Desarrollo de técnicas de cultivo in vitro de bayas de vid. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Escuela de Agronomía, Universidad de Chile. 73 p.
- Escoffié, P. O. M. A. (2003). Establecimiento de un protocolo de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para *Musa acuminata* var. "Enano Gigante" por infiltración al vacío. CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN.
- Espasandin, F. D., Collavino, M. M., Luna, C. V., Paz, R. C., Tarragó, J. R., Ruiz, O. A., Mroginski, L. A. & Sansberro, P. A. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lotus tenuis* and regeneration of transgenic lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2), 181–189.
- Ferl, R. & Paul, A. L. (2000). Genome organization and expression. In: *Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists*, pp. 312-357.
- Fox, M. B., Esveld, D. C., Valero, A., Luttge, R., Mastwijk, H. C., Bartels, P., Van Den Berg, A. & Boom, R. M. (2006). Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385, 474-485.
- Francis, K. E. & Spiker, S. (2005). Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. *The Plant Journal*, 41(3), 464-477.
- Fullner, K. J., Lara, J. C. & Nester, E. W. (1996). Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science*, 273(5278), 1107-1109.
- Geier, T. & Sangwan, R. S. (1996). Histology and chimera segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria internode* explants. *Plant Cell Reports*, 15, 386-390.
- Gelvin, S. B. (2006). *Agrobacterium* transformation of *Arabidopsis thaliana* roots: a

quantitative assay. *Agrobacterium Protocols*, 105-114.

- George, E. F. & Debergh, P. C. (2008). Micropropagation: uses and methods. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. The Background. E. F. George, M. A. Hall & G. J. De Klerck (eds.). Springer, The Netherlands. pp:29-64.
- Gilissen, L. J., Metz, P. L., Stiekema, W. J. & Nap, J. P. (1998). Biosafety of *E. coli*  $\beta$ -glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Research*, 7, 157-163.
- Gleba, Y., Klimyuk, V. & Marillonnet, S. (2007). Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 134-141.
- Gleba, Y., Marillonnet, S. & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: the 'full virus' and the 'deconstructed virus' strategies. *Current opinion in plant biology*, 7(2), 182-188.
- Gökçe, P. & Süleyman, A. V. C. I. (2020). *In Vitro* Regeneration Potential of *Lotus maritimus* L.(Leguminosae). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(4), 870-875.
- Grant, J. E., Thomson, L. M. J., Pither-Joyce, M. D., Dale, T. M. & Cooper, P. A. (2003). Influence of *Agrobacterium tumefaciens* strain on the production of transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 21(12), 1207-1210.
- Green, M. R. & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(12), pdb-prot093377.
- Gurlitz, R. H., Lamb, P. W. & Matthyse, A. G. (1987). Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant physiology*, 83(3), 564-568.
- Gutiérrez, F. G., Affinito M.A., Roldán M.L., Maciel M.A. & Díaz Paleo A.H. (2022). Efecto de la acetosiringona y el tiempo de co-cultivo sobre la eficiencia de transformación de *Lotus tenuis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. II Congreso Multidisciplinario de la UNNOBA.
- Handberg, K. & Stougaard, J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2(4), 487-496.
- Hellens, R., Mullineaux, P. & Klee, H. (2000). Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446-451.

- Hiei, Y., Komari, T. & Kubo, T. (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant molecular biology*, 35, 205-218.
- Hooykaas, P. J. J. & Schilperoort, R. A. (1984). The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. *Advances in genetics*, 22, 209-283.
- Hoque, M. E. & Mansfield, J. W. (2004). Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of Indica rice genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78, 217-223.
- Hwang, H. H., Yu, M. & Lai, E. M. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15, e0186.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. & Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature biotechnology*, 14(6), 745-750.
- 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.
- Janssen, B. J. & Gardner, R. C. (1990). Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*, 14(1), 61-72.
- Jiménez-Martínez, J. H., Gutiérrez-Martínez, M. G., Franco-Mora, O., González-Huerta, A. & Gutiérrez-Ibáñez, A. T. (2013). Micropropagación de vides silvestres (*Vitis* spp.) del centro de México. *Phyton (Buenos Aires)*, 82(1), 107-112.
- Jin, S., Song, Y. N., Deng, W. Y., Gordon, M. P. & Nester, E. W. (1993). The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 6830-6835.
- Jones, H. D., Doherty, A. & Sparks, C. A. (2009). Transient transformation of plants. *Plant Genomics: Methods and Protocols*, 131-152.
- Jordan, M. C. & Hobbs, S. L. (1994). The transformation of legumes using *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnological applications of plant cultures (Shargool, PD, Ngo TT, eds.)*, CRC press, Boca Raton, 61-76.
- Kade, M., Pagani, E. & Mendoza, R. (2003). A morphological study of populations of *Lotus*

- glaber* Mill. (*Fabaceae*). *Agronomie*, 23(3), 203-207.
- Kado, C. I. & Hooykaas, P. J. (1991). Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(1), 1-32.
- Karami, O. (2008). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of plants. *Transgenic Plant J*, 2(2), 127-137.
- Khanna, H. K. & Raina, S. K. (1998). Genotype x culture media interaction effects on regeneration response of three indica rice cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52, 145-153.
- Kim, M. J., Baek, K. & Park, C. M. (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 28, 1159-1167.
- Körber, H., Strizhov, N., Staiger, D., Feldwisch, J., Olsson, O., Sandberg, G., Palme, K., Schell, J. & Koncz, C. (1991). T-DNA gene 5 of *Agrobacterium* modulates auxin response by autoregulated synthesis of a growth hormone antagonist in plants. *The EMBO Journal*, 10(13), 3983-3991.
- Krassowska, W. & Filev, P. D. (2007). Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical journal*, 92(2), 404-417.
- Krikorian, A. D. (1991). Propagación clonal *in vitro*. In: Roca, W. & Mroginski, L. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Colombia. 95-125 pp.
- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in tissue culture and micropropagation. In: *Plant hormones physiology, biochemistry and molecular biology*. Kluwer Academic Publishers. Dordrech, Boston, London. pp. 774-79.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C. & Citovsky, V. (2001). Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1871-1876.
- Lambrechtsen, N. C., Wills, B. J. & Douglas, G. B. (1986). Management and uses of *Lotus tenuis* (Narrow-leaved birdsfoot trefoil). In *Plant Materials Handbook for Soil Conservation* (pp. 271–274). Wellington.
- Larkin, P. J. & Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability

- from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied genetics*, 60, 197-214.
- Lavado, R. S. (2007). Visión sintética de la distribución y magnitud de los suelos afectados por salinidad en la Argentina. In E. Taleisnik, K. Grunberg & G. Santa Maria (Eds.), *La salinización de suelos en la Argentina* (pp. 1–6). Córdoba: Editorial EDUCC.
- Lee, L. Y. & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology*, 146(2), 325-332.
- Lefnaer, S. (2020). Wikimedia Commons. ([https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Lotus\\_tenuis\\_sl63.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Lotus_tenuis_sl63.jpg)). Distribuido bajo licencia CC BY-SA 4.0.
- Li, J. F., Park, E., von Arnim, A. G. & Nebenführ, A. (2009). The FAST technique: a simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. *Plant methods*, 5, 1-15.
- Litz, R. E. & Jarret, R. L. (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 143-172. (Publicación CIAT no. 151).
- Llorente, B. E. (2002). *Aislamiento, purificación, caracterización y producción in vitro de peptidasas de alcaucil coagulantes de la leche* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Lohar, D. P., Schuller, K., Buzas, D. M., Gresshoff, P. M. & Stiller, J. (2001). Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance bar gene as a selectable marker. *Journal of Experimental Botany*, 52(361), 1697-1702.
- Lombardi, P., Ercolano, E., El Alaoui, H. & Chiurazzi, M. (2003). A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cells susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 21, 771-777.
- Lövkvist, B. & Hultgård, U-M. (1999). Chromosome numbers in south Swedish vascular plants. *Opera Botanica*, 137, 1-42.

- Lundqvist, A. (1993). The self-incompatibility system in *Lotus tenuis* (Fabaceae). *Hereditas*, 119(1), 59-66.
- Mante, S., Morgens, P. H., Scorza, R., Cordts, J. M. & Callahan, A. M. (1991). *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology*, 9(9), 853-857.
- Mao, Y., Botella, J. R. & Zhu, J. K. (2017). Heritability of targeted gene modifications induced by plant-optimized CRISPR systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74, 1075-1093.
- Mariotti, D., Pezzotti, M., Falistocco, E. & Arcioni, S. (1984). Plant regeneration from leaf-derived callus of *Lotus corniculatus* L. cv. Franco.
- Marion, J., Bach, L., Bellec, Y., Meyer, C., Gissot, L. & Faure, J. D. (2008). Systematic analysis of protein subcellular localization and interaction using high-throughput transient transformation of Arabidopsis seedlings. *The Plant Journal*, 56(1), 169-179.
- Matteucci, S. D. (2012). Ecorregión pampa. *Ecorregiones y complejos ecosistémicos argentinos*, 391-445.
- May, Y. B. B. (2015). Transformación genética de *Pentalinon andrieuxii* con el gen truncado de la HMGR de *Arabidopsis thaliana* (Doctoral dissertation, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F. & Guy, R. H. (2005). Ultrasound-mediated gene delivery: kinetics of plasmid internalization and gene expression. *Journal of Controlled Release*, 104(1), 203-211.
- Mendel, R. R., Müller, B., Schulze, J., Kolesnikov, V. & Zelenin, A. (1989). Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theoretical and applied genetics*, 78, 31-34.
- Mendoza, R. E., Escudero, V. & García, I. (2005). Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant and soil*, 275, 305-315.
- Mendoza, R. E., Pagani, E. A. & Pomar, M. C. (2000). Variabilidad poblacional de *Lotus glaber* en relación con la absorción de fósforo del suelo. *Ecología Austral*, 10, 3-14.

- Miki, B. & McHugh, S. (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of biotechnology*, 107(3), 193-232.
- Miñón, D., Sevilla, G., Montes, L. & Fernandez, O. (1990). *Lotus tenuis*: leguminosa forrajera para la Pampa Deprimida. In *Boletín técnico 98*. INTA.
- Mohan Babu, R., Sajeena, A., Seetharaman, K. & Reddy, M. S. (2003). Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management an over view. *Crop protection*, 22(9), 1071-1086.
- Montes, L. (1988). *Lotus tenuis*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 8, 367-376.
- Monthony, A. S., Kyne, S. T., Grainger, C. M. & Jones, A. M. P. (2021). Recalcitrance of *Cannabis sativa* to *de novo* regeneration; a multi-genotype replication study. *PLOS ONE*, 16(8), e0235525.
- Moro, A. (2004). Departamento de Ciencias de la Vida, Universidad de Trieste. Portal a la flora de Italia. (<https://dryades.units.it/dryades/plants/foto/TSB16010.jpg>). Distribuido bajo licencia CC BY-SA 4.0.
- Mroginski, L. A. & Roca, W. M. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia, 19-40.
- Mroginski, L. A., Sansberro, P. & Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. pp. 17-25.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nenz, E., Pupilli, F., Paolucci, F., Damiani, F., Cenci, C. A. & Arcioni, S. (1996). Plant regeneration and genetic transformation of *Lotus angustissimus*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 45, 145-152.
- Niizeki, M. & Grant, W. F. (1971). Callus, plantlet formation, and polyploidy from cultured anthers of *Lotus* and *Nicotiana*. *Canadian Journal of Botany*, 49(11), 2041-2051.
- Nikolić, R., Mitić, N., Miletić, R. & Nešković, M. (2006). Effects of cytokinins on *in vitro* seed

germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of plant growth Regulation*, 25, 187-194.

Nikolić, R., Mitić, N. & Nešković, M. (1997). Evaluation of agronomic traits in tissue culture–derived progeny of bird's-foot trefoil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 67-69.

Oger, P., Petit, A. & Dessaux, Y. (1996). A simple technique for direct transformation and regeneration of the diploid legume species *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 116(2), 159-168.

Oger, P. & Dessaux, Y. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Lotus* Species. In *Applied genetics of Leguminosae biotechnology* (pp. 255-281). Dordrecht: Springer Netherlands.

Opabode, J. T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 1(1), 12-20.

Orcen, N. (2013). Regeneration of bird's-foot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) native race of Aegean region. *Fresenius Environmental Bulletin*, 22(8a), 2409-2414.

Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C. & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and molecular plant pathology*, 76(2), 76-81.

Paruelo, J. M., Pineiro, G., Baldi, G., Baeza, S., Lezama, F., Altesor, A. & Oesterheld, M. (2010). Carbon stocks and fluxes in rangelands of the Rio de la Plata basin. *Rangeland Ecology & Management*, 63(1), 94-108.

Pesqueira, J. (2009). *Cambios bioquímicos, morfológicos y ecofisiológicos en plantas del género Lotus bajo estrés salino*. Doctoral dissertation. Universitat Politècnica de València.

Petit, A., Stougaard, J., Kühle, A., Marcker, K. A. & Tempé, J. (1987). Transformation and regeneration of the legume *Lotus corniculatus*: a system for molecular studies of symbiotic nitrogen fixation. *Molecular and General Genetics MGG*, 207, 245-250.

Petri Serrano, C. (2008). Transformación genética del albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas.

Phillips, R. L., Kaeppler, S. M. & Olhoft, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures:

- breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5222-5226.
- Piccirilli, M., Pupilli, F. & Arcioni, S. (1988). *Lotus tenuis* Wald. & Kit.: *In vitro* conditions for plant regeneration from protoplasts and callus of various explants. *Plant Science*, 55(1), 77-82.
- Piers, K. L., Heath, J. D., Liang, X., Stephens, K. M. & Nester, E. W. (1996). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1613-1618.
- Potrykus, I. (1990). Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/technology*, 8(6), 535-542.
- Pupilli, F., Arcioni, S., Damiani, F. & Pezzotti, M. (1990). Plant regeneration from callus and protoplast cultures of *Lotus pedunculatus* Cav. *Plant cell, tissue and organ culture*, 23, 193-199.
- Radice, S. (2010). Morfogénesis. In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). *Bioteconología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Buenos Aires. Pp. 26-33.
- Ramírez, H., Lentini, Z. & Vallejo Cabrera, F. A. (2009). Evaluación y selección de un protocolo vía *Agrobacterium* para la incorporación de resistencia al cogollero en la variedad de tomate Unapal-Arreboles. *Acta Agronómica*, 58(2), 61-68.
- Ranghoo-Sanmukhiya, V. M. (2021). Somaclonal variation and methods used for its detection. *Propagation and genetic manipulation of plants*, 1-18.
- Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A. A., Husnain, T. & Riazuddin, S. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechnology advances*, 27(6), 753-763.
- Rashid, H., Yokoi, S., Toriyama, K. & Hinata, K. (1996). Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Reports*, 15, 727-730.
- Richael, C. M. & Rommens, C. M. (2012). Employment of cytokinin vectors for marker-free and backbone-free transformation. *Transgenic Plants: Methods and Protocols*, 3-10.
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E. & Brkljacic, J. (2014). Handling *Arabidopsis* plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses. *Arabidopsis protocols*, 3-25.

- Rohini, V. K. & Rao, K. S. (2000). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants. *Plant science*, 150(1), 41-49.
- Salas, M., Park, S., Srivatanakul, M. & Smith, R. (2001). Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Reports*, 20, 701-705.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2<sup>o</sup> Edition. New York.*
- Sanford, J. C. (1988). The biolistic process. *Trends in biotechnology*, 6(12), 299-302.
- Sangwan, R. S., Bourgeois, Y., Brown, S., Vasseur, G. & Sangwan-Norreel, B. (1992). Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 188, 439-456.
- Schuerman, P. L. & Dandekar, A. M. (1993). Transformation of temperate woody crops: progress and potentials. *Scientia horticultrae*, 55(1-2), 101-124.
- Schween, G. & Schwenkel, H. G. (2003). Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula* ssp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 53-61.
- Seaney, R. R. & Henson, P. R. (1970). Birdsfoot trefoil. *Advances in agronomy*, 22, 119-157.
- Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S. & Maraffa, S. B. (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural reviews*, 2, 268-310.
- Software SnapGene Viewer (<https://snapgene.com/snapgene-viewer>).
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J mol biol*, 98(3), 503-517.
- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 318(6047), 624-629.
- Stiller, J., Martirani, L., Tuppale, S., Chian, R. J., Chiurazzi, M. & Gresshoff, P. M. (1997). High frequency transformation and regeneration of transgenic plants in the model legume *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, 48(7), 1357-1365.
- Stoffella, S. L., Posse, G. & Collantes, M. B. (1998). Variabilidad fenotípica y genotípica de

- poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*, 8, 57-63.
- Striker, G. G., Insausti, P., Grimoldi, A. A. & Leon, R. J. C. (2006). Root strength and trampling tolerance in the grass *Paspalum dilatatum* and the dicot *Lotus glaber* in flooded soil. *Functional Ecology*, 20, 4-10.
- Striker, G. G., Insausti, P., Grimoldi, A. A., Ploschuk, E. L. & Vasellati, V. (2005). Physiological and anatomical basis of differential tolerance to soil flooding of *Lotus corniculatus* L. and *Lotus glaber* Mill. *Plant and soil*, 276, 301-311.
- Swanson, E. B. (1983). Isolation and characterization of variant callus cultures of *Lotus corniculatus* L. and the *in vitro* selection of herbicide tolerant plants. *University of Guelph, Ontario*.
- Swanson, E. B., Somers, D. A. & Tomes, D. T. (1990). Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Legumes and Oilseed Crops*, 10, 323-340. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Swanson, E. B. & Tomes, D. T. (1980). Plant regeneration from cell cultures of *Lotus corniculatus* and the selection and characterization of 2, 4-D tolerant cell lines. *Canadian Journal of Botany*, 58(10), 1205-1209.
- Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E. & Yuan, Z. C. (2014). *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in plant science*, 5, 322.
- Suman, S. (2017). Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana. *Biochemical & Cellular Archives*, 17(1), 1-26.
- Tague, B. W. & Mantis, J. (2006). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation by vacuum infiltration. *Arabidopsis protocols*, 215-223.
- Tavazza, R., Alonso, R., Papacchioli, V. & Pagnotta, L. (2015). A validated slow-growth *in vitro* conservation protocol for globe artichoke germplasm: A cost-effective tool to preserve from wild to elite genotypes. *Scientia Horticulturae*, 197, 135-143.
- Teakle, N. L. (2008). *Comparative Molecular Physiology of Salt and Waterlogging Tolerance in Lotus Tenius and L. Corniculatus: Towards a Perennial Pasture Legume for Saline*

*Land*. University of Western Australia.

- Torres, D. M. A., Sandoval, E. H. P. & Cely, P. A. S. (2022). Aspectos biotecnológicos en la propagación *in vitro* de magnoliáceas. *Ciencia y Agricultura*, 19(3).
- Trick, H. N. & Finer, J. J. (1997). SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic Research*, 6, 329-336.
- Tsuda, K., Qi, Y., Nguyen, L. V., Bethke, G., Tsuda, Y., Glazebrook, J. & Katagiri, F. (2012). An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 69(4), 713-719.
- 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.
- Valvekens, D., Montagu, M. V. & Lijsebettens, M. V. (1988). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(15), 5536-5540.
- Valverde Lyons, A. (Sin año). *Lotus tenuis* Waldst et. Kit. en la Depresión del Salado, Provincia de Buenos Aires, Argentina. (94 pp.).
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. & Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Molecular and General Genetics MGG*, 220, 245-250.
- Vázquez, P. & Rojas, M. D. C. (2006). Zonificación Agro-ecológica del área de Influencia de la EEA Cuenca del Salado.
- Veluthambi, K., Gupta, A. K. & Sharma, A. (2003). The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84(3), 368-380.
- Vernade, D., Herrera-Estrella, A., Wang, K. & Van Montagu, M. (1988). Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens vir* genes by acetosyringone at low pH. *Journal of Bacteriology*, 170(12), 5822-5829.
- Vignolio, O. R. & Fernández, O. N. (1997). Cambios anatómicos y morfológicos en tallos de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus* (Leguminosae) generados por el anegamiento.

*Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 32, 147-151.

- Vignolio, O. R. & Fernández, O. N. (2006). Bioecología de *Lotus glaber* Mill. (*Fabaceae*) en la Pampa Deprimida (provincia de Buenos Aires, Argentina). *Revista Argentina de Producción Animal*, 26, 113–130.
- Vignolio, O. R., Fernández, O. N. & Maceira, N. O. (1999). Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst. Et. Kit.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 555-559.
- Vignolio, O. R., Fernández, O. N. & Maceira, N. O. (2002). Biomass allocation to vegetative and reproductive organs in *Lotus glaber* and *L. corniculatus* (*Fabaceae*). *Australian Journal of Botany*, 50(1), 75–82.
- Vignolio, O. R., Maceira, N. O. & Fernández, O. N. (1994). Efectos del anegamiento en invierno y verano sobre el crecimiento y la supervivencia de *Lotus tenuis* y *Lotus corniculatus*. *Ecología Austral*, 4, 19-28.
- Villemont, E., Dubois, F., Sangwan, R. S., Vasseur, G., Bourgeois, Y. & Sangwan-Norreel, B. S. (1997). Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 201, 160-172.
- Wan, Y., Sorensen, E. L. & Liang, G. H. (1988). Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, 39(1), 3–9.
- Wang, M. B., Upadhyaya, N. M., Brettell, R. I. S. & Waterhouse, P. M. (1997). Intron-mediated improvement of a selectable marker gene for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*.
- Wardhani, T. A., Roswanjaya, Y. P., Dupin, S., Li, H., Linders, S., Hartog, M., Geurts, R. & van Zeijl, A. (2019). Transforming. *Genome Editing and*.
- Webb, K. J., Gibbs, M. J., Mizen, S., Skøt, L. & Gatehouse, J. A. (1996). Genetic transformation of *Lotus corniculatus* with *Agrobacterium tumefaciens* and the analysis of the inheritance of transgenes in the T 1 generation. *Transgenic research*, 5, 303-312.
- Wenck, A. R., Quinn, M., Whetten, R. W., Pullman, G. & Sederoff, R. (1999). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly

pine (*Pinus taeda*). *Plant Molecular Biology*, 39, 407-416.

Williams, E.G., Collins, G.B. & Myers, J.R. (1990) In: *Legumes and oilseed crops I* (Vol. 10). Springer Science & Business Media. Bajaj, Y. P. (2012).

Winans, S. C. (1992). Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological reviews*, 56(1), 12-31.

Wright, E. L., Deakin, W. J. & Shaw, C. H. (1998). A chemotaxis cluster from *Agrobacterium tumefaciens*. *Gene*, 220(1-2), 83-89.

Wroblewski, T., Tomczak, A. & Michelmore, R. (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 3(2), 259-273.

Wu, H. Y., Liu, K. H., Wang, Y. C., Wu, J. F., Chiu, W. L., Chen, C. Y., Wu, S. H., Sheen, J. & Lai, E. M. (2014). AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in Arabidopsis seedlings. *Plant methods*, 10, 1-16.

Yan, G. X., Zhang, S. Z., Yan, J. F., Fu, X. Q. & Wang L. Y. (1989). Chromosome numbers and geographical distribution of 68 species of forage plants. *Grassland of China*, 4, 53-60.

Yang, X. & Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29, 36-57.

Zale, J. M., Borchardt-Wier, H., Kidwell, K. K. & Steber, C. M. (2004). Callus induction and plant regeneration from mature embryos of a diverse set of wheat genotypes. *Plant cell, tissue and organ culture*, 76, 277-281.

## ANEXOS

### Anexo I

#### Protocolo de ImageJ para el análisis de área regenerada

1. Ingresar al software ImageJ y abrir una imagen representativa del fondo del frasco mediante el comando “File → Open...”.
2. Seleccionar la herramienta “Straight” y trazar una línea de extremo a extremo del fondo. Guardar la medición mediante el comando “Analyze → Measure” o “Ctrl+M”.
3. Repetir varias veces la acción del paso 2 y luego de guardar la última medición clicar la imagen para deshacer la última línea.
4. Utilizar el comando “Results → Summarize” de la ventana de resultados para obtener la distancia media (Mean Length) del conjunto de mediciones.
5. Establecer la escala entre la unidad de medida del *software* (px) y la del dato de longitud conocida (cm) tomado como referencia. Utilizar el comando “Analyze → Set Scale...”. Completar los recuadros de la ventana “Set Scale” de la siguiente manera:

“Distance in pixels”: distancia media obtenida en el paso 4.

“Known distance”: longitud del fondo del frasco de cultivo *in vitro* medida en cm con regla milimetrada (4,5).

“Unit of length”: unidad de medida de la longitud del fondo del frasco (cm).

Tildar la opción “Global” y presionar OK para guardar los valores con los que el *software* calcula la escala (488,806 px/cm) según la ecuación:

$$Scale = \frac{Distance\ in\ pixels}{Known\ distance\ (cm)}$$

**Ecuación 6. Cálculo de la escala de trabajo realizado por ImageJ.** *Distance in pixels*: longitud promedio de un conjunto de líneas trazadas de extremo a extremo del fondo del frasco con la herramienta *Straight*. *Known distance (cm)*: extensión del fondo del frasco medida con regla milimétrica. La escala se expresa en **px/cm**. Esta conversión permite obtener valores en unidades de área (cm<sup>2</sup>) para los distintos genotipos.

6. Utilizar el comando “Results → Clear Results” de la ventana de resultados y seleccionar la opción “Don't save” para eliminar los resultados anteriores.
7. Abrir una imagen con folíolos en regeneración como indica el paso 1.
8. Contornear el área regenerada mediante la herramienta “Freehand selections”. Acumular las mediciones de un mismo frasco mediante el comando “Analyze → Measure” o “Ctrl+M”.
9. Sumar los valores de área regenerada de distintas zonas de un mismo folíolo para obtener el área regenerada por folíolo.
10. Calcular el área regenerada promedio por frasco.
11. Exportar los valores obtenidos en el paso 10 a un archivo Excel para su posterior utilización en el análisis estadístico en InfoStat.
12. Repetir los pasos 7-11 para todas las imágenes de folíolos en regeneración.

## Anexo II

### **Protocolo para generar células competentes de *A. tumefaciens***

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (eds.) 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, NY.

1. Tomar con ansa *Agrobacterium* del stock de glicerol y colocar en 2 mL medio LB en un tubo de ensayo estéril, sin antibióticos. Crecer ON (del inglés *Over Night*, durante la noche) a 28 °C agitando a 250 rpm.
2. Realizar una dilución 1/10 en LB en un erlenmeyer estéril.
3. Crecer a 28 °C agitando a 250 rpm hasta que la OD<sub>600</sub> (del inglés *Optical Density*, densidad óptica a 600 nm) alcance 0,4-0,6. La mayor eficiencia de transformación se logra con valores de OD<sub>600</sub> entre 0,375-0,4.

**Nota: A partir de este paso las bacterias deben mantenerse en frío en cada uno de las etapas.**

4. Alicuotar las células de a 25 mL en tubos cónicos estériles, previamente enfriados. Incubar en hielo por 10 min.
5. Centrifugar 10 min. a 4000 rpm y 4 °C.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender cada tubo en 5 mL de 0,15 M NaCl frío pipeteando gentilmente hacia arriba y abajo. Colocar en frío por 10 min.
7. Centrifugar por 10 min. a 4000 rpm y 4 °C.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender cada tubo en 500 µL de 20mM CaCl<sub>2</sub> frío pipeteando gentilmente hacia arriba y abajo.
9. En caso de no transformar el mismo día, congelar en nitrógeno líquido y colocar a -80 °C inmediatamente.

## Anexo III

### **Protocolo de extracción de ADN plasmídico**

Green, M. R. & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016 (12), pdb-prot093377.

1. Picar la/s colonias de interés en 2 mL de LB con antibióticos y dejar crecer ON a 28 °C.
2. Transferir los 2 mL de cultivo a tubo eppendorf.
3. Centrifugar a 3500 rpm por 5 min. Descartar el sobrenadante volcando y escurrir sobre papel.
4. Agregar 100 µL de SOLUCION I + Lisozima (50 ng/µL), 10 µL en 100 µL de Solución I.
5. Vortexear para resuspender. Dejar 10 min. a temperatura ambiente (si no se usa lisozima, incubar sólo 5 min a temperatura ambiente).
6. Agregar 200 µL de SOLUCION II.
7. Invertir el tubo lentamente varias veces y dejar 5 min. a temperatura ambiente.
8. Agregar 150 µL de SOLUCION III.
9. Invertir el tubo varias veces y dejar en hielo 5 min.
10. Centrifugar a 12000 rpm por 20 min. a temperatura ambiente o 4 °C.
11. Transferir con pipeta el sobrenadante a otro tubo.
12. Precipitar el ADN agregando 0,6 vol. de isopropanol.
13. Dejar 10 min. a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 12000 rpm por 20 min. a temperatura ambiente.
15. Descartar el sobrenadante por inversión y agregar 500 µL de EtOH 70 % frío despegando el pellet.
16. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min.
17. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
18. Resuspender en 20 µL de TE 1X o agua miliQ.

### **Solución I**

Glucosa 50 mM

EDTA 10 mM

Tris HCl pH 8,25 mM

Para preparar un Vf de 50 mL: Pesar 0,45 g de sacarosa, agregar 1 mL de EDTA 0,5 M + 1,25 mL Tris HCl 1 M pH 8,0 y llevar a 50 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

### **Solución II**

NaOH 0,2 M

SDS preparado en el día 1 %

Para preparar un Vf de 50 mL: agregar 5 mL SDS 10 % y 20 mL NaOH 0,5 M. Llevar a 50 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

### **Solución III**

5 M acético/3 M K: para 100 mL agregar 60 mL de acetato de Potasio 5 M, 11,5 mL de acético y 28,5 mL de agua destilada.

Para preparar un Vf de 50 mL: agregar 30 mL de acetato de Potasio 5 M y 5,75 mL de ácido acético. Llevar a 50 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

### **Lisozima**

Pesar 100 mg de Lisozima y disolver en 1 mL de Tris HCl 10 mM pH 8,0 (Ci: 100 µg/µL). Tomar 10 µL (10 µg/µL) por cada 100 µL de Solución I.

## Anexo IV

### Composición de la mezcla de sustrato X-Gluc

Mendel, R. R., Müller, B., Schulze, J., Kolesnikov, V. & Zelenin, A. (1989). Delivery of foreign genes to intact barley cells by high-velocity microprojectiles. *Theoretical and applied genetics*, 78, 31-34.

Compuesto	Concentración
X-Gluc	0,3 %m/v
Buffer fosfato de Na/K (pH = 7,0)	0,1 M
EDTA	10 mM
Triton X-100	0,1 %
$K_3Fe(CN)_6$	5 mM
$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$	5 mM

**Tabla 5. Reactivos y concentraciones de la mezcla de sustrato X-Gluc.**

### Anexo V

#### Valores medios de regeneración y elongación de cinco genotipos de *L. tenuis*

Genotipo	% de regeneración			Área regenerada
	28 ddi	56 ddi	90 ddi	63 ddi
<b>E3</b>	28,33 ± 8,5 C	72,86 ± 10,68 A	85,95 ± 4,68 A	0,09 ± 0,02 A
<b>PWt</b>	22,14 ± 8,5 C	80 ± 10,68 A	94,29 ± 4,68 A	0,15 ± 0,04 A
<b>P1</b>	21,9 ± 8,5 C	60 ± 10,68 B	91,19 ± 4,68 A	0,07 ± 0,02 A
<b>P2</b>	2,86 ± 8,5 C	41,75 ± 10,94 B	84,76 ± 5,01 A	0,05 ± 0,01 A
<b>2297</b>	61,9 ± 8,5 B	85,71 ± 10,68 A	92,86 ± 4,68 A	0,08 ± 0,01 A

**Tabla 6. Promedios de regeneración de los distintos genotipos de *L. tenuis* y error estándar asociado.**

ddi: Días desde inicio del ensayo. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

Genotipo	Número de tallos/explante		Altura promedio de tallos/explante (mm)	
	100 ddi	60 dMS	100 ddi	60 dMS
<b>E3</b>	0 ± 0 C	0,6 ± 0,4 D	0 ± 0 B	0,27 ± 0,18 B
<b>PWt</b>	4 ± 0,66 A	21,33 ± 2,56 A	2,73 ± 0,86 A	21,33 ± 1,6 A
<b>P1</b>	1,83 ± 0,59 B	12,1 ± 1,79 BA	2,84 ± 0,88 A	7,57 ± 1,26 A
<b>P2</b>	0,63 ± 0,3 CB	8,9 ± 2,44 CB	0,41 ± 0,17 B	2,23 ± 0,57 B
<b>2297</b>	0,63 ± 0,46 C	3,22 ± 2,41 DC	0,7 ± 0,53 B	3,57 ± 2,03 B

**Tabla 7. Promedios de elongación de los distintos genotipos de *L. tenuis* y error estándar asociado.**

ddi: Días desde inicio del ensayo; dMS: Días desde el traspaso del explante a medio MS 0,5X. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

## Anexo VI

### Valores medios de regeneración y elongación del genotipo PWt de *L. tenuis*

Ambiente	% de regeneración			Área regenerada
	17 ddi	35 ddi	56 ddi	32 ddi
<b><i>In vitro</i></b>	77,14 ± 4,75 B	88,57 ± 4,75 B	100 ± 4,75 A	0,23 ± 0,04 A
<b>Sala</b>	8,57 ± 7,05 E	58,57 ± 7,05 C	72,25 ± 7,05 B	0,03 ± 4,90 <sup>-3</sup> B
<b>Invernáculo</b>	3,57 ± 7,26 E	36,43 ± 7,26 D	62,67 ± 7,26 C	0,02 ± 4,70 <sup>-3</sup> B

**Tabla 8. Promedios de regeneración del genotipo PWt de *L. tenuis* proveniente de tres ambientes y error estándar asociado.** ddi: Días desde inicio del ensayo. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.

Ambiente	Número de tallos/explante		Altura promedio de tallos/explante (mm)	
	64 ddi	60 dMS	64 ddi	60 dMS
<b><i>In vitro</i></b>	8,89 ± 0,92 A	33 ± 4,85 A	2,72 ± 0,4 A	6,7 ± 1,09 A
<b>Sala</b>	1 ± 0,26 B	55,6 ± 10,57 A	0,93 ± 0,2 B	5,09 ± 1,29 A
<b>Invernáculo</b>	3 ± 0,8 B	57,67 ± 12,13 A	0,94 ± 0,31 B	5,32 ± 1,74 A

**Tabla 9. Promedios de elongación del genotipo PWt de *L. tenuis* proveniente de tres ambientes y error estándar asociado.** ddi: Días desde inicio del ensayo; dMS: Días desde el traspaso del explante a medio MS 0,5X. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos ( $p < 0,05$ ) según el test de comparaciones múltiples DGC.