



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

“Agrotransformación de ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0)
sensibles a inundación”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:

ALEXIS FLORES MÉNDEZ

Director: Dr. Julián Mario Peña Castro

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2021



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 03 de marzo de 2021 a las 9:00 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Agrotransformación de ecotipos de Arabidopsis thaliana (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) sensibles a la inundación**" presentada por el alumno **Alexis Flores Méndez**, con número de matrícula 13090186, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 03 de marzo de 2021

ATENTAMENTE

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Julián Mario Peña Castro
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García
Universidad del Papaloapan
Co-Director de Tesis

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Edgar García López
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 04 de marzo de 2021
Oficio No. JCIB/003/03/2021

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Alexis Flores Méndez** titulado **"Agrotransformación de ecotipos de Arabidopsis thaliana (Civ-0, Bay-0 e Ita-0) sensibles a la inundación"**, para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Presidenta: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Vocal: Dr. Edgar García López
Secretario: Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García
Primer Suplente: Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Segundo Suplente: Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tame chi ji jú

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



c.c.p. Dr. Julián Mario Peña Castro, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Alexis Flores Méndez, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Hoja de Originalidad.

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

I. AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de licenciatura otorgada (N° de becario 29425), a través del proyecto 287137 CB-CONACyT-2016 titulado: El uso de los Genes Centrales de Hipoxia para mejorar en las plantas el contenido de almidón y la tolerancia a la inundación que está financiado por CONACyT.

Dr. Julián M. Peña Castro por aceptarme en su equipo de trabajo, sus enseñanzas, apoyo y tiempo que invirtió en mí; un excelente investigador y persona a la que admiro.

Dra. Blanca E. Barrera Figueroa por su todo su apoyo, tiempo que invirtió en mí y conocimientos aportados a lo largo de este proyecto.

Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. Paul M. Sánchez Ocampo y Dr. Alejandro Aparicio Saguilán por su apreciable colaboración con equipos a lo largo de este trabajo.

Dr. Edgar García López por su todo su apoyo, tiempo, comentarios y enseñanzas aportadas a lo largo de este proyecto.

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM por haber donado las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas en este trabajo.

IBT. Mayra Santiago Velasco e IBT. Lucisabel Medina Chávez por su apoyo, tiempo, comentarios, paciencia y conocimientos aportados a mi aprendizaje durante la realización de las múltiples técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos Aridaith Parra Reyes, IBT. Maximiliano López Morales, Rosa E. Agüero Padilla, Keyla N. López Luevano, Wendy Panamá Raymundo, Erick Ortiz López por su apoyo incondicional, y por la amistad que me han brindado.

II. DEDICATORIA

A mi familia, mis padres Dolores Méndez Velásquez, Tomas Flores Martínez y mi hermana Gemma Flores Méndez por esa fuerza tan admirable de siempre sacarme adelante, por todos sus consejos, por nunca dejarme solo, por brindarme su apoyo incondicional, pero sobre todo por creer en mi aun cuando yo ya no creía en mí, tengo mucho por agradecerles y la vida no me alcanzara para hacerlo.

III. ÍNDICE

IV. INDICE DE FIGURAS	X
V. INDICE DE TABLAS	XI
VI. RESUMEN	XII
VII. ABSTRACT	XIV
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. La inundación	1
1.2. Respuesta de las plantas ante el estrés por inundación	2
1.2.1. Quiescencia.....	3
1.2.2. Síndrome de escape	3
1.2.3. Factores de respuesta al etileno	5
1.2.4. Genes Centrales de Hipoxia (GCH)	6
1.3. Biotecnología del estrés por inundación	6
1.4. La variación natural de tolerancia a inundación en plantas	7
1.5. <i>Arabidopsis thaliana</i> : especie modelo.....	8
1.6. Transformación genética de plantas	9
1.6.1. Transformación genética de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
1.7. El uso de la transgénesis en <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 para el estudio del estrés por inundación	14
1.8. Transformación de diferentes ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> para el estudio del estrés por inundación.....	17
2. JUSTIFICACIÓN.....	19
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	20
4.1. Objetivo general	20
4.2. Objetivos específicos.....	20

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
6. METODOLOGÍA	22
6.1. Material biológico	22
6.1.1. Desinfección y condiciones de crecimiento para semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
6.2. Ensayos de inundación	23
6.2.1. Datos fisiológicos	24
6.3. Clonación del vector binario pCAMBIA1105.1 en <i>Escherichia coli</i> One shot Top 10	25
6.3.1. Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> mediante lisis alcalina	25
6.3.2. Digestión del vector binario pCAMBIA1105.1	26
6.3.3. Purificación del vector binario pCAMBIA1105.1	27
6.4. Resistencia natural de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV3101, GV2260 y EHA105) a estreptomycin y espectinomycin	28
6.5. Transformación de cepas <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV3101, GV2260 y EHA105) con el vector binario pCAMBIA1105.1	28
6.5.1. Preparación de células electrocompetentes	28
6.5.2. Electroporación de células electrocompetentes	29
6.5.3. Extracción de ADN plasmídico de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV2260, GV3101 y EHA105) mediante lisis alcalina	29
6.5.4. Digestión del vector binario pCAMBIA1105.1	30
6.6. Diseño experimental para la agrotransformación de ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> por Floral Dip	30
6.7. Siembra de ecotipos para su agrotransformación mediante Floral Dip	30
6.7.1. Preparación de las suspensiones de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV3101, GV2260 y EHA105), sacarosa y Silwet L-77	31
6.7.2. Inmersión floral	31

6.7.3.	Evaluación de la susceptibilidad a higromicina y cefotaxima en <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
6.7.4.	Escrutinio de transformantes primarios.....	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
7.1.	Tolerancia al estrés por inundación en ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Bay-0, Col-0, Cvi-0 e Ita-0).....	34
7.2.	Transformación de <i>Escherichia coli</i> One shot Top 10.....	41
7.3	Resistencia natural de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV3101, GV2260 y EHA105) frente a los antibióticos de selección (espectinomomicina y estreptomomicina).	41
7.4.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (GV2260, GV3101 y EHA105)	42
7.5.	Verificación de cepas transformantes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	43
7.6.	Tolerancia natural a higromicina en ecotipos (Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
7.7.	Tolerancia natural a cefotaxima en ecotipos (Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0) de <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
7.8.	Uso de higromicina para la selección de transformantes primarios en <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
7.9.	Uso de cefotaxima para reducir la carga bacteriana	48
7.10.	Escrutinio de transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
7.10.1.	Análisis de la frecuencia de transformación.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	55
9.	PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	56
10.	REFERENCIAS	57
11.	ANEXOS	69

IV. INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de los mecanismos regulatorios de quiescencia y síndrome de escape causados por inundación (Tamang & Fukao, 2015).....	4
Figura 2: Vías fermentativas, (Ismond, et al., 2003)..	7
Figura 3: Distribución geográfica de ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) HEYN.....	9
Figura 4: Sistema binario para la transferencia de genes	12
Figura 5: Estrategia experimental.	21
Figura 6: Plásmido pCAMBIA1105.1.....	23
Figura 7: Combinación de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
Figura 8: Concentraciones de antibióticos.....	32
Figura 9: Cambios fisiológicos observados en <i>Arabidopsis thaliana</i> Bay-0 sometidas a estrés por inundación.	35
Figura 10: Plantas de cuatro ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidos a estrés por inundación.	36
Figura 11: Índice de daño en hojas por ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i> antes y después de 0 y 6 días de recuperación (Re 0 y Re 6) posteriores al estrés por inundación.	38
Figura 12: Tiempo letal 50 de los cuatro ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> en estrés por inundación.	39
Figura 13: Digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 con las enzimas EcoRI y BglII	42
Figura 14: Resistencia natural de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> frente a antibióticos	42
Figura 15: Cepas electroporadas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el plásmido pCAMBIA1105.1 e inoculadas en medio LB sin espectinomicina	43
Figura 16: A) Cepas electroporadas. B) Clonas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
Figura 17: Digestiones del vector binario pCAMBIA1105.1 presente en cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con las enzimas de restricción.	44
Figura 18: Tolerancia natural a higromicina en <i>Arabidopsis thaliana</i> Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0. 46	
Figura 19: Tolerancia natural a cefotaxima en <i>Arabidopsis thaliana</i> Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0.. 47	
Figura 20: Evaluación de concentraciones de higromicina en Col-0..	48
Figura 21: Evaluación de concentración de cefotaxima en <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.	49

Figura 22: Escrutinio de transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
Figura 23: Efecto de la combinación de cepa/ecotipo sobre la frecuencia de transformación empleando el método Floral Dip.....	52

V. INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Métodos de transformación genética de plantas.	9
Tabla 2: Ensayo para probar la resistencia natural de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
Tabla 3: Electroporación de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
Tabla 4: Características geográficas de lugares de origen de ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	40
Tabla 5: Comparaciones de tiempos letales 50 (TL 50) de 7 ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	41
Tabla 6: Frecuencias medias de transformación.	51
Tabla 7: Frecuencias de transformación para diferentes ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> empleando el método Floral Dip y la cepa GV3101.....	53
Tabla 8: Frecuencia de transformación para <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0.....	54
Tabla 9: Transformaciones exitosas de diversos géneros de plantas empleando <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54

VI. RESUMEN

Debido a la ubicación geográfica de México y su forma territorial, es un país propenso a sufrir eventos climáticos como huracanes lo que provoca lluvias intensas e inundaciones. La agricultura es uno de los sectores más afectados por los desastres naturales como la inundación.

La inundación es un factor abiótico que afecta gravemente el desarrollo de las plantas, es el segundo desastre natural que causa más daños a los cultivos, por esta razón se buscan estrategias biotecnológicas para aumentar su tolerancia a inundación, pues a menos que se desarrollen nuevas variedades de cultivos capaces de soportar el estrés abiótico, la productividad de cultivos se verá gravemente afectada.

En este aspecto, la exploración de la variación natural (genética y fenotípica) en las respuestas al estrés por inundación de las plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* brinda nuevos conocimientos sobre las múltiples capas de procesos regulatorios que se coordinan genéticamente. Sin embargo, la utilización de otros ecotipos de *A. thaliana* además de Col-0 es limitada debido a la dificultad o falta de metodologías de transformación genética de algunos ecotipos.

En este trabajo, se analizó la tolerancia a la inundación de 3 ecotipos de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* Bay-0, Cvi-0 e Ita-0, en comparación con el ecotipo Col-0. Los resultados demostraron que el ecotipo Cvi-0 (LT50 3.20 d \pm 0.24) es el más sensible ante el estrés por inundación seguido por Ita-0 (LT 50 3.43 d \pm 0.24), Bay-0 (LT50 3.48 d \pm 0.15) y el ecotipo Col-0 (LT 50 4.50 d \pm 0.34) es el más tolerante de los 4. Posteriormente, se determinó la frecuencia de transformación del método Floral Dip empleando 3 cepas (GV3101, GV2260 y EHA105) de *A. tumefaciens* sobre los 3 ecotipos (Bay-0, Cvi-0 e Ita-0) sensibles a inundación. Se concluyó conforme a los resultados obtenidos que la combinación del ecotipo Bay-0 con la cepa GV3101 presentó la mejor frecuencia de transformación (0.2) ya que 5 de las combinaciones restantes de cepa/ecotipo se transformaron a tasas de 10 a 100 veces más bajas y las últimas 3 combinaciones (Cvi-0/GV2260, Ita-0/GV2260 y Cvi-0/EHA105) no presentaron plántulas candidatas transformantes. De tal forma el método de transformación genética Floral Dip abre la posibilidad de usar a Bay-0 (ecotipo sensible a inundación) para realizar pruebas de concepto para estudiar, identificar y caracterizar genes candidatos que puedan aumentar su tolerancia a inundación, así

como para identificar los mecanismos moleculares que subyacen a su baja tolerancia a inundación.

VII. ABSTRACT

Due to the geographic location of Mexico and its territorial shape, it is a country prone to weather events such as hurricanes, which cause heavy rains and floods. Agriculture is one of the sectors most affected by natural disasters such as floods.

Flooding is an abiotic factor that seriously affects plant development, it is the second natural disaster that causes more damage to crops, for this reason biotechnological strategies are sought to increase their tolerance to flooding, because unless new varieties are developed of crops capable of withstanding abiotic stress, crop productivity will be severely affected.

In this regard, the exploration of the natural variation (genetic and phenotypic) in the responses to flood stress of model plants such as *Arabidopsis thaliana* provides new insights into the multiple layers of regulatory processes that are genetically coordinated. However, the use of other ecotypes of *A. thaliana* in addition to Col-0 is limited due to difficulty or lack of genetic transformation methodologies in some ecotypes.

In this work, the flood tolerance of 3, Bay-0, Cvi-0 and Ita-0, ecotypes of the *Arabidopsis thaliana* model plant were compared to the Col-0 ecotype. The results showed that the Cvi-0 ecotype (LT50 $3.20 \text{ d} \pm 0.24$) is the most sensitive to flood stress followed by Ita-0 (LT 50 $3.43 \text{ d} \pm 0.24$), Bay-0 (LT50 $3.48 \text{ d} \pm 0.15$) and the Col ecotype -0 (LT 50 $4.50 \text{ d} \pm 0.34$) is the most tolerant of the 4. Subsequently, the transformation frequency of the floral dip method was determined using 3 strains (GV3101, GV2260 and EHA105) of *A. tumefaciens* on the 3 ecotypes (Bay-0, Cvi-0 and Ita-0) sensitive to flooding. It was concluded that the combination of the Bay-0 ecotype with the GV3101 strain presented the best frequency of transformation (0.2) since 5 of the remaining strain / ecotype combinations were transformed at rates of 10 to 100 times lower and the last 3 combinations (Cvi-0 / GV2260, Ita-0 / GV2260 and Cvi-0 / EHA105) did not present transforming candidate seedlings. Thus, the Floral Dip genetic transformation method opens up the possibility of using Bay-0 (flood sensitive ecotype) to carry out proofs of concept to study, identify and characterize candidate genes that may increase their tolerance to flooding, as well as to identify the molecular mechanisms underlying its low tolerance to flooding.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. La inundación

La inundación es un desastre natural que tiene un efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas (Tamang & Fukao, 2015), ya que ocasiona que el nivel de O₂ disponible en el ambiente celular disminuya (Eysholdt-Derzsó & Sauter, 2019). Este evento llamado hipoxia reduce la capacidad de las hojas de las plantas para la captación de la energía lumínica y acelera el consumo de la energía química almacenada (Haak, *et al.*, 2017; Sasidharan, *et al.*, 2018).

Después de la sequía, la inundación es el segundo estrés abiótico más perjudicial para los cultivos y organismos vegetales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2019). Las pérdidas financieras causadas por las inundaciones a la agricultura son difíciles de calcular, pero los pagos de seguros a los agricultores en EE. UU. por daños causados por inundaciones promediaron \$ 24 mil millones (\$ US) entre los años 2001 y 2011 (Voesenek & Bailey-Serres, 2015). En el sur y sureste de Asia los daños causados por inundaciones a la agricultura ascienden a más de \$ 1000 millones (\$ US) anualmente (Xu, *et al.*, 2006). Según un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), entre 2005 y 2015 los daños causados por las inundaciones costaron a los sectores agrícolas de los países en desarrollo \$ 19 mil millones (\$ US) (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2019). En México, múltiples zonas costeras con actividad agrícola se ven afectadas constantemente por fuertes lluvias que son acarreadas anualmente por los ciclones tropicales y frentes fríos (Oropeza Orozco & Enríquez, 2007; Sarukhán, *et al.*, 2017). Las fuertes lluvias pueden dejar tras de sí miles de hectáreas de cultivo bajo el agua por un tiempo indeterminado; se estima que las pérdidas económicas debidas a inundaciones son en promedio del 35% (Peña Castro, 2014).

Existen 2 tipos de inundación: el anegamiento y la sumersión. El anegamiento, se refiere a la presencia en exceso de agua en el suelo, por largos periodos de tiempo, en la zona de las raíces de las plantas (Sasidharan & Voesenek, 2015), y la sumersión se presenta cuando el nivel de agua es alto y cubre a la planta por completo (Sasidharan, *et al.*, 2017).

Mientras la inundación está presente, las plantas se enfrentan a múltiples desafíos como el acceso limitado al O₂ atmosférico, al CO₂ y problemas de difusión al exterior del etileno (C₂H₄)

(Sasidharan & Voeselek, 2015; Phukan, *et al.*, 2016). El suelo puede mostrar cambios electroquímicos que liberan altas concentraciones de elementos tóxicos como manganeso (Mn^{2+}), hierro (Fe^{2+}) (Voeselek & Bailey-Serres, 2015) y sulfuros (H_2S , HS^- , S^{2-}) (Pucciariello, *et al.*, 2014). Las células y los tejidos se exponen a especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS) y la transpiración se ve severamente restringida lo que causa un impedimento en la absorción y el transporte de nutrientes del suelo (Sasidharan, *et al.*, 2018). En una inundación prolongada, estas condiciones conducen a la falta de energía y la deficiencia de nutrientes en las plantas (Voeselek & Bailey-Serres, 2015). Así mismo también hay una disminución en la luz disponible por lo que disminuye la capacidad fotosintética del organismo (Tamang & Fukao, 2015).

Las plantas presentan diversas consecuencias debidas a la inundación, como clorosis, retraso en el crecimiento y necrosis en los tejidos. Aun cuando el estrés termine antes de producir la muerte, el retraso en el desarrollo y el daño causado a los tejidos hacen que la planta que ha sufrido dicho estrés permanezca en desventaja con respecto a las que no lo sufrieron (Peña Castro, 2014).

1.2. Respuesta de las plantas ante el estrés por inundación

Existen plantas que se desarrollan en ambientes acuáticos (pantanos, manglares o ríos) pues están equipadas con mecanismos adaptativos que les permiten la aireación de sus tejidos (Voeselek & Bailey-Serres, 2015; Yuan, *et al.*, 2017), como son el desarrollo de raíces adventicias, reducción en el grosor de la cutícula y de la pared de la célula epidérmica para una menor resistencia a la difusión de gases (de la Cruz Jiménez, *et al.*, 2012; Tamang & Fukao, 2015), así como la formación de aerénquimas, que son tubos internos en los tallos los cuales ofrecen a la planta una vía interna para el movimiento de oxígeno (Sasidharan & Voeselek, 2015).

Sin embargo, estas adaptaciones no representan mecanismos de tolerancia y la mayoría de las especies vegetales de interés agrícola no poseen tales mecanismos. Las plantas que no tienen los mecanismos adaptativos mencionados anteriormente desarrollaron otros mecanismos canalizados al aspecto bioquímico pues es de gran importancia que tengan un buen manejo de las reservas de sus carbohidratos (Peña-Castro, 2014; Vashisht, *et al.*, 2016).

Se han descrito dos mecanismos para administrar las reservas de carbohidratos: la quiescencia y síndrome de escape, se ha observado que la mayoría de las plantas tiene un mecanismo u otro

(Lee, *et al.*, 2011; Tamang & Fukao, 2015; Loreti, *et al.*, 2016). Las especies donde mejor se han caracterizado las respuestas de las plantas frente al estrés por inundación y comprendido el mecanismo de la regulación molecular de los genes responsables son en el arroz (*Oryza sativa* L.), dos especies divergentes de *Rumex spp.* (*Rumex acetosa* y *Rumex palustris*) y *Arabidopsis thaliana* (Minami, *et al.*, 2018).

1.2.1. Quiescencia

En la quiescencia del arroz (Lat. *quiescere*, estar quieto), el gen SUB1A es el responsable de restringir el uso de los carbohidratos al mínimo para mantener las funciones vitales más esenciales, limitar de forma reversible la elongación y retrasar la floración. De tal forma, la quiescencia hace que la planta permanezca en un estado de pausa, y de esta manera, las concentraciones de almidón y azúcares libres se mantengan altas y permitan a la planta sobrevivir bajo el agua por determinados periodos de tiempo en espera de que la inundación desaparezca, para entonces retomar el crecimiento (Fukao, *et al.*, 2006; Xu, *et al.*, 2006). De manera molecular en la respuesta de quiescencia, el gen SUB1A limita la producción de etileno, lo que contribuye a la reducción de la biosíntesis de ácido giberélico (GA) (Figura 1A). SUB1A también aumenta la producción de brassinosteroides (BR), promoviendo la degradación de GA. También acumula proteínas SLR1 que son reguladores negativos de la señalización de GA, lo que da como resultado la inhibición de la elongación, así como también se suprimen el consumo de carbohidratos. De esta manera se puede evitar el hambre por carbohidratos y una crisis energética durante la sumersión (Tamang & Fukao, 2015).

1.2.2. Síndrome de escape

El segundo mecanismo, llamado síndrome de escape (Figura 1B), es útil en las plantas que enfrentan inundaciones constantes pero de baja profundidad (Hattori, *et al.*, 2009) Este mecanismo incluye el doblamiento ascendente de las hojas (hiponastia), el alargamiento mejorado de los brotes, la formación de aerénquima, desarrollo de raíces adventicias, formación de películas de gas en la superficie de las hojas y modificaciones en la anatomía de la hoja; esto generalmente implica la activación metabólica y la movilización de reservas de energía para impulsar el alargamiento (Akman, *et al.*, 2012; Voeselek & Bailey-Serres, 2015; Minami, *et al.*, 2018; Mustroph, 2018). Los genes responsables del síndrome de escape son SNORKEL (SNK1 y

SNK2) (Hattori, *et al.*, 2009); los genes SNK promueven la biosíntesis, la acumulación y la capacidad de respuesta de GA. El GA induce la elongación en las plantas permitiéndoles que se alarguen bajo el agua. Se piensa que BR tiene un papel regulador en la descomposición de GA (Figura 1B) (Tamang & Fukao, 2015; Voeselek & Bailey-Serres, 2015).

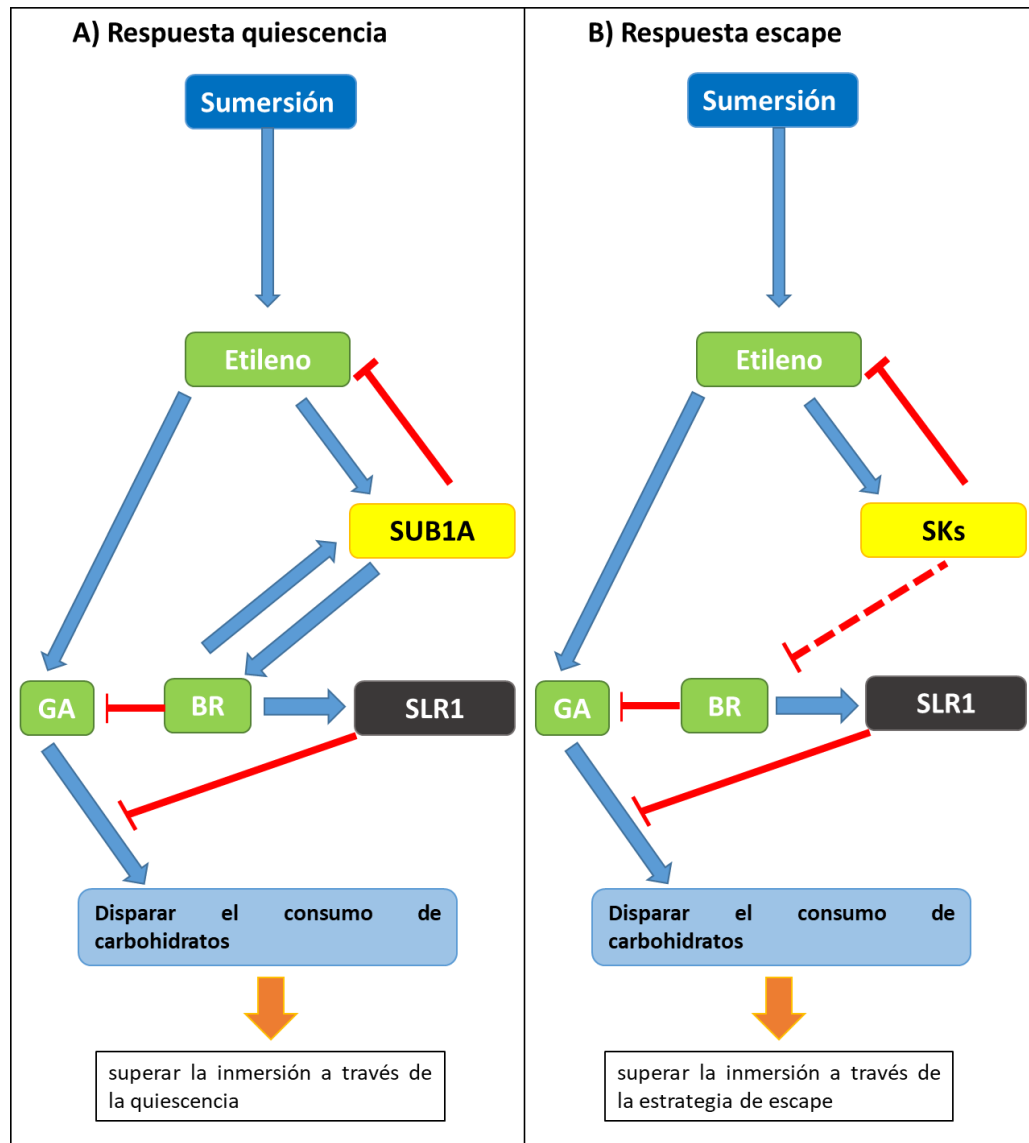


Figura 1: Modelo de los mecanismos regulatorios de quiescencia y síndrome de escape causados por inundación (Tamang & Fukao, 2015). Las líneas azules y rojas representan regulación positiva y negativa, respectivamente. Una línea discontinua indica una relación hipotética. Abreviaturas: SUB1A (Gen SUB1A), SKs (Genes SNORKEL), GA (Ácido giberélico), BR (brassinosteroides), SLR1 (Proteína DELLA SLR1).

1.2.3. Factores de respuesta al etileno

A pesar de tener funciones contradictorias, los genes SNK1/2 y SUB1A pertenecen al grupo VII de la familia génica de los Ethylene Response Factors (ERFs) o Factores de Respuesta al Etileno (Fukao, *et al.*, 2006; Rivera-Contreras *et al.*, 2016), pues tanto la quiescencia como el síndrome de escape implican la señalización y regulación del etileno mediante los ERF-VII específicos de la estrategia (Minami, *et al.*, 2018). Los factores de respuesta al etileno son una familia de factores de transcripción y forman parte de la superfamilia APETALA2 (AP2)/ERF (Nakano, *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las proteínas AP2/ERF tienen funciones importantes en la regulación en varios procesos biológicos relacionados con el crecimiento y el desarrollo, así como diversas respuestas a estímulos ambientales tales como altas temperaturas, alto contenido salino, sequía e inundación (Nakano, *et al.*, 2006, Jung, *et al.*, 2007; Gil-Monreal, *et al.*, 2019; Gunaseelan, *et al.*, 2019).

El etileno es una fitohormona gaseosa que se sintetiza de forma constitutiva en las células vegetales y que se dispersa rápidamente en el ambiente bajo condiciones de crecimiento normales (Bailey-Serres & Voeselek, 2008). A pesar de su estructura simple de dos carbonos, el etileno sirve como un mediador clave de los factores de estrés bióticos y abióticos, como los causados por patógenos, heridas, estrés por frío y calor, luz UV, sequía y salinidad (Abiri, *et al.*, 2017). Es esencial en las respuestas de inundación ya que cuando los órganos de las plantas se encuentran cubiertos por el agua, el etileno se acumula a su alrededor induciendo la transducción de señales (Müller & Munné Bosch, 2015; Yuan, *et al.*, 2017).

Los ERF-VII se caracterizan por poseer un motivo N terminal con una cisteína sensible al oxígeno en la penúltima posición MCGGAI (I/L) (CMVII-1) (Eysholdt-Derzsó & Sauter, 2017). La cisteína, es la zona donde se percibe la concentración de oxígeno y óxido nítrico ambiental (van Dongen & Licausi, 2015). En condiciones normales de O₂ (normoxia) la abundancia y la actividad de los factores de transcripción de ERF-VII se regulan a través de la degradación proteasomal continua, los ERF-VII son sustratos de la enzima cisteína oxidasa (PCO) que emplea O₂ y óxido nítrico (NO) para oxidar a la cisteína del dominio N-terminal (MCGGIL) de los ERF-VII a sulfonato-cisteína y así, señalarlos para ser degradados en el proteosoma (van Dongen & Licausi, 2015; Weits, *et al.*, 2014; Fukao, *et al.*, 2019). Sin embargo, cuando hay poco O₂ como cuando las plantas están bajo

la inundación, o cuando el NO se remueve por acción de la hemoglobina vegetal para evitar la oxidación de la cisteína N-terminal, los ERF-VII no se degradan y ejercen su función como factores de transcripción estimulando los Genes Centrales de Hipoxia (GCH), por tanto, se promueve la respuesta anaeróbica (van Dongen & Licausi, 2015; Weits, *et al.*, 2014).

Las especies donde mejor se han caracterizado los ERF-VII son el arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis thaliana* (Sasidharan, *et al.*, 2018).

1.2.4. Genes Centrales de Hipoxia (GCH)

Debido al estrés causado por la hipoxia en la célula vegetal, se restringen los procesos que requieren un alto consumo de energía, como la síntesis de la mayoría de las proteínas, exceptuado un conjunto de enzimas y factores de transcripción GCH. Los GCH son un grupo de factores de transcripción, transductores, chaperonas, hemoglobinas, proteínas de identidad desconocida y enzimas del metabolismo fermentativo (Branco-Price, *et al.*, 2008). Las proteínas codificadas por los GCH permiten que la célula modifique su metabolismo pasando de respiración oxidativa mitocondrial al metabolismo anaeróbico para obtener ATP y NAD⁺ vía glicólisis y vía fermentativa (Mustroph, *et al.*, 2010; Eysholdt Derzsó & Sauter, 2018; Azahar, *et al.*, 2020). En condiciones de hipoxia-anoxia, la fuente principal de energía es la glucosa proveniente del almidón (Voesenek & Bailey Serres, 2015); y para mantener funcionando la glicolisis bajo condiciones de inundación, las plantas utilizan la fermentación para seguir obteniendo energía, y regeneran el NAD⁺ a través de 3 vías (Figura 2) que utilizan piruvato como sustrato de partida (Ismond, *et al.*, 2003).

1.3. Biotecnología del estrés por inundación

En los últimos años, el estrés vegetal debido a inundaciones, sus componentes (sumersión, anegamiento, hipoxia y anoxia), su percepción y las respuestas, se han investigado ampliamente a niveles morfológicos, fisiológicos, celulares y moleculares (Voesenek & Bailey Serres, 2015; Vashisht, *et al.*, 2016; Mustroph, 2018). Dichos estudios se han hecho en especies silvestres, modelos (ejemplo *A. thaliana*) y cultivadas (ejemplo *Oryza sativa*) para identificar elementos que puedan constituir mecanismos de tolerancia a la inundación que finalmente puedan ser traducidos a cultivos de interés agrícola (Mickelbart, *et al.*, 2015).

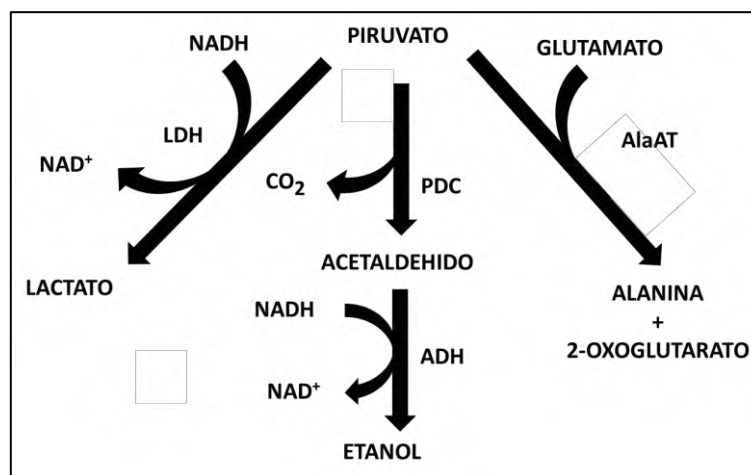


Figura 2: Vías fermentativas, (Ismond, et al., 2003). Abreviaturas: NADH/Forma reducida, NAD⁺/Forma oxidada (Nicotinamida adenina dinucleótido) LDH (Lactato deshidrogenasa), CO₂ (Dióxido de carbono), PDC (Piruvato descarboxilasa), ADH (Alcohol deshidrogenasa), AlaAT (Alanina aminotransferasa).

La comprensión de la regulación genética, fisiológica y molecular de estos rasgos ha sido utilizada para elucidar la manera en cómo sobreviven las plantas bajo diferentes regímenes de inundación. Posteriormente esa misma comprensión ha sido aplicada para mejorar la tolerancia a inundación de cultivos de interés económico (Mustroph, 2018). Tal es el caso del ERF-VII SUB 1 (que afecta positivamente la tolerancia a sumersión) que ha sido utilizado en la biotecnología del arroz para generar nuevas variedades con tolerancia aumentada a inundación mediante su introgresión a variedades comerciales (*japonica* e *índica* intolerantes a sumersión) por medio de cruza y selección molecular (Xu, et al., 2006; Septiningsih, et al., 2009; Singh, et al., 2009; Singh, et al., 2013), esto ha tenido un impacto positivo entre los pequeños productores asiáticos, al estabilizar la productividad ante un evento de inundación (Singh, et al., 2009; Singh, et al., 2013).

De igual forma, la reducción en la expresión del gen HvPRT6 que codifica una proteína ligasa E3/N-Recognina la cual participa en la señalización de los ERF-VII para posteriormente ser degradados por el proteosoma, mostró un aumento en tolerancia al anegamiento en *Hordeum vulgare* L. Esto se tradujo en un menor porcentaje de clorosis, mayor retención de clorofila, una mejor recuperación y rendimiento de biomasa (Mendiondo, et al., 2016).

1.4. La variación natural de tolerancia a inundación en plantas

Diversos estudios han demostrado que la tolerancia al estrés por inundación depende de varias adaptaciones que regulan la expresión génica y fisiológica posterior a la inundación (Xu et al.,

2006; Nakano *et al.*, 2006; Hattori *et al.*, 2009; Voeselek and Bailey-Serres 2015). Por lo tanto, para comprender la base genética de estas diversas adaptaciones, es crucial revelar genes adaptativos mediante el uso de plantas con variaciones naturales en la tolerancia a inundación. De tal forma, la exploración de variación natural genética es un recurso fundamental para descubrir genes que confieran o aumenten la tolerancia a inundación (Akman, *et al.*, 2017).

Un ejemplo claro de fue el hallazgo del locus SUB1 que contiene al ERF-VII SUB1A el cual fue identificado mediante análisis de locus de rasgo cuantitativo (QTL) utilizando variedades de arroz, con capacidades de tolerancia a inundación contrastantes (Xu & Mackill, 1996).

No sólo existe diversidad genética en plantas de cultivo; las plantas modelo como *A. thaliana* también ofrecen un nicho de diversidad que puede ser estudiado para desentrañar adaptaciones a diversas condiciones ambientales (Akman, *et al.*, 2017). Actualmente existen 6713 ecotipos en la colección TAIR de Arabidopsis (Phoenix Bioinformatics, 2019a). De tal manera Vashisht, *et al.* (2011) realizaron un estudio en el que mostraron que 86 ecotipos de *A. thaliana* (Anexo 1) tienen una considerable variación natural de tolerancia a inundación, cuantificado como supervivencia frente a 4 a 11 días de inundación. Posteriormente con el conocimiento adquirido y con las posiciones extremas en el rango de tolerancia (sensibles: Cvi-0, Bay-0 e Ita-0, tolerantes: Lp2-6, Ws-2 y C24) se realizó un estudio molecular que aportó información sobre los mecanismos alternativos de tolerancia a inundación (Van Veen, *et al.*, 2016). Estos ecotipos de tolerancia contrastante pueden ser de amplia utilidad para realizar pruebas de concepto sobre mecanismos reguladores de la tolerancia. Lo anterior se debe a que casi todos los estudios de sobreexpresión y transcriptoma se han realizado en *A. thaliana* ecotipo Col-0 que resultó ser un ecotipo de tolerancia intermedia (Vashisht, *et al.*, 2011) lo que ha hecho difícil aumentar más su tolerancia (Peña Castro, *et al.*, 2011). De esta forma, los ecotipos de *A. thaliana* más sensibles a inundación (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) descritos por, Vashisht, *et al.*, 2011 y van Veen, *et al.*, 2016 pueden servir como modelos funcionales para probar estrategias biotecnológicas para el aumento de la tolerancia al estrés por inundación.

1.5. *Arabidopsis thaliana*: especie modelo.

Arabidopsis thaliana es una especie de crucífera, una diminuta maleza anual con ecotipos que se originan en un amplio rango geográfico (Figura 3) como lugares rocosos y sitios perturbados por una variedad de climas y presiones selectivas (Vashisht, *et al.*, 2011). Estos ecotipos presentan

una amplia variación morfológica y establecen un sistema valioso para descifrar las repuestas que se presentan ante diversas condiciones ambientales (Akman, *et al.*, 2017). Las investigaciones realizadas con *A. thaliana* han proporcionado la secuenciación completa de su genoma, se han elucidado genes y las vías de desarrollo que controlan rasgos ecológicamente importantes como la germinación, el tiempo de floración, la resistencia a las plagas y la tolerancia a diversos tipos de estrés (Mitchell Olds & Schmitt, 2006).



Figura 3: Distribución geográfica de ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYN, (Phoenix Bioinformatics, 2019b).

1.6. Transformación genética de plantas

Existen diversos métodos para la transformación genética de plantas, la elección de un método u otro depende en parte de los objetivos que se quieran alcanzar, de los recursos económicos, técnicos, tejidos u organismos vegetales que se empleen, así como de las ventajas y desventajas que estos presenten (Tabla 1). Actualmente la biobalística y el sistema de transferencia de genes mediado por *Agrobacterium* son de las técnicas más utilizadas para el desarrollo de plantas transgénicas (Stewart Jr, 2016). El sistema de transferencia de genes mediado por *Agrobacterium tumefaciens* es altamente eficiente para el desarrollo de plantas transgénicas. Esto es debido a que el sistema emplea la capacidad natural de *A. tumefaciens* para integrar establemente parte de su material genético dentro del genoma de las plantas (Zhang, *et al.*, 2006).

Tabla 1: Métodos de transformación genética de plantas.

Método	Procedimiento	Ventajas	Desventajas
Electroporación (Krassowska & Filev, 2007)	Se emplea una corriente eléctrica para generar permeabilidad en las membranas, induciendo poros transitorios, a través de los cuales, los ácidos nucleicos pueden ingresar al interior de la célula vegetal.	Método de fácil operación y relativamente simple.	Se debe emplear en protoplastos (células sin pared). Requiere cultivo de tejidos. Baja frecuencia de transformación.
Microacupuntura láser (Kajiyama <i>et al.</i> 2007)	Un microhaz láser enfocado perfora agujeros en la pared celular lo que permite la introducción de ácidos nucleicos.	Método eficiente y preciso.	Método costoso y laborioso.
Biobalística (Vasil, 2007)	Partículas metálicas recubiertas de genes, las cuales se aceleran para penetrar la pared celular para que posteriormente los ácidos nucleicos se integren en el genoma vegetal.	Método de fácil operación. No requiere pretratamiento de la pared celular. Es posible la transformación con múltiples transgenes. Se pueden emplear diversos tejidos vegetales, no requiere la clonación del gen de interés en un vector.	Método costoso, requiere suministro continuo de consumibles, equipo especializado. El material genético puede dañarse, se producen múltiples copias de genes introducidos. Baja frecuencia de transformación. Expresión transitoria, se presentan rearrreglos, se puede presentar daño en los tejidos.
Ultrasonificación (Beranová, <i>et al.</i> , 2008)	Se emplea ultrasonido para generar permeabilidad en las membranas, induciendo poros transitorios, a través de los cuales, los ácidos nucleicos pueden ingresar al interior de la célula vegetal.	Método de fácil operación con frecuencia de transformación media.	Método costoso, protocolos no estandarizados. Los efectos fisicoquímicos del proceso pueden ocasionar a las células formación de radicales libres; daños en la pared celular; alteraciones en la permeabilidad de la membrana.
Microinyección Larik <i>et al.</i> 2004	Entrega directa de los ácidos nucleicos a la célula vegetal a través de una pipeta de inyección.	Frecuencia de transformación muy alta. Capacidad de portar grandes fragmentos de ADN. Elección de la célula a transformar, la descarga del ADN es precisa, el proceso se realiza bajo control visual.	Método costoso, lento, tedioso, requiere cultivo de tejidos, personal entrenado, equipo especializado y mayor instrumentación. Solo una célula recibe el ADN por cada inyección.

Liposomas (Morigaki & Walde, 2007)	Los ácidos nucleicos son encapsulados en una esfera lipídica (liposoma), que permite o facilita su paso a través de la célula vegetal por endocitosis directamente por la pared celular, hasta el núcleo.	Protección de los ácidos nucleicos frente a nucleasas, capacidad de portar grandes fragmentos de ADN, biocompatibilidad con membranas; no requiere de un portador para el DNA.	Frecuencia de transformación muy baja, inserción del ADN en tándem, método lento y laborioso.
Transferencia de genes mediada por compuestos químicos (Chakrabarty, <i>et al.</i> , 2008)	Se emplean compuestos químicos para generar permeabilidad en las membranas, induciendo poros transitorios, a través de los cuales, los ácidos nucleicos pueden ingresar al interior de la célula vegetal.	La transferencia directa de genes a las células evita la limitación del rango de hospedadores; fácil de realizar, con un costo relativamente bajo.	Baja frecuencia de transformación, poca reproducibilidad, limitado a protoplastos o pocos tipos de células vegetales, los compuestos químicos pueden ser tóxicos para las células. Requiere de cultivo de tejidos.
Sistema <i>Agrobacterium</i> (Ghedira, <i>et al.</i> , 2013a)	Se emplea la capacidad natural de <i>Agrobacterium</i> para introducir ácidos nucleicos dentro del genoma de las plantas.	Simplicidad de los protocolos, no requiere de equipos sofisticados, se pueden emplear diversos tejidos vegetales, la integración del T-ADN es relativamente preciso. Generalmente se tiene inserciones de copia simple y baja probabilidad de rearrreglos en el ADN exógeno.	Algunos protocolos causan daño al tejido empleado, los vectores están diseñados solo para infectar el núcleo, se requiere la eliminación de la bacteria de los tejidos tratados, el rango de hospederos está limitado a que estos sean susceptibles a la infección. El sistema puede ser empleado en diferentes tipos de tejidos vegetales.

La transferencia del material genético al genoma de las plantas se hace a través del ADN-T presente en un plásmido Ti/inductor de tumores (Ghedira, *et al.*, 2013a; Gordon & Christie, 2014; Stewart Jr, 2016). En la actualidad, múltiples estudios para la transferencia de genes, a través del sistema *A. tumefaciens* utilizan un sistema binario (Figura 4). Esta estrategia consiste en el uso de dos plásmidos; uno de ellos, el vector binario, contiene los bordes derecho e izquierdo que flanquean el ADN-T en el que se incluyen los genes de interés (ejemplo inserto, gen marcador de selección, gen indicador y múltiples sitios de clonación), orígenes de replicación para *E. coli* y *A. tumefaciens*, genes marcadores seleccionables para las bacterias y otros componentes accesorios, y el otro plásmido, denominado plásmido auxiliar, es el que contiene los genes "Vir", que son los encargados de mediar la transferencia efectiva de los genes de interés hacia las células vegetales (Hellens, *et al.*, 2000; Komori *et al.*, 2007; Lee & Gelvin, 2008).

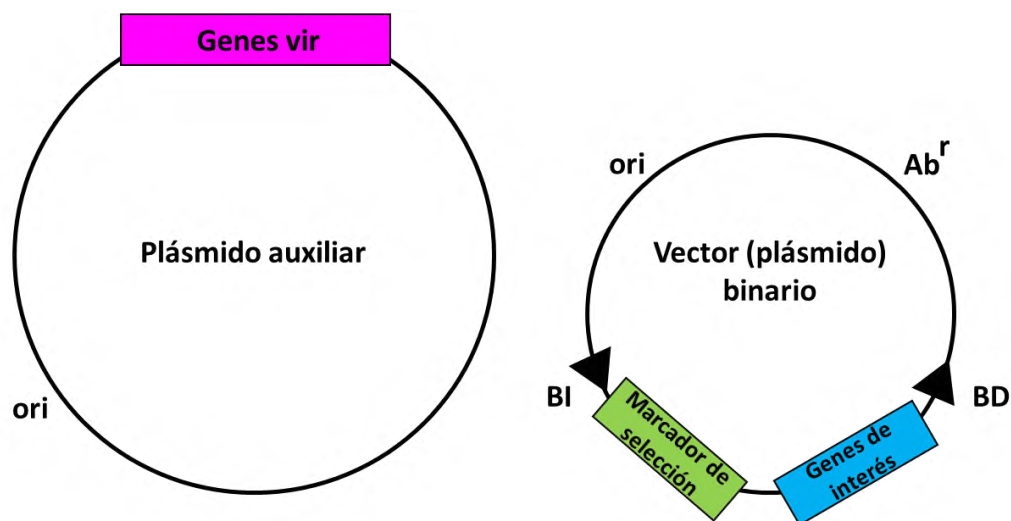


Figura 4: Sistema binario para la transferencia de genes. Abreviaturas: ori (Origen de replicación), Ab^r (Resistencia a antibiótico), BI (Borde izquierdo), BD (Borde derecho).

La manipulación *in vitro* de los vectores binarios es mucho más simple debido a su menor tamaño en comparación con los plásmidos Ti intactos, por lo que ya no son necesarias las tecnologías genéticas microbianas complejas para introducir genes de interés en el T-ADN de un plásmido Ti. Por el contrario, los genes de interés pueden clonarse fácilmente en pequeñas regiones de T-ADN dentro de vectores binarios (Hellens, *et al.*, 2000).

1.6.1. Transformación genética de *Arabidopsis thaliana*

La planta modelo *A. thaliana* ha sido transformada genéticamente de manera extensiva por diferentes métodos tales como la transformación de protoplastos tratados con polietilenglicol para la administración de ADN plasmídico (Damm, *et al.*, 1989; Abel & Theologis 1994), biobalística (Seki, *et al.*, 1991), así como por el sistema *Agrobacterium*.

Con el sistema de transferencia de genes mediado por *Agrobacterium* se pueden emplear dos métodos principales para la transformación de *A. thaliana* aquellos métodos dependientes del cultivo tisular en donde se requiere un periodo de cocultivo con explantes foliares (Valvekens, *et al.*, 1988) o de raíces (Gelvin, 2006) y métodos *in planta* como el cocultivo de semillas en proceso de germinación (Feldmann, & Marks, 1987), infiltración al vacío (Bechtold & Bouchez, 1995), spray floral (Chung, *et al.*, 2000), transformación por inoculación floral (Narusaka, *et al.*, 2010) o el método Floral Dip (Clough & Bent, 1998).

Sin embargo, los métodos de transformación dependientes del cultivo tisular presentan ciertas desventajas como son la posible variación somaclonal causada por el cultivo de tejidos, por el contrario, los métodos *in planta* evitan esta situación ya que la mayoría se realizan sobre los tejidos florales en desarrollo de plantas adultas (Hwang, *et al.*, 2017).

El método más popular y ampliamente utilizado para la generación de *A. thaliana* transgénicas es el método Floral Dip esto es debido a que requiere mínima manipulación, equipos relativamente económicos, pocos reactivos especializados (Ghedira, *et al.*, 2013a) y es fácilmente escalable, por lo que permite la producción de un gran número de líneas transgénicas de *Arabidopsis* independientes en un período corto de tiempo (Hwang, *et al.*, 2017). Y aun cuando la eficacia de transformación global del método Floral Dip puede no ser alta, el número total de semillas producidas por una planta de *Arabidopsis* asegura que se puedan recuperar suficientes eventos transgénicos incluso en un experimento de transformación única (Zhang, *et al.*, 2006).

Brevemente el método Floral Dip consiste en sumergir el tejido floral joven o en desarrollo en una solución de *A. tumefaciens*, sacarosa y surfactante Silwet L-77. El surfactante facilita e incrementa la infección por parte de *A. tumefaciens* (Díaz-Granados & Chaparro-Giraldo, 2012; Yildiz, *et al.*, 2016; Hwang, *et al.*, 2017). Así mismo, la utilidad del método Floral Dip va más allá de las especies

de *Arabidopsis*, aunque actualmente todavía se limita a especies que pertenecen a la familia Brassicaceae (Zhang, *et al.*, 2006).

Aun cuando la mayoría de los ecotipos de *A. thaliana* han sido transformados mediante el método Floral Dip algunos ecotipos son más difíciles de transformar que otros y por lo general no se han identificado las variables causales de esta situación (Bent A, 2006). En particular los ecotipos Cvi-0 y Bay-0 no han sido transformados de manera extensiva por el método Floral Dip y en los reportes existentes (Zuther, *et al.*, 2004; Alonso-Blanco, *et al.*, 2005; Boggs, *et al.*, 2009; Strickler, *et al.*, 2013; Answer, *et al.*, 2014; Rea & Nasrallah, 2015; Jakobson, *et al.*, 2016) no se evalúa la frecuencia de transformación, en algunos no se menciona que tipo cepa de *A. tumefaciens* fue empleada y tampoco se menciona la dificultad o facilidad para su transformación. Por otra parte, para el ecotipo Ita-0 no se han reportado metodologías de transformación genética.

1.7. El uso de la transgénesis en *Arabidopsis thaliana* Col-0 para el estudio del estrés por inundación

Para elucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia a inundación en las plantas se ha utilizado ampliamente la transgénesis de *A. thaliana* (Col-0) empleando el método Floral Dip, ya sea inhibiendo o sobreexpresando genes propios de *A. thaliana* para evaluar su participación e importancia durante la respuesta al estrés por inundación, o expresando genes heterólogos candidatos que confieran o aumenten la tolerancia a inundación.

Por ejemplo, Peña-Castro, *et al.*, (2011) realizaron un trabajo en donde utilizaron la expresión ectópica heteróloga de dos factores de transcripción (SUB1A y SUB1C) del locus SUB1 de *Oryza sativa* L. en *Arabidopsis thaliana* (Col-0; mediante Floral Dip) para examinar la conservación evolutiva del papel de los ERF VII, y también para obtener información sobre la función individual de los genes SUB1A y SUB1C. Ellos determinaron que, aunque la expresión de estos genes no mejoró la supervivencia por inundación, la expresión de SUB1A inhibió la respuesta a GA y estimuló la respuesta a ABA. En dicho estudio también se encontró que SUB1A reduce los ARNm asociados con la inducción de la floración y por tanto retrasa la floración, la cual es una parte integral de la estrategia de quiescencia mediada por SUB1A inducida por inundación. Ambos comportamientos se observan en *Oryza sativa* L. Encontraron puntos en común en los procesos de desarrollo y las respuestas ambientales reguladas por SUB1A en *A. thaliana* y *Oryza sativa* L. Los resultados del estudio demuestran que los ERF VII actúan en redes conservadas

evolutivamente que integran las respuestas al estrés abiótico con el desarrollo. Por otra parte, Juntawong, *et al.*, (2020) caracterizaron la función de los ERF VII de *Jatropha curcas* (JcERFVII 1-3) como genes candidatos para la ingeniería genética de *J. curcas* para aumentar su tolerancia a inundación, así como la función individual de los genes y el impacto de la modificación N-terminal hacia una respuesta de concentraciones bajas de oxígeno, expresándolos heterológicamente en *A. thaliana* (Col-0; mediante Floral Dip). Este estudio reveló que las tres proteínas JcERFVII son sustratos de la vía de la regla del extremo N, además la sobreexpresión de *JcERFVII2* confirió tolerancia al estrés por bajas concentraciones de oxígeno en *Arabidopsis*. Reportaron que JcERFVII2 es un factor de transcripción sensible a inundación regulado por la regla del extremo N que modula la expresión de múltiples genes sensibles al estrés; por lo tanto, es un gen candidato potencial para el mejoramiento molecular de múltiples cultivos sensibles al estrés por inundación.

Otro uso de la transgénesis de *A. thaliana* es para comprender el mecanismo en la detección y/o señalización molecular del estrés por inundación, por ejemplo, sobreexpresando los ERF VII de *Arabidopsis*, lo cual puede llegar a mejorar la tolerancia al estrés por inundaciones. De tal forma, Licausi, *et al.*, 2011 mostraron que la vía de la regla del extremo N dependiente de ubiquitina para la degradación de proteínas, funciona como un mecanismo de detección de oxígeno en *A. thaliana*, al identificar un sistema de detección de oxígeno que conduce a cambios en la estabilidad del factor de transcripción RAP2.12 (perteneciente a ERF VII), que regula la expresión del gen hipóxico y la posterior adaptación de las plantas de *Arabidopsis* a niveles bajos de oxígeno. Para esto sobreexpresaron RAP2.12 y manipularon la secuencia de aminoácidos N-terminal de RAP2.12 en *A. thaliana* (Col-0; mediante Floral Dip). La sobreexpresión de RAP2.12 aumentó la tolerancia a la inmersión con respecto al control de silvestre, como lo demostró el mayor número y peso seco de plantas que se recuperaron después de la sumersión, lo cual se explica por la inducción más rápida y fuerte de genes que responden a la hipoxia durante el tratamiento de inmersión. De manera similar Paul, *et al.*, 2016, demostraron que el funcionamiento de RAP2.12 como sensor de oxígeno es indispensable para optimizar el rendimiento metabólico y el crecimiento de las plantas tanto en condiciones normóxicas como hipóxicas, para lo cual compararon plantas de *A. thaliana* (Col-0) que sobreexpresan formas de RAP2.12 sensibles e insensibles a la vía de la regla del extremo N, los resultados de la sobreexpresión en condiciones normóxicas de RAP2.12 insensible a la vía de la regla del extremo

N conducen a la expresión de genes anóxicos, aumentando las actividades de las enzimas fermentativas y por tanto aumentando la acumulación de productos de fermentación con lo cual se conduce a la disminución de almidón y se restringe el crecimiento de la planta, por el contrario estos efectos no aparecieron para la sobreexpresión de RAP2.12 sensible a la vía de regla del extremo N. Se concluyó que la regulación de la fermentación es necesaria para evitar que la fermentación aeróbica desperdicie energía y reservas de carbono, esto es importante para permitir una mejor supervivencia, mantener el crecimiento, desarrollo y resistencia en condiciones de estrés anóxico. Además, proporcionaron evidencia de que la detección de oxígeno, mediada por la estabilización de RAP2.12, regula los procesos metabólicos centrales, como la respiración, el ciclo del ácido tricarboxílico y el metabolismo de los aminoácidos, así como los niveles de metabolitos inmunorreguladores. Por otra parte, Gonzali, *et al.*, (2015) realizaron un estudio en *A. thaliana* Col-0 para comprender la función molecular de una proteína de estrés universal sensible a hipoxia 1 (HRU1) la cual es inducida por la estabilización de RAP2.12 (ERF VII) bajo condiciones de hipoxia, para esto emplearon mutantes knockout de HRU1, así como la sobreexpresión de HRU1. Los resultados demostraron que HRU1 contribuye al control de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en niveles bajos de oxígeno, así como que las mutaciones las de HRU1 alteran la producción de peróxido de hidrógeno y por tanto se reduce la tolerancia a la sumersión y a la anoxia. La inducción de HRU1 al depender de la estabilización de RAP2.12 en condiciones de anoxia representa un vínculo entre la detección de oxígeno y la producción de ROS bajo anoxia.

El uso de mutantes también es de utilidad para caracterizar y obtener información sobre mecanismos biológicos expresados durante la sumersión / hipoxia. Por ejemplo, Vicente, *et al.*, (2017) empleando *A. thaliana* Col-0 y *Hordeum vulgare* (mutantes y transgénicas) demostraron que la estabilización de los ERF VII, y por tanto la vía de la regla del extremo N, influye en el crecimiento, el desarrollo, así como en la respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés abiótico (salinidad, sequía, inundación, temperaturas bajas y altas). De igual forma evidenciaron que los ERFVII actúan como sensores de NO a través de la vía de la regla del extremo N. Para esto redujeron la actividad de la enzima nitrato reductasa en respuesta a estrés abiótico, lo que resultó en niveles reducidos de NO y por consiguiente la estabilización de los sustratos de la regla del extremo N. Por otra parte, Tsai, *et al.*, (2016) estudiaron los genes (GDH1, GDH2 y GDH3) que

codifican la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH) como parte de los objetivos putativos de ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3) durante la anoxia y posterior reoxigenación, para lo cual emplearon mutantes de *A. thaliana* *gdh1gdh2*, *ein2-5* y *ein3eil1*. Sus resultados revelaron el papel esencial de GDH en la reposición del ciclo del ácido tricarboxílico a través de su actividad enzimática de desaminación, así como la importancia de GDH durante la recuperación del estrés por concentraciones bajas de oxígeno. Adicionalmente caracterizaron la relación entre la señalización de etileno y GDH; los resultados de los ensayos enzimáticos mostraron que el nivel de GDH durante la anoxia-reoxigenación disminuyó en los mutantes *ein2-5* y *ein3eil1* (insensibles al etileno). Además, empleando mutantes *gdh1gdh2* (actividad GDH no significativa) encontraron que La pérdida de actividad de GDH provoca daños en las plantas durante la reoxigenación posterior a inundación, así como una reposición ineficaz del ciclo del ácido tricarboxílico, un metabolismo de carbohidratos alterado, una biosíntesis reducida de fitosteroles y una regeneración de energía retardada. En un análisis posterior se indicó que la actividad de desaminación de GDH regenera el 2-oxoglutarato, que es un cosustrato que facilita la descomposición de la alanina por la alanina aminotransferasa por lo que GDH participa en la reposición del ciclo del ácido tricarboxílico durante la reoxigenación.

1.8. Transformación de diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* para el estudio del estrés por inundación

Diversos estudios han demostrado que la tolerancia al estrés por inundación depende de varias adaptaciones que regulan la expresión génica y fisiológica posterior a la inundación (Xu *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2006; Hattori *et al.*, 2009; Voeselek and Bailey-Serres 2015). Por lo tanto, para comprender la base genética de los mecanismos que subyacen a la tolerancia a inundación es crucial revelar genes adaptativos mediante el uso de plantas modelo con variaciones naturales genéticas en su tolerancia a inundación (Akman, *et al.*, 2017), tal como *Arabidopsis thaliana* pues sus ecotipos muestran una variación considerable en la capacidad para tolerar la sumersión completa, lo cual convierte a *A. thaliana* en una buena especie para identificar, caracterizar genes y para estudiar los mecanismos que contribuyen a la supervivencia bajo el agua (Vashisht, *et al.*, 2011).

La mayor parte de los estudios que emplean la transgénesis de *A. thaliana* para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la tolerancia a inundación emplean el ecotipo Col-0. No

obstante resultó ser un ecotipo de tolerancia intermedia (Vashisht, *et al.*, 2011), lo cual hace difícil aumentar más su tolerancia a inundación (Peña-Castro, *et al.*, 2011). Desafortunadamente la transgénesis de otros ecotipos de *A. thaliana* distintos de Col-0 para el estudio del estrés por inundación empleando el método Floral Dip no es tan eficiente (Clough & Bent, 2008; Ghedira, *et al.*, 2013a). Para el método Floral Dip se deben tener en cuenta algunos factores importantes que pueden influir directamente en el éxito de la transformación.

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada puede influir significativamente en la eficiencia de la transformación genética, pues la virulencia, así como las diferencias estructurales y organizacionales del ADN-T y otros factores genéticos, tanto de la planta como de la bacteria, pueden ser distintos y mermar su capacidad de infección. El origen de los plásmidos Ti también influye en la frecuencia de transformación (Ghedira, *et al.*, 2013a; Martirena Ramírez & Veitía, 2013).

La recalcitrancia de algunos ecotipos de *A. thaliana* para la transformación por Floral Dip podría ubicarse a nivel de la inflorescencia (morfología) esto es debido a que el objetivo principal de *Agrobacterium* durante la transformación es el gametofito femenino presente dentro de los óvulos (Desfeux, *et al.*, 2000). La etapa fisiológica de *Arabidopsis*, y en particular el estado de desarrollo floral es de suma importancia pues los tejidos reproductivos femeninos son más susceptibles en etapas tempranas de la floración (Ghedira, *et al.*, 2013a). También se puede especular que la variabilidad en las frecuencias de transformación se debe al número variable de flores en distintas etapas de desarrollo que tiene *A. thaliana*, en las cuales los óvulos son accesibles a *Agrobacterium* y en las cuales las condiciones son favorables para llevar a cabo la transferencia de ADN (Yew, *et al.*, 2018), pero también podría deberse a una respuesta de defensa de *Arabidopsis* activada durante la infección por *Agrobacterium* (Adam *et al.* 1999; Chung *et al.*, 2005; Citovsky *et al.* 2007). Una mejor comprensión de estos parámetros podría descifrar los mecanismos que subyacen al método de transformación Floral Dip para ecotipos de *Arabidopsis* recalcitrantes (Ghedira, *et al.*, 2013a).

2. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la ubicación geográfica de México (entre los océanos Pacífico y Atlántico) y su forma territorial, es un país propenso a sufrir eventos climáticos como lluvias y huracanes que se traducen en elevados riesgos de inundaciones. Se espera que como consecuencia del cambio climático la secuencia de este tipo de eventos aumente.

La inundación es un factor abiótico que afecta gravemente a las plantas, y es el segundo desastre natural que causa más daños a los cultivos. Por esta razón se buscan estrategias biotecnológicas para aumentar su tolerancia a inundación, pues a menos que se desarrollen nuevas variedades de cultivos capaces de soportar el estrés abiótico, la productividad se verá gravemente afectada.

La exploración de la variación natural (genética y fenotípica) en las respuestas de las plantas al estrés por inundación brinda nuevos conocimientos sobre las múltiples capas de procesos regulatorios que se coordinan genéticamente. Este conocimiento se puede emplear para mejorar la resistencia de los cultivos a las inundaciones. En la literatura existe el reporte de las posiciones de 86 ecotipos de *A. thaliana* en el rango de tolerancia a inundación; los ecotipos Cvi-0, Bay-0 e Ita-0 fueron clasificados como sensibles a inundación. Estos 3 ecotipos constituyen valiosos modelos funcionales para probar estrategias biotecnológicas que aumenten la tolerancia al estrés por inundación. Además, su uso estandarizado en pruebas de transformación genética constituirá una alternativa al uso del ecotipo más utilizado para probar este tipo de estrategias, que es Col-0, que ya es de tolerancia media a inundación.

No obstante, para estos tres ecotipos en particular, no se han reportado metodologías de transformación genética detalladas que puedan ser usados de manera rutinaria para probar procesos biotecnológicos moleculares. Por lo tanto, es de suma importancia establecer métodos de transformación genética para ellos.

3. HIPÓTESIS.

Los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* sensibles a la inundación (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) tendrán diferentes susceptibilidades de transformación con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105, GV2260 y GV3101).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Conocer la frecuencia de transformación del protocolo Floral Dip en los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* sensibles a inundación (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0).

4.2. Objetivos específicos.

- a) Analizar la tolerancia a la inundación que tienen los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) reportados como sensibles a la inundación con respecto a Col-0.
- b) Transformar genéticamente a cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105) con el vector binario (plásmido) pCAMBIA1105.1.
- c) Agrotransformar los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* Cvi-0, Bay-0, Ita-0 (sensibles a inundación) mediante el método Floral Dip.
- d) Determinar la frecuencia de transformación que tendrán los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) sensibles a inundación con 3 cepas distintas de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105) con respecto a Col-0.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

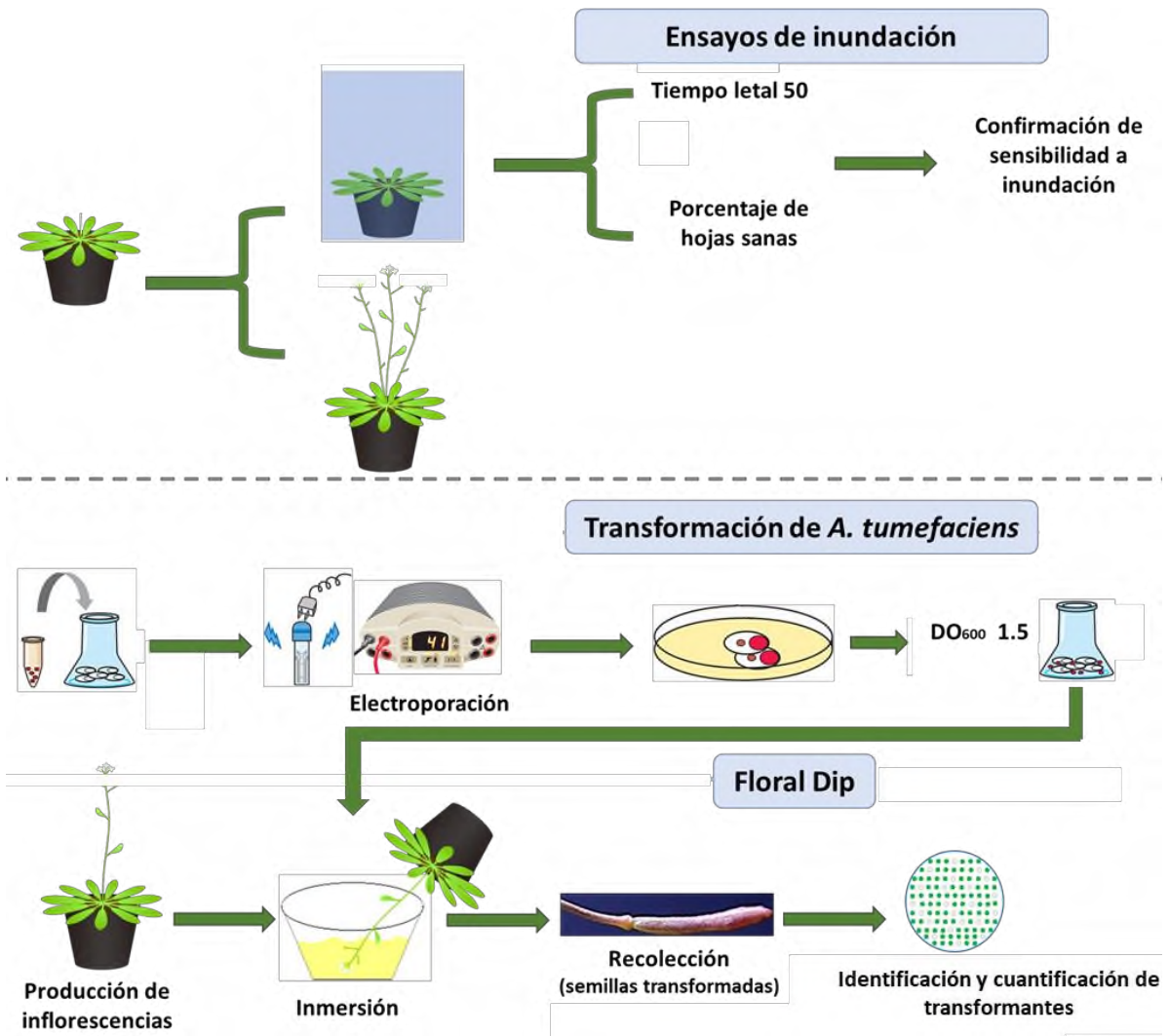


Figura 5: Estrategia experimental.

6. METODOLOGÍA

6.1. Material biológico

Las semillas de *A. thaliana* (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) se obtuvieron del Centro de recursos biológicos de *Arabidopsis* (ABRC) con número de catálogo CS76789, CS78406 y CS28363, respectivamente. Las cepas de *A. tumefaciens* (GV2260, GV3101 y EHA105) fueron donadas por la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El vector binario (plásmido) pCAMBIA1105.1 fue donado por el Dr. Edgar García López del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec.

El vector binario pCAMBIA1105.1 (Figura 6) les confiere a las bacterias (*E. coli* y *A. tumefaciens*) transformadas, resistencia a espectinomicina y estreptomycin; el T-ADN les confiere a las células vegetales transformantes resistencia a higromicina.

6.1.1. Desinfección y condiciones de crecimiento para semillas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas se desinfectaron con un lavado de etanol al 70% durante 5 minutos, seguido de otro con hipoclorito de sodio al 50% por 2 minutos. Posteriormente las semillas se enjugaron rápidamente 5 veces con agua destilada estéril. Las semillas se incubaron por 7 días a 4° C para sincronizar el proceso de dormancia y germinación.

Después de la incubación se plaquearon ~30 semillas por cada caja Petri en 40 mL de medio MS 0.5X (sacarosa 1%, sales Murashige-Skoog 0.5X, pH 5.7, agar 1%). Las semillas *A. thaliana* utilizadas para los ensayos de inundación se colocaron verticalmente bajo fotoperiodo corto (8h luz/16h oscuridad) por 10 días para retrasar la floración. Las semillas *A. thaliana* utilizadas para el Floral Dip se colocaron horizontalmente bajo fotoperiodo largo (16h luz/8h oscuridad) por 7 días para estimular la floración. La incubación de las semillas de *A. thaliana* para ambos experimentos fue a 23°C, con una humedad relativa del 60% bajo régimen lumínico de 150 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

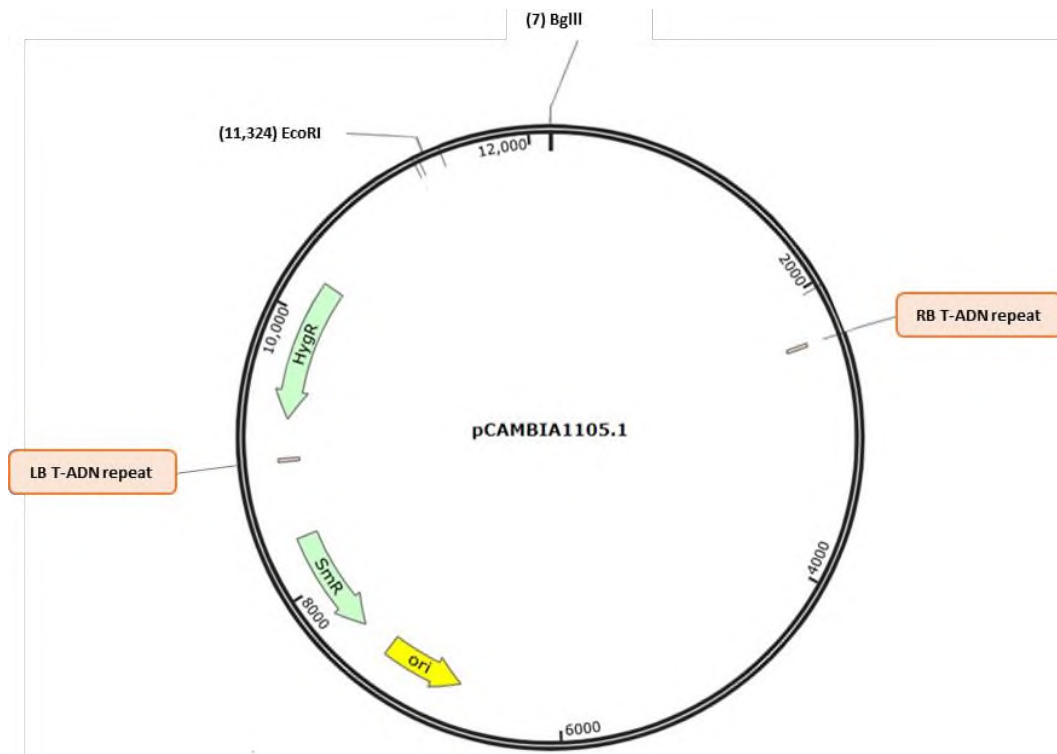


Figura 6: Plásmido pCAMBIA1105.1. Solo se muestran los componentes más relevantes para este trabajo. Abreviaturas: LB T-ADN repeat (Borde izquierdo), RB T-ADN repeat (Borde derecho), SmR (Gen que codifica aminoglucósido adeniltransferasa que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomicina), HygR (Gen que condifica higromicina B fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina), ori (Origen de replicación), EcoR/BglIII (Indican sitios de restricción en el plásmido). Los bordes izquierdo y derecho flanquean al T-ADN. El vector binario utilizado tiene una longitud de 13283 pb ya que este plásmido tiene integrado un gen de 1146 pb de tamaño.

6.2. Ensayos de inundación

Para comprobar la tolerancia del estrés por inundación en oscuridad que tienen los ecotipos de *A. thaliana* Cvi-0, Bay-0, Ita-0 (sensibles a inundación) y Col-0 (tolerancia media a inundación) reportados por Vashisht, et al., 2011 se realizaron pruebas de inundación de la siguiente forma.

Se desinfectaron semillas de *A. thaliana* por ecotipo (Bay-0, Col-0, Cvi-0 e Ita-0) y se plaquearon en cajas Petri con medio MS, tal como se describió en el apartado 6.1.1., para luego trasplantar las plántulas a una mezcla Sunshine #3 – perlita 3:1 previamente esterilizada (121°C y 275 Kpa por 60 min) y adicionada con fertilizante NPK 12:12:17 (Nitrofoska) al 3% p/p.

Para todos los ensayos, las macetas se rotularon (ecotipo y fecha de siembra), se les colocaron piedras al fondo para evitar su flotación y se llenaron con sustrato al tope. Se trasplantaron 4 plántulas de *A. thaliana* por maceta, las plántulas permanecieron en condiciones controladas en

el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan (23°C, con una humedad relativa del 60% bajo régimen lumínico de 150 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo corto 8h luz/16h oscuridad y un régimen de riego de cada dos días) durante 2 semanas hasta su utilización en los ensayos de inundación.

Un día antes del comienzo del ensayo de inundación se colocó una cama de arena en todas las macetas requeridas, por encima del sustrato para evitar que flotara. Se seleccionaron 3 macetas homogéneas por cada ecotipo por cada día de colecta para sumersión completa en oscuridad, 2 macetas homogéneas por cada ecotipo por cada día de colecta para control de oscuridad y 3 macetas por ecotipo para control de luz. Las macetas que se destinaron para sumersión completa en oscuridad se colocaron de manera aleatoria (para lo cual a cada maceta se le asignó un número, del 1 hasta agotar las macetas, posteriormente se utilizó el programa Excel 2013 para generar números aleatorios que corresponden a las posiciones de las macetas en las tinas) en tinas de 45 cm de alto que se llenaron con agua de la llave filtrada por filtros Hydronet (Rotoplas) un día antes del inicio del ensayo. Una vez llenas las tinas las macetas se sumergieron lentamente.

Las macetas que se destinaron para el control de oscuridad se colocaron en tinas iguales sin agua en el mismo cuarto de crecimiento. El rescate del estrés tuvo lugar en puntos de tiempo predeterminados (que se indica en las secciones correspondientes) mediante la extracción de 3 macetas por punto de tiempo por ecotipo (inundadas y controles). Las macetas se ordenaron en charolas y crecieron lado a lado con sus controles; la recuperación de las plantas fue en el cuarto de cultivo con las condiciones previamente descritas.

Se realizaron 3 ensayos de inundación. El primero determinó el tiempo de estrés donde se observaron cambios fisiológicos determinantes en un rango de 1- 12 días de estrés. El segundo y tercer ensayo se realizó con 1-6 días de estrés.

6.2.1. Datos fisiológicos

Para analizar los efectos de la inundación sobre la respuesta fisiológica de *A. thaliana*, se registró el número de hojas totales, hojas afectadas (necrosis, clorosis) y hojas sanas para generar un índice de daño, el cual se determinó calculando el número total de hojas por individuo/ecotipo antes y después de 0 y 6 días de recuperación posteriores al estrés por inundación (indicado en secciones correspondientes), posteriormente se cuantificó el porcentaje de hojas sanas,

cloróticas y necróticas, finalmente se realizó un promedio total de los respectivos porcentajes (hojas sanas, necrosis y clorosis). Se realizaron comparaciones entre Col-0 vs Bay-0, Cvi-0 o Ita-0 con el mismo tipo de media mediante pruebas t de student ($p < 0.05$) para determinar si existían diferencias significativas, antes del estrés por inundación, así como para 0 y 6 días después del estrés por inundación.

Así mismo se determinó el porcentaje de supervivencia para generar el tiempo letal 50 (<http://ic50.tk>). Se tomaron datos fisiológicos un día antes del ensayo de inundación, al finalizar el ensayo, y seis y doce días después. Las macetas se fotografiaron cada uno de los días en los que se tomaron los datos.

6.3. Clonación del vector binario pCAMBIA1105.1 en *Escherichia coli* One shot Top 10

El vector binario pCAMBIA1101.5 se clonó en *E. coli* One shot Top 10 (Thermo Scientific, cat. K240020) por medio de un choque térmico, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se descongeló en hielo un vial de 50 μL de células químicamente competentes One Shot, pues estaba almacenado a -80°C . Posteriormente se agregó el vector binario pCAMBIA1105.1 (3 μL , 25 ng) directamente en el vial y se mezcló golpeándolo suavemente, el vial se incubó en hielo por 30 minutos y luego se aplicó un choque térmico a 42°C por exactamente 30. Al terminar se colocó inmediatamente en hielo por 2 minutos. De manera aséptica se añadieron 250 μL de medio SOC y se incubó de manera horizontal a 37°C a 225 rpm por 1 h. Finalmente se distribuyó un volumen de 20 μL en placas de agar LB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espectinomicina (a partir de un stock de 100000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El contenido agregado se esparció con un asa de vidrio, y las cajas de Petri se incubaron toda la noche a 37°C . Las colonias que crecieron se analizaron como se describe en la siguiente sección.

6.3.1. Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* mediante lisis alcalina

Se seleccionaron clonas transformadas, se pasaron a cajas nuevas de agar LB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ espectinomicina y se incubaron a 37°C por 24 h.

Las clonas que crecieron en las cajas con espectinomicina fueron inoculadas por separado en 5 mL de caldo LB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espectinomicina y se incubó a 37°C , 180 rpm, por 24 h, para generar células y así extraer el plásmido. Cada clona se recuperó en un único microtubo mediante centrifugaciones secuenciales a 12000 rpm por 2 minutos hasta agotar el contenido del tubo,

desechando el sobrenadante, obteniendo así el sedimento de bacterias. El paquete bacteriano se resuspendió (agitando con vórtex) en 100 μ L de solución alcalina de lisis I (Anexo 1). En seguida se agregaron 200 μ L de solución de lisis alcalina II (Anexo 1) y la solución se mezcló manualmente invirtiendo el contenido 10 veces. Finalmente se agregaron 150 μ L de solución alcalina III (Anexo 1). La solución se mezcló manualmente invirtiendo el contenido varias veces. Luego los microtubos se incubaron en hielo durante 5 minutos.

La mezcla del lisado bacteriano se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos a 4° C y el sobrenadante se recuperó en nuevos microtubos, posteriormente se agregaron 450 μ L de Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se mezclaron las fases que se formaron mediante agitación con vórtex. La emulsión se centrifugó a 12000 rpm por 2 minutos a 4° C y la fase acuosa se recuperó en un nuevo microtubo. Los ácidos nucleicos se precipitaron de esta fase agregando 1 mL de etanol (grado molecular) a temperatura ambiente, la mezcla se homogeneizó con ayuda del vórtex y se dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos se recuperaron mediante centrifugación a 12000 rpm por 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se desechó teniendo cuidado que el pellet no se removiera. Se agregó 1ml de etanol (grado molecular) al 70% al pellet y se mezcló varias veces mediante inversión, el ADN se recuperó mediante centrifugación a 12000 rpm por 2 minutos a 4° C, el sobrenadante se eliminó completamente por decantación y se retiró cualquier gota de etanol dejando secar los tubos a temperatura ambiente por ~10-15 minutos.

Cuando el pellet estuvo completamente seco, se agregaron 30 μ L de agua libre de nucleasas y se añadió 1 μ L de RNAsa (10mg/mL). Posteriormente el microtubo con la mezcla se incubó a 37° C por 30 minutos, y se midió la concentración y pureza del ADN plasmídico utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

6.3.2. Digestión del vector binario pCAMBIA1105.1

Para la confirmación del vector binario pCAMBIA1105.1, se realizó una reacción de digestión doble con las enzimas de restricción EcoRI (Promega, cat. R6011) y BglII (ThermoScientific, cat. ER0081), que se eligieron debido a que el vector posee sitios de corte en su secuencia para dichas enzimas, esperando obtener patrones de bandeo característicos.

Se prepararon diluciones de 20 μL por cada muestra ADN plasmídico para obtener una concentración de $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. En microtubos se realizaron reacciones de digestión doble por cada clona a analizar, bajo las siguientes condiciones: 6 μL de agua libre de nucleasas, 2 μL de buffer 10x O, 1 μL (10 U) de enzima BglII, 1 μL (12 U) de enzima EcoRI y 10 μL del ADN plasmídico diluido; inmediatamente se incubó la mezcla durante 1 h a 37° C.

La digestión se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se cargaron los 20 μL de la reacción más 4 μL de buffer 6X en un gel de agarosa 1% (p/v). Se utilizó como amortiguador de corrida TAE 1X (Anexo 2). Las muestras fueron corridas a voltaje constante de 100 V, de 30 a 40 minutos. Al término de la electroforesis, el gel se reveló con una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente se realizaron lavados con agua destilada, y finalmente el gel fue observado en un fotodocumentador (Syngene Ingenius LHR) mediante el programa GeneSnap.

6.3.3. Purificación del vector binario pCAMBIA1105.1

Para realizar la transformación de las cepas de *A. tumefaciens* se requirió que el plásmido tuviera una alta pureza, por lo que se realizó una segunda extracción de ADN plasmídico de las clonas previamente confirmadas, se utilizó el kit de extracción QIAprep Spin Miniprep Kit (50) (QIAGEN, cat. 27104). Se inocularon 5 mL de medio líquido LB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espectinomicina con las clonas de *E. coli* confirmadas, el medio se incubó toda la noche a 28° C a 180 rpm, las células se recuperaron por centrifugación a 8000 rpm por 3 minutos. El sedimento de células se resuspendió en 250 μL de buffer P1 en un microtubo de 1.5 mL y se mezcló con el vórtex hasta que las células se resuspendieron completamente en el buffer. Se añadieron 250 μL del Buffer P2 y se mezcló invirtiendo suavemente el tubo varias veces, cuidando de no dejar que la reacción excediera más de 5 minutos.

Se añadieron 350 μL del buffer N3 e inmediatamente se mezcló invirtiendo el tubo 6 veces. La suspensión se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se aplicaron 800 μL del sobrenadante a una columna de Qiaprep 2.0, se centrifugó por 60 s y se descartó el sobrenadante. Se lavó la columna con 500 μL de Buffer PB y se centrifugó 60 s, descartando el eluato. Se añadieron 750 μL de Buffer PE y se centrifugó por 1 minuto. Se descartó el eluato y se realizó una centrifugación adicional por 1 minuto para remover el buffer residual. Por último, se colocaron las columnas en un tubo limpio de microcentrífuga y para eluir del ADN se añadieron 50 μL de buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5), se dejó reposar por 1 minuto y se centrifugó por 1 minuto.

Finalmente se midieron las concentraciones en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y se realizaron alícuotas del ADN plasmídico para su posterior utilización.

6.4. Resistencia natural de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105) a estreptomomicina y espectinomomicina

Previo al proceso transformación de *A. tumefaciens*, se probó la posible resistencia natural de las cepas frente a los antibióticos (estreptomomicina 100 µg/mL y espectinomomicina 50 µg/mL) que funcionan como marcadores de selección. Para ello, se inocularon las cepas en cajas de agar LB + antibiótico tal como se muestra en la tabla 2, las cajas se incubaron a 28 °C por 24 horas.

Tabla 2: Ensayo para probar la resistencia natural de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

Cepa de <i>A. tumefaciens</i>	Espectinomomicina (50 µg/mL)	Estreptomomicina (100 µg/mL)	Sin antibiótico
GV3101	2 Cajas	2 Cajas	2 Cajas
GV2260	2 Cajas	2 Cajas	2 Cajas
EHA105	2 Cajas	2 Cajas	2 Cajas

6.5. Transformación de cepas *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105) con el vector binario pCAMBIA1105.1

6.5.1. Preparación de células electrocompetentes

Se inocularon 5 mL de medio líquido LB por cada cepa de *A. tumefaciens* utilizada, el medio se incubó por 24 h a 28° C a 180 rpm. Posteriormente se inocularon 25 mL de medio líquido LB (por cada cepa utilizada) con el medio anteriormente preparado, el medio se incubó a 28° C, a 180 rpm y se monitoreo la densidad óptica mediante espectrofotometría (UNICO Spectrophotometer UV2150) hasta 0.5 - 0.7 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica, el medio se vació en tubos cónicos estériles de 15 mL, que fueron enfriados en hielo durante 30 minutos. Posteriormente el medio se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos a 4° C, desechando el sobrenadante hasta agotar el contenido del matraz. El paquete celular se resuspendió en 15 mL de agua desionizada, estéril y fría y se realizó una segunda centrifugación (5000 rpm, 20 min. y 4° C) el sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 7.5 mL con agua desionizada, estéril y fría y se centrifugó una tercera vez (5000 rpm, 20 min. y 4° C). El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1.5 mL de glicerol frío al 70%, y

se centrifugó una cuarta vez (5000 rpm, 20 min. y 4° C). El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 150 µL de glicerol frío al 10%. Finalmente se hicieron alícuotas de 40 µL en microtubos estériles, mismas que se almacenaron a -80° C.

6.5.2. Electroporación de células electrocompetentes

La electroporación se realizó en células electrocompetentes de las 3 cepas de *A. tumefaciens*, con y sin el vector binario pCAMBIA1105.1.

Se adicionaron 2 µL (a una concentración de 50 ng/µL) del vector binario pCAMBIA1105.1 a 48 µL de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*. La mezcla se pasó a una cubeta de electroporación de 0.1 mm de espesor previamente enfriada a 4°C. Las células se transformaron por electroporación con las siguientes condiciones: 4.8-5 kV de 5-5.8 ms. (MicroPulser, BIO -Rad). Inmediatamente, las células se resuspendieron en 1 mL de medio LB líquido y se incubaron en agitación a 28°C, 200 rpm, por 3 h. Posteriormente, cajas de agar LB con y sin espectinomicina (SPT) 50 µg/mL, se inocularon con 200 µL de las células previamente electroporadas, como se indica en la tabla 3. Estas cajas se incubaron en oscuridad a 28° C por 48 horas.

Tabla 3: Electroporación de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.

	Cepa EHA105		Cepa GV2260		Cepa GV3101	
	S/antibiótico	SPT	S/antibiótico	SPT	S/antibiótico	SPT
S/Vector binario	1 caja	---	1 caja	---	1 caja	---
pCAMBIA1105.1	2 cajas	2 cajas	2 cajas	2 cajas	2 cajas	2 cajas

Se seleccionaron las clonas transformadas, se pasaron a cajas nuevas de agar LB + 50 µg/mL de espectinomicina y se incubaron a 28°C por 48 h. en oscuridad para la confirmación de la transformación mediante extracción de ADN plasmídico y su digestión con enzimas de restricción.

6.5.3. Extracción de ADN plasmídico de *Agrobacterium tumefaciens* (GV2260, GV3101 y EHA105) mediante lisis alcalina

Se inocularon 10 mL de medio LB líquido + 50 µg/mL de espectinomicina por cada colonia de cada cepa analizada y se incubaron 48 h a 28° C a 180 rpm. La extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo como en el apartado 6.3.1. La concentración y pureza del ADN plasmídico se cuantificó con ayuda del nanodrop.

6.5.4. Digestión del vector binario pCAMBIA1105.1

Para la confirmación del vector binario pCAMBIA1105.1 se realizó una reacción de digestión doble con las enzimas de restricción EcoRI (Promega, cat. R6011) y BglII (ThermoScientific, cat. ER0081), tal como se describe en la sección 6.3.2.

6.6. Diseño experimental para la agrotransformación de ecotipos de *Arabidopsis thaliana* por Floral Dip

Se realizaron 6 tandas de transformaciones (independientes) siguiendo las combinaciones de la figura 7. Se realizó una única tanda de transformación en *A. thaliana* Col-0 utilizando las 3 cepas de *A. tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105).

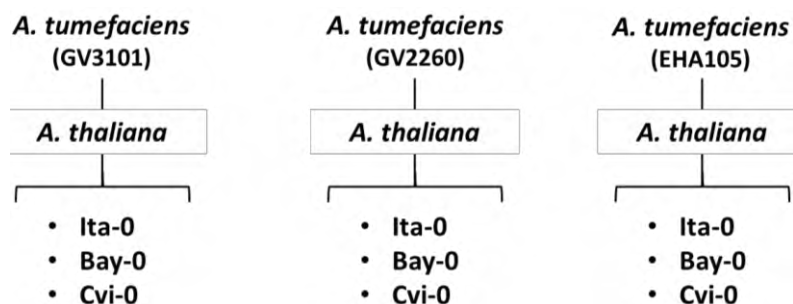


Figura 7: Combinación de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

6.7. Siembra de ecotipos para su agrotransformación mediante Floral Dip

Las semillas de *A. thaliana* (Bay-0, Col, Cvi-0 e Ita-0) se desinfectaron, incubaron y germinaron según el apartado 6.1.1. para luego trasplantar las plántulas a un sustrato sólido según el apartado 6.2. Se colocaron ~8 plántulas por maceta y se cultivaron en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Papaloapan (23°C, con una humedad relativa del 60% bajo régimen lumínico de 150 $\mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fotoperiodo largo 16h luz/8h oscuridad y un régimen de riego cada dos días) durante ~ 4 semanas hasta que las inflorescencias estuvieron listas. Para aumentar el número de inflorescencias se cortó la inflorescencia primaria al finalizar la 3er semana; esto produjo un mayor número de inflorescencias secundarias. El tratamiento de las plantas con la suspensión de *Agrobacterium* se realizó 8 días después de cortar la inflorescencia primaria mediante el método del Floral Dip.

6.7.1. Preparación de las suspensiones de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105), sacarosa y Silwet L-77

Se prepararon 3 tubos (uno por cada cepa) con 5 mL de medio líquido LB + 50 µg/mL de espectinomicina y éstos se inocularon con las cepas transformadas de *A. tumefaciens*; los tubos se incubaron en oscuridad a 28°C durante 48 h y 180 rpm. Se prepararon 3 matraces (uno por cada cepa) con 500 mL de medio líquido LB con espectinomicina, éstos se inocularon con los 5 mL del cultivo obtenido previamente. El medio se incubó en oscuridad a 28°C por ~36 h, durante las cuales se realizó el monitoreo de la densidad óptica a 600nm hasta que se encontró entre 1.5 y 2.0.

Después de haber alcanzado la densidad óptica, el medio se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió suavemente en 500 mL de una solución de sacarosa al 5% (peso/volumen) que se preparó al momento. A esta solución se agregó Silwet L-77 a una concentración de 0.02%, y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

6.7.2. Inmersión floral

Las inflorescencias de los ecotipos de *A. thaliana* se sumergieron durante 10 segundos con agitación suave en la suspensión de células de *A. tumefaciens*-sacarosa-Silwet L-77. Posteriormente se drenó el exceso durante ~5 segundos. Las plantas tratadas con la suspensión se envolvieron con una película de plástico (para mantener una humedad alta), y se colocaron horizontalmente durante 24 h. Pasado este tiempo se retiró la película y las plantas se llevaron nuevamente a la cámara de crecimiento bajo las condiciones descritas en el apartado 6.1.2. Cuando las silicuas se volvieron marrones se procedió a cosechar las semillas.

6.7.3. Evaluación de la susceptibilidad a higromicina y cefotaxima en *Arabidopsis thaliana*

Se determinó la sensibilidad de los ecotipos silvestres (Wt) Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0 de *A. thaliana* frente a higromicina mediante un ensayo en el que se evaluaron 4 concentraciones 25, 50, 100 y 150 µg/mL (Figura 8A). Así mismo se realizó un ensayo para determinar la sensibilidad o resistencia de los 4 ecotipos silvestres de *A. thaliana* frente a cefotaxima (antibiótico requerido para eliminar *A. tumefaciens* remanente), empleando 100 y 400 µg/mL (Figura 8A). En un ensayo posterior se evaluaron las mismas concentraciones de higromicina (25, 50, 100 y 150 µg/mL) para

determinar cuál ejercía una mejor presión de selección sobre las semillas candidatas transformadas de Col-0 con las 3 cepas de *A. tumefaciens* (Figura 8B).

Todas las semillas se desinfectaron e incubaron según el apartado 6.1.1. Una vez finalizado el periodo de incubación las semillas se plaquearon en cajas Petri con medio MS con los antibióticos y concentraciones correspondientes siguiendo los diseños de la figura 8, las cajas se colocaron verticalmente bajo fotoperiodo largo (16 h luz/8 h oscuridad), el crecimiento de las semillas empleadas para el ensayo de susceptibilidad a antibióticos se monitoreo por 8 días, el crecimiento de las semillas empleadas para evaluar la presión de selección se monitoreo por 13 días.

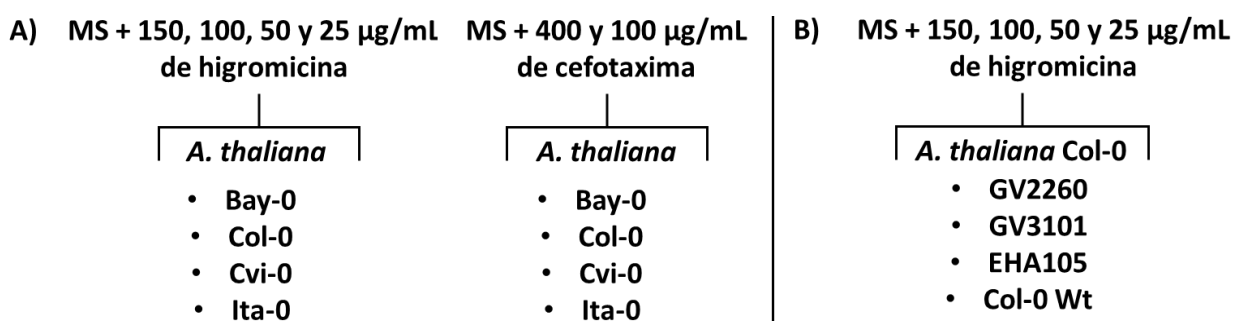


Figura 8: Concentraciones de antibióticos. A) Ecotipos silvestres plaqueados en higromicina o cefotaxima. B) Ecotipo Col-0 silvestre (Wt) y Col-0 transformado con las 3 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* plaqueados en higromicina.

6.7.4. Escrutinio de transformantes primarios

Se desinfectaron ~3000 semillas, repartidas en microtubos de 1.5 mL con ~1000 semillas cada uno para las combinaciones de los ecotipos Bay-0 e Ita-0 con cada cepa por cada tanda de transformación, para las combinaciones del ecotipo Cvi-0 con cada cepa se desinfectaron ~1500 semillas, repartidas en microtubos de 1.5 mL con ~500 semillas cada uno, para cada tanda de transformación (el número de semillas se estimó pesándolas, 20 mg de semillas son aproximadamente 1000 semillas según Oltmanns, *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2020) y se incubaron según el apartado 6.1.1. Una vez finalizado el periodo de incubación, las semillas de cada microtubo se plaquearon en cajas Petri individuales con medio MS suplementado con 25 µg/mL de higromicina y 50 µg/mL de cefotaxima (Combinación y concentraciones determinadas con base en los resultados indicados en secciones correspondientes). Las cajas Petri se colocaron horizontalmente bajo fotoperiodo largo (16 h luz/8 h oscuridad) durante 13 días. Se puntuaron

como transformantes a las plántulas que tenían hojas verdes y raíces bien establecidas en el medio selectivo.

Se determinó la susceptibilidad de los ecotipos de *A. thaliana* (Cvi-0, Bay-0 e Ita-0) a la transformación con las 3 cepas de *A. tumefaciens*, calculando las frecuencias de transformación de cada combinación para cada tanda de transformación; éstas se calcularon como sigue: (número de plantas resistentes a higromicina / número de plántulas germinadas) x 100. Se realizó un análisis para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de transformación obtenidas, mediante un ANOVA de una vía con un nivel de significancia de 0.05 y una posterior prueba Tukey.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. Tolerancia al estrés por inundación en ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Bay-0, Col-0, Cvi-0 e Ita-0)

Primero se analizaron los resultados de la escala de tolerancia a inundación de 86 ecotipos de *A. thaliana* reportada por Vashisht, *et al.*, 2011 (Anexo 3) y se seleccionaron los ecotipos Bay-0, Cvi-0 e Ita-0 por estar dentro del rango más bajo de tolerancia a inundación, lo cual los hace modelos funcionales para probar futuras estrategias biotecnológicas que aumenten su tolerancia a inundación. El ecotipo Col-0 (de tolerancia media) se seleccionó para funcionar como punto de referencia de tolerancia a inundación.

Para verificar la tolerancia al estrés previamente reportada, pero en nuestras condiciones experimentales, se hicieron experimentos de inundación. En el primer ensayo se usaron 4 de los tiempos reportados por Vashisht, *et al.*, 2011 que son de 3, 6, 9 y 12 días de estrés.

Los principales cambios fisiológicos debidos al estrés que se observaron en los ecotipos de *A. thaliana* se manifestaron en las hojas y fueron pérdida de turgencia, clorosis y necrosis (Figura 9). Aun cuando se conservaron partes sanas que mostraban la posibilidad de supervivencia, al tomar datos fisiológicos se observó la muerte de las plantas, después de 6 días de estrés más 6 días de recuperación. De tal forma, se determinó que, si las plantas no presentaban a los 6 días después de la sumersión signos de recuperación (presencia de tejido verde y turgencia), la planta se consideró muerta.

En este ensayo, únicamente se pudieron obtener observaciones fisiológicas de los individuos sumergidos por 3 días para los 4 ecotipos, mientras que para los 6, 9, y 12 días, el estrés fue muy intenso y ninguna planta sobrevivió pasado el lapso de recuperación (Figura 9). Así, el siguiente ensayo se recortó a una duración de 6 días con una colecta diaria. Con estos tiempos, se realizaron 2 ensayos (independientes) de inundación y se tomaron datos fisiológicos de hojas sanas, hojas afectadas (por necrosis y clorosis) y viabilidad de cada individuo.

Se observó que en el primer y segundo día de estrés no se producen afectaciones severas, aún después de 6 y 5 días de recuperación. Sin embargo, los individuos con 3 a 6 días de estrés para los ecotipos Bay-0, Cvi-0 e Ita-0 comenzaron a presentar clorosis y necrosis según aumentaba el tiempo de estrés, el ecotipo Col-0 presentó clorosis y necrosis en menor proporción que los otros ecotipos.

De igual forma se observó que el crecimiento se ve comprometido pues el tamaño de la roseta se ve reducido conforme aumenta el tiempo de estrés (Figura 10).

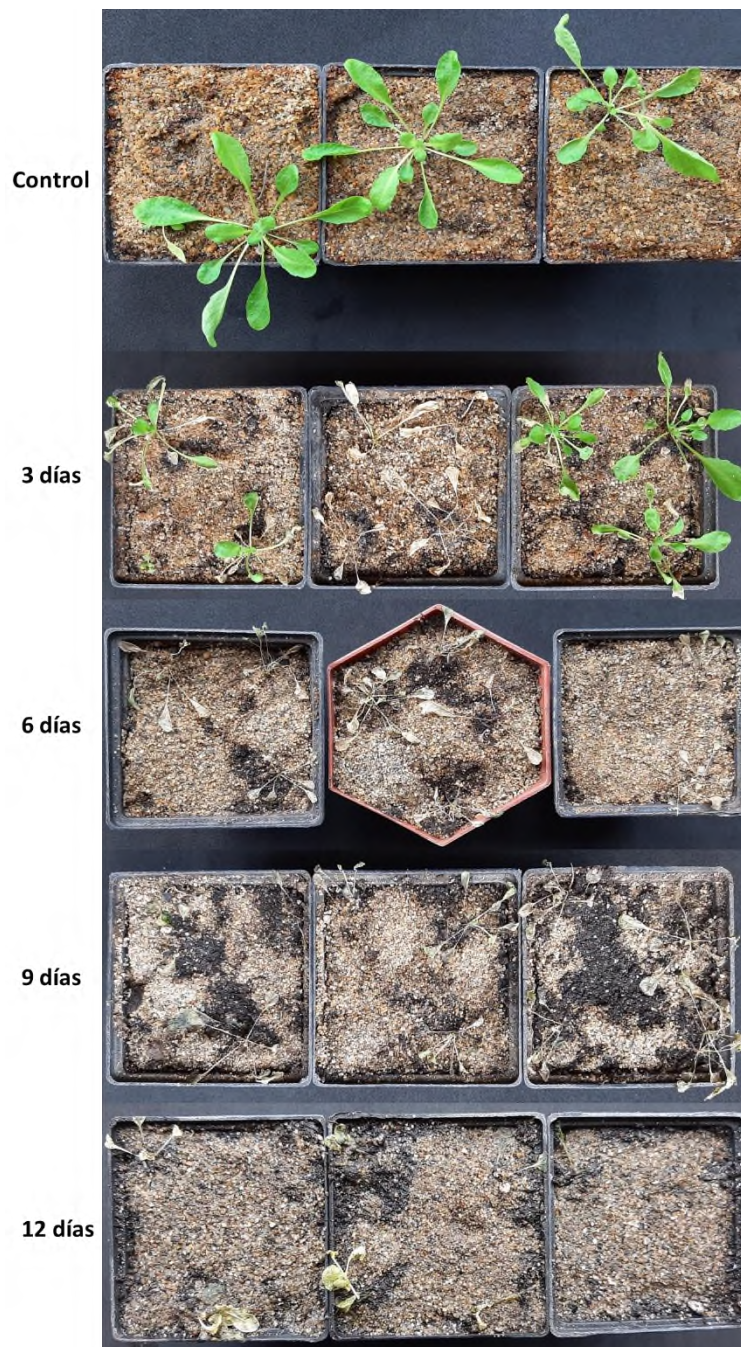


Figura 9: Cambios fisiológicos observados en *Arabidopsis thaliana* Bay-0 sometidas a estrés por inundación. Plantas con 32 días de edad y fotografiadas 6 días después de haberse sometido a sumersión por el tiempo indicado.

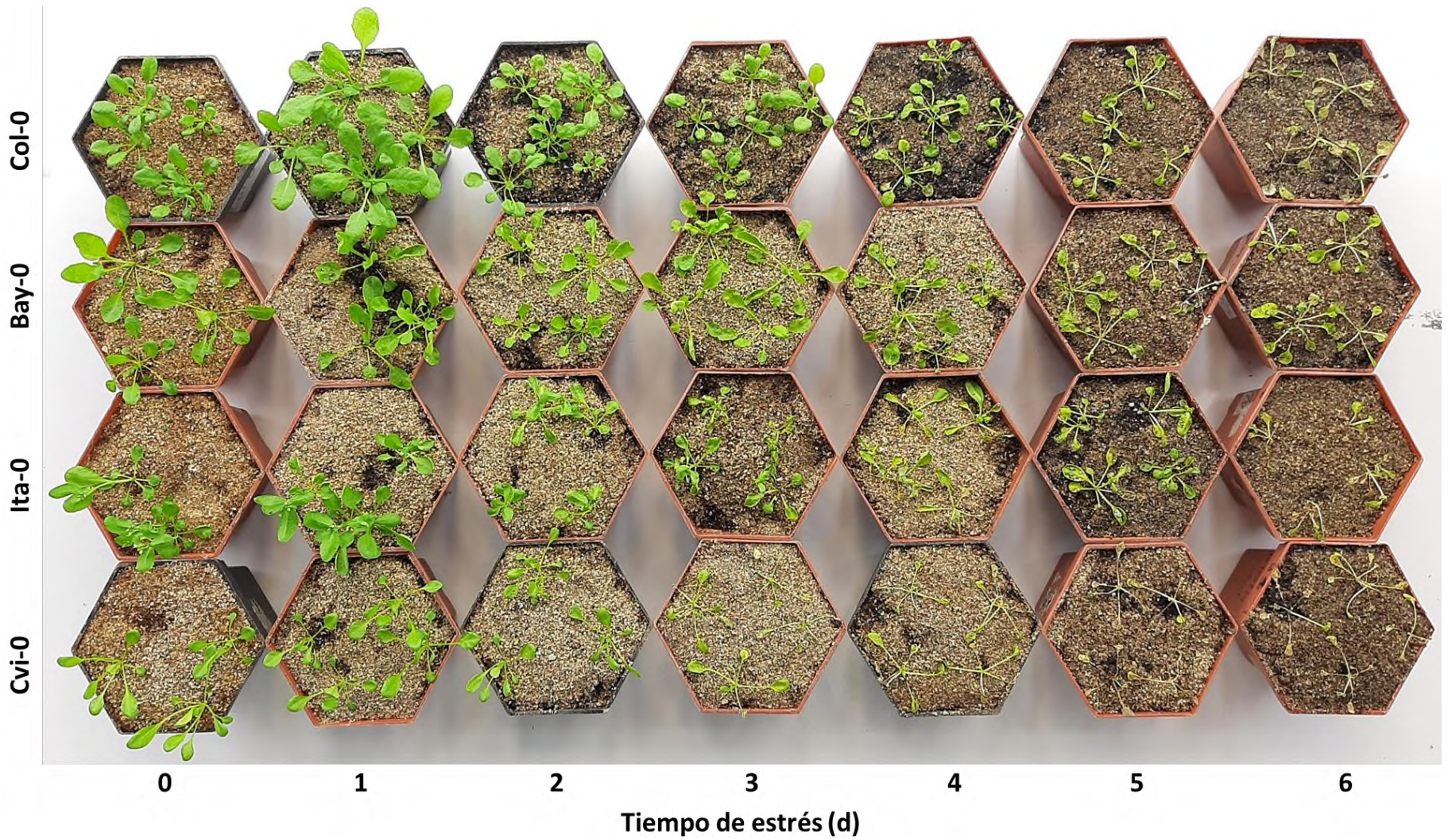


Figura 10: Plantas de cuatro ecotipos de *Arabidopsis thaliana* sometidos a estrés por inundación. Plantas con 23 días de edad y fotografiadas 6 días después de haberse sometido a sumersión por el tiempo indicado.

Para aumentar la evidencia de lo anterior y hacer una disección más fina del estrés por inundación, se adaptó el gráfico de índice de daño de Tsai, *et al.*, 2016 por lo que se cuantificaron las hojas dañadas por necrosis y clorosis, así como las hojas sanas por individuo y días de estrés. Se observó que el daño que presentan las plantas varió según el tiempo, por ejemplo, en el día 0 de recuperación la clorosis es visible para todos los ecotipos con 3 a 6 días de estrés, mientras que para los individuos con 1 a 2 días de estrés la clorosis es apenas distinguible; la necrosis está presente en todas las colectas y ascendió según aumentó el tiempo de estrés. El daño por clorosis registrado cuando cada colecta cumplió 6 días de recuperación está en menor proporción ya que las plantas se recuperaron o el daño fue tan severo que el tejido se necrosó (Anexo 4).

Se observó que en el primer y segundo día de estrés no se producen afectaciones severas en ningún ecotipo, aún después de 6 días de recuperación mientras que para el tercer día de estrés hay un incremento en el daño en todos los ecotipos, pero hay diferencias de tolerancia entre ellos. Las hojas de los ecotipos Cvi-0 e Ita-0 con 6 días de estrés más 6 días de recuperación presentaron un mayor porcentaje de clorosis y necrosis que los ecotipos Col-0 y Bay-0. Cvi-0 e Ita-0 no mostraron recuperación y se cuantificaron como muertas, los ecotipos Col-0 y Bay-0 no recuperaron el crecimiento foliar después de los 6 días de recuperación, pero, conservaron las suficientes hojas sanas (2.4306% y 4.6875% respectivamente) para continuar con las actividades fisiológicas necesarias para su supervivencia y cuantificarlas como vivas (Figura 11).

Se analizaron los resultados obtenidos del porcentaje de hojas afectadas por necrosis para los días 4, 5 y 6 días de estrés (días en donde se observan mejor las diferencias entre los ecotipos) con 0 y 6 días de recuperación (Figura 11), comparando los ecotipos Bay-0, Cvi-0 o Ita-0 contra Col-0. No se obtuvieron diferencias significativas para los días (4, 5, y 6) de estrés con 0 días de recuperación, por lo que se descartó como parámetro de selección, para los días (4, 5, y 6) de estrés con 6 días de recuperación sí se obtuvo diferencia significativa. El ecotipo Col-0 fue el que presentó el menor porcentaje de necrosis, seguido por Bay-0, Ita-0 y Cvi-0 (Figura 11)

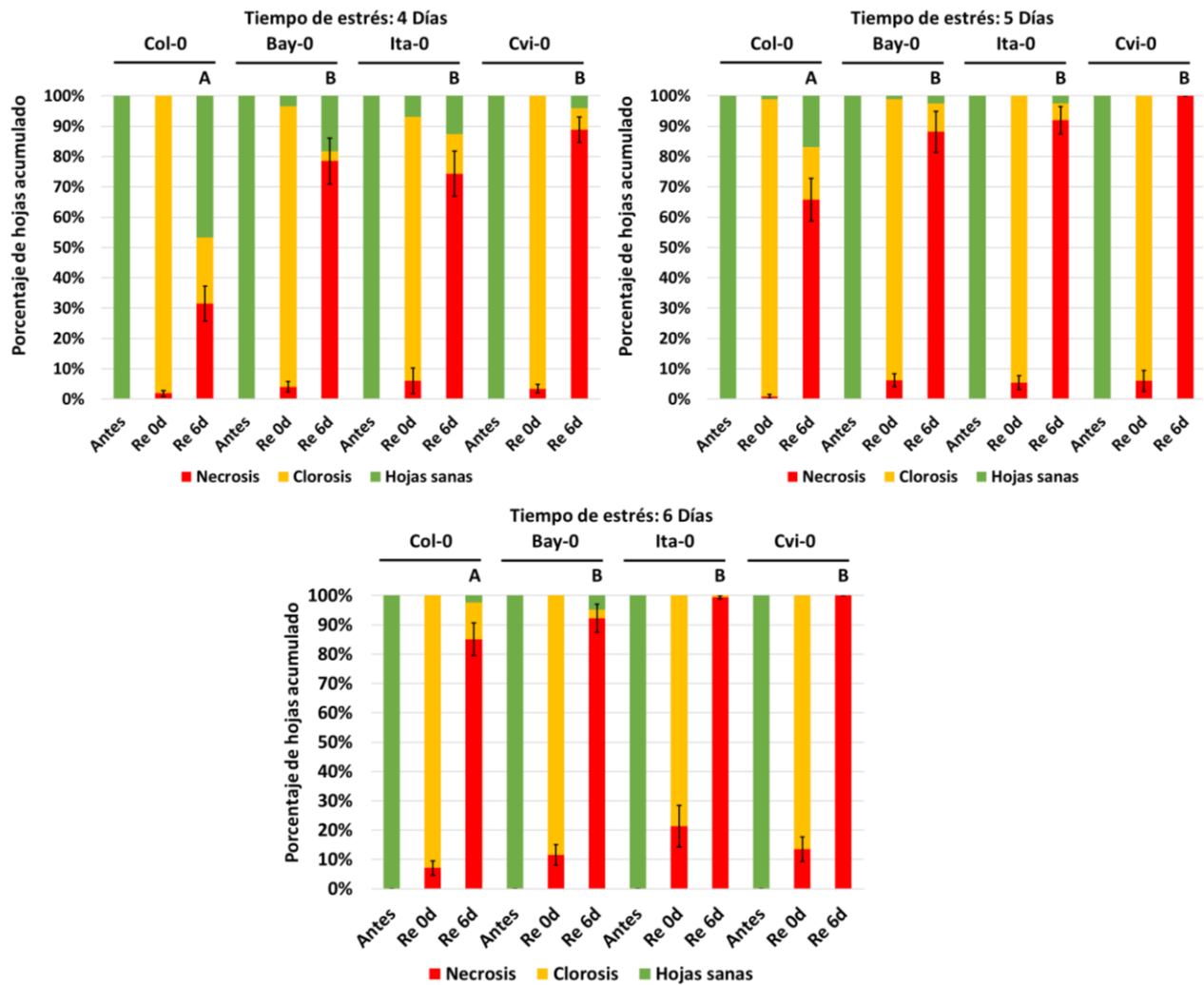


Figura 11: Índice de daño en hojas por ecotipo de *Arabidopsis thaliana* antes y después de 0 y 6 días de recuperación (Re 0 y Re 6) posteriores al estrés por inundación. Datos promedio de 2 experimentos independientes, \pm E.E. Letras diferentes indican diferencias significativas entre ecotipos, prueba t de Student $p < 0.05$. Las comparaciones se hicieron entre Col-0 vs Bay-0, Cvi-0 o Ita-0.

Para determinar la supervivencia de los ecotipos, se tomaron datos del porcentaje de la diferencia entre individuos sobrevivientes con respecto al inicio del estrés de 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 9 días de estrés y después de 6 días de recuperación. Estos resultados mostraron que el ecotipo que tiene menos porcentaje de supervivencia es Cvi-0 (Figura 12).

Para poder determinar las posiciones de los 4 ecotipos de *A. thaliana* en el rango de tolerancia a inundación, se calculó el tiempo letal 50 (LT 50) que indica el tiempo en que el 50% de los individuos de cada ecotipo ha muerto, mediante el servidor ic50.tk. El LT 50 para los ecotipos fue de 3.48 ± 0.15 , 4.50 ± 0.34 , 3.20 ± 0.24 , 3.43 ± 0.24 para los ecotipos Bay-0, Col-0, Cvi-0 e Ita-0, respectivamente (Figura 12).

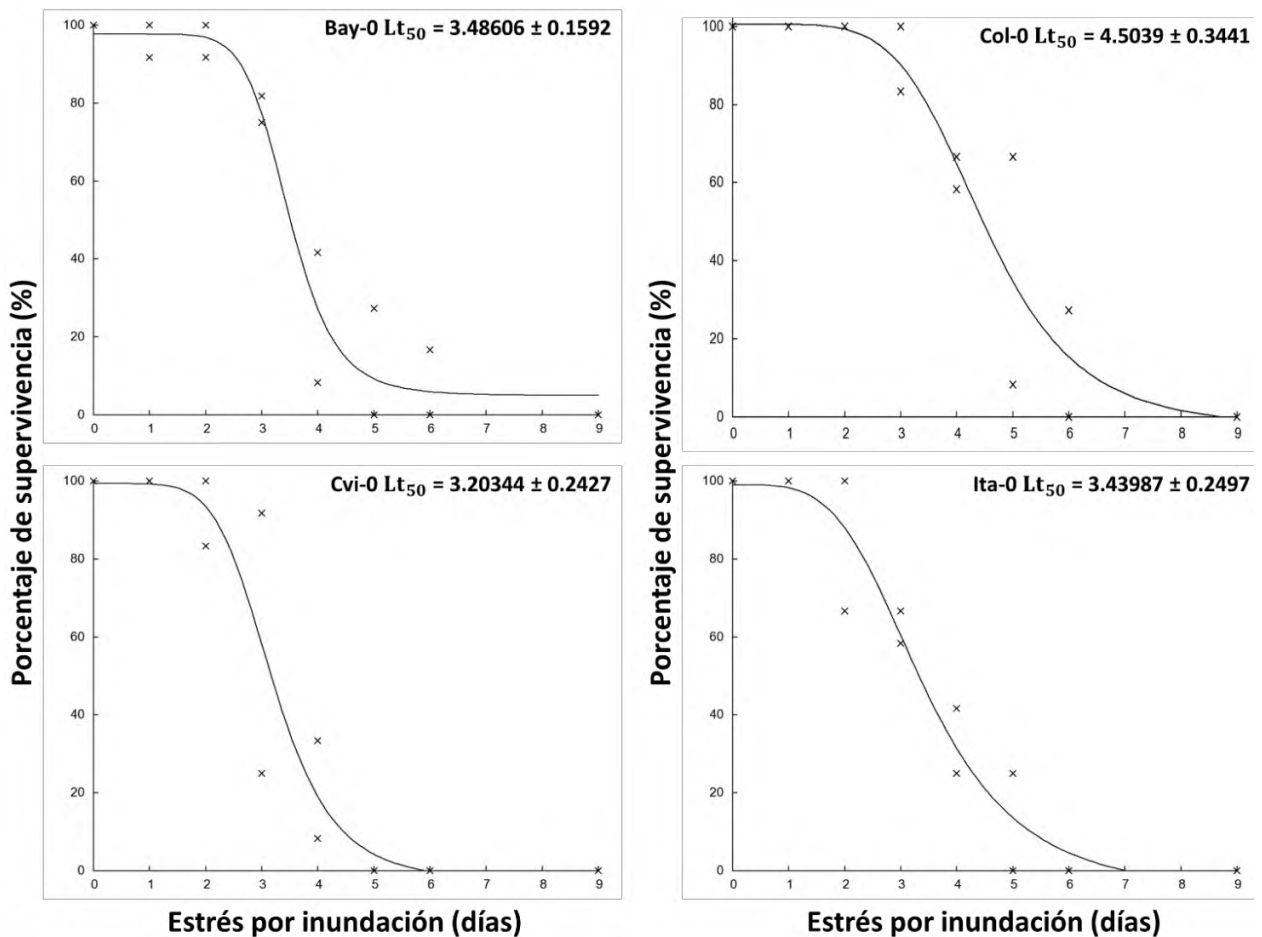


Figura 12: Tiempo letal 50 de los cuatro ecotipos de *Arabidopsis thaliana* en estrés por inundación. Los datos de supervivencia se colectaron a los seis días de recuperación. Se muestran los resultados de 2 experimentos independientes (n=24 plantas).

La observación, así como el porcentaje de hojas dañadas por necrosis y el valor de LT 50 demostraron que el ecotipo Cvi-0 es el más sensible ante el estrés por inundación seguido de Ita-0, Bay-0 y el ecotipo Col-0 es más tolerante de los 4.

La clasificación de los ecotipos Bay-0, Col-0, Cvi0 e Ita-0 realizada por Vashisht, *et al.*, 2011 y apoyada por los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podría estar fundamentada o al

menos relacionada con las condiciones de precipitación, geográficas y climáticas de los lugares de origen de cada ecotipo. La tabla 4 muestra las precipitaciones medias anuales de los lugares de origen de los ecotipos, estos datos son consistentes con las posiciones en el rango de tolerancia a inundación, siendo Col-0 el ecotipo más tolerante a inundación y el que mayor cantidad de precipitación recibe debido a su ubicación natural. Por otra parte, Vashisht, *et al.*, 2011 encontraron una correlación negativa significativa entre los valores de LT 50 y el rango latitudinal de los ecotipos. Por lo tanto, los ecotipos más al norte tienen una mayor tolerancia a la sumersión (Tabla 4).

Tabla 4: Características geográficas de lugares de origen de ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

Ecotipo	Ubicación	Latitud	Temperatura media anual	Precipitación media anual	Referencia
Col-0	Columbia Missouri, Estados Unidos	38°57'	12.56° C	1082.548 mm	https://abrc.osu.edu/stocks/number/CS60000
Bay-0	Bayreuth, Alemania	49°56'53"	8.2° C	724 mm	Foken, T. (2007) Kreklow, <i>et al.</i> , (2020)
Ita-0	Ibel Tazekka, Marruecos	34.034°	--	600 mm	Fahd, <i>et al.</i> , (2015). Instituto Tecnológico de Canarias. (2015)
Cvi-0	Santa Cruz, Santiago, Cabo Verde	15.111°	23.6° C	297.50 mm	Sanz Hueso, C. (2020)

Ortiz-López, 2020 realizó un trabajo en paralelo en el cual analizó y comparó la tolerancia de 3 ecotipos (C24, Lp2-6 y Kin-0) reportados en el rango más alto de tolerancia a inundación vs el ecotipo Col-0 de tolerancia media (Vashisht, *et al.*, 2011), en el que concluyó que los 3 ecotipos analizados son más tolerantes a inundación que el ecotipo Col-0.

Con los datos de TL 50 obtenidos por Ortiz-López, 2020 y los obtenidos en este trabajo de tesis se puede formar una escala de TL 50 con los 6 ecotipos de las posiciones extremas en el rango de tolerancia a inundación y el ecotipo Col-0 de tolerancia media. Al mismo se tiempo compararon los TL 50 de los mismos ecotipos reportados por Vashisht, *et al.*, 2011 (Tabla 5).

Tabla 5: Comparaciones de tiempos letales 50 (TL 50) de 7 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*.

Flores-Méndez, 2020/Ortiz-López, 2020		Vashisht, <i>et al.</i> , 2011	
Ecotipo	TL 50	Ecotipo	TL 50
C24	5.77 ± 0.88 días	C24	11.2 días
Lp2-6	5.48 ± 1.9 días	Lp2-6	10.8 días
Kin-0	4.52 ± 1.69 días	Kin-0	10.4 días
Col-0	4.50 ± 0.34 días	Col-0	8.3 días
Bay-0	3.48 ± 0.15 días	Ita-0	6 días
Ita-0	3.43 ± 0.24 días	Bay-0	5.7 días
Cvi-0	3.20 ± 0.24 días	Cvi-0	4 días

Con la comparación anterior se observó que en el orden de tolerancia a inundación solo varían 2 ecotipos (Bay-0 e Ita-0) de 7, sin embargo, los ecotipos que difieren con lo reportado por vashisht, *et al.*, 2011 singuen estando dentro del rango más bajo de tolerancia a inundación, por lo que de manera global se confirman las tolerancias a inundación de los 7 ecotipos.

7.2. Transformación de *Escherichia coli* One shot Top 10

Para almacenar y comprobar la integridad del vector se realizó la clonación del vector binario pCAMBIA1105.1 en *Escherichia coli* One shot Top 10, mediante la digestión del ADN plasmídico se confirmó la presencia del vector binario pCAMBIA1105.1 en las clonas *E. coli* analizadas, se emplearon EcoRI, y BglII como enzimas de restricción. Dados los sitios de restricción y el tamaño del plásmido (13283 pb) se esperaban 2 bandas de 11317 pb y 1966 pb (Figura 13).

7.3 Resistencia natural de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105) frente a los antibióticos de selección (espectinomicina y estreptomycin).

Para evitar la generación de falsos positivos durante la selección de las clonas se evaluó la resistencia natural que tenían las 3 cepas de *A. tumefaciens* a estreptomycin y espectinomicina antes de realizar la transformación de las cepas. Las 3 cepas de *A. tumefaciens* resultaron tolerantes a estreptomycin por lo cual se descartó como marcador de selección, sin embargo, las 3 cepas de *A. tumefaciens* resultaron sensibles a espectinomicina, por lo cual se eligió como marcador de selección (Figura 14).

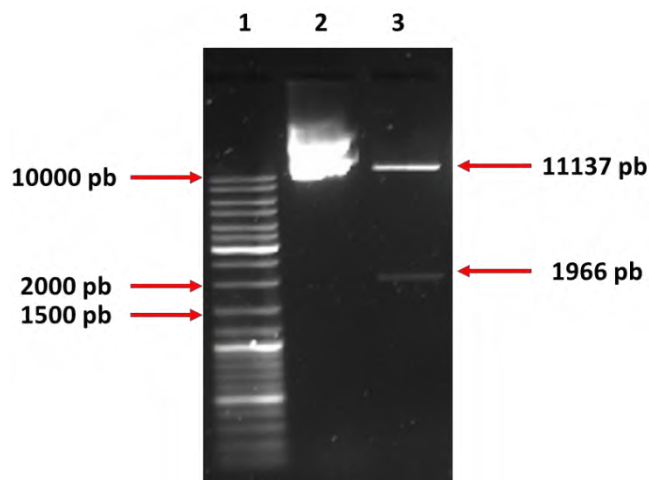


Figura 13: Digestión del plásmido pCambia1105.1 con las enzimas EcoRI y BglII. Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2: Vector binario sin digerir. Carril 3: Vector binario digerido. Se emplearon EcoR I, y Bgl II como enzimas de restricción. Gel de agarosa 1%.

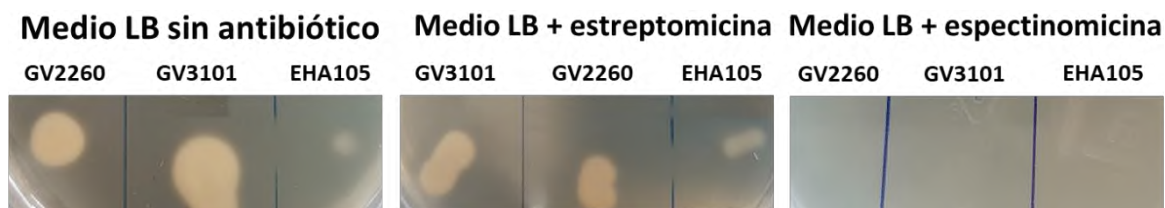


Figura 14: Resistencia natural de *Agrobacterium tumefaciens* frente a antibióticos. Cepas inoculadas en medio LB + 100 µg/mL de estreptomicina, cepas inoculadas en medio LB + 50 µg/mL de espectinomicina.

7.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* (GV2260, GV3101 y EHA105)

Para verificar que las condiciones de electroporación no fueran letales para las células, se emplearon las cepas *A. tumefaciens* electroporadas sin vector binario, estas fueron inoculadas en medio LB sin espectinomicina, las colonias en las placas crecieron de manera óptima con lo que se demostró que las condiciones eran las adecuadas para la electroporación de *A. tumefaciens* (Figura 15).



Figura 15: Cepas electroporadas de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA1105.1 e inoculadas en medio LB sin espectinomicina. El crecimiento de las 3 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fue óptimo después de 48 horas de incubación.

Se inocularon 2 cajas de cajas de agar LB + 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de espectinomicina por cada cepa de *Agrobacterium* electroporada, todas las cepas inoculadas crecieron de manera óptima, lo cual sugiere que fueron transformadas de manera exitosa pues el plásmido les confiere a las bacterias que lo asimilan tolerancia a espectinomicina (Figura 16A/solo se muestra 1 caja por cepa). Se obtuvieron ~ 20 clonas por cada caja de cada cepa electroporada (Figura 16B/solo se muestra 1 caja por cepa), de las cuales se seleccionaron 2 clonas por cepa para la verificación de la transformación.

7.5. Verificación de cepas transformantes de *Agrobacterium tumefaciens*

Mediante la digestión del ADN plasmídico se confirmó la presencia del vector binario pCAMBIA1105.1 en las clonas de *A. tumefaciens* analizadas, empleando a EcoRI, y BglII como enzimas de restricción. El vector tiene un tamaño de 13283 pb y contiene un inserto de 1146 pb. Las enzimas de restricción cortan la sección donde éste se encuentra, por lo que se esperaban 2 bandas de 11317 pb y 1966 pb (Figura 17). Esto corroboró la transformación de las 3 cepas de *A. tumefaciens* que posteriormente se utilizaron para realizar el método Floral Dip en los 4 ecotipos de *A. thaliana*.

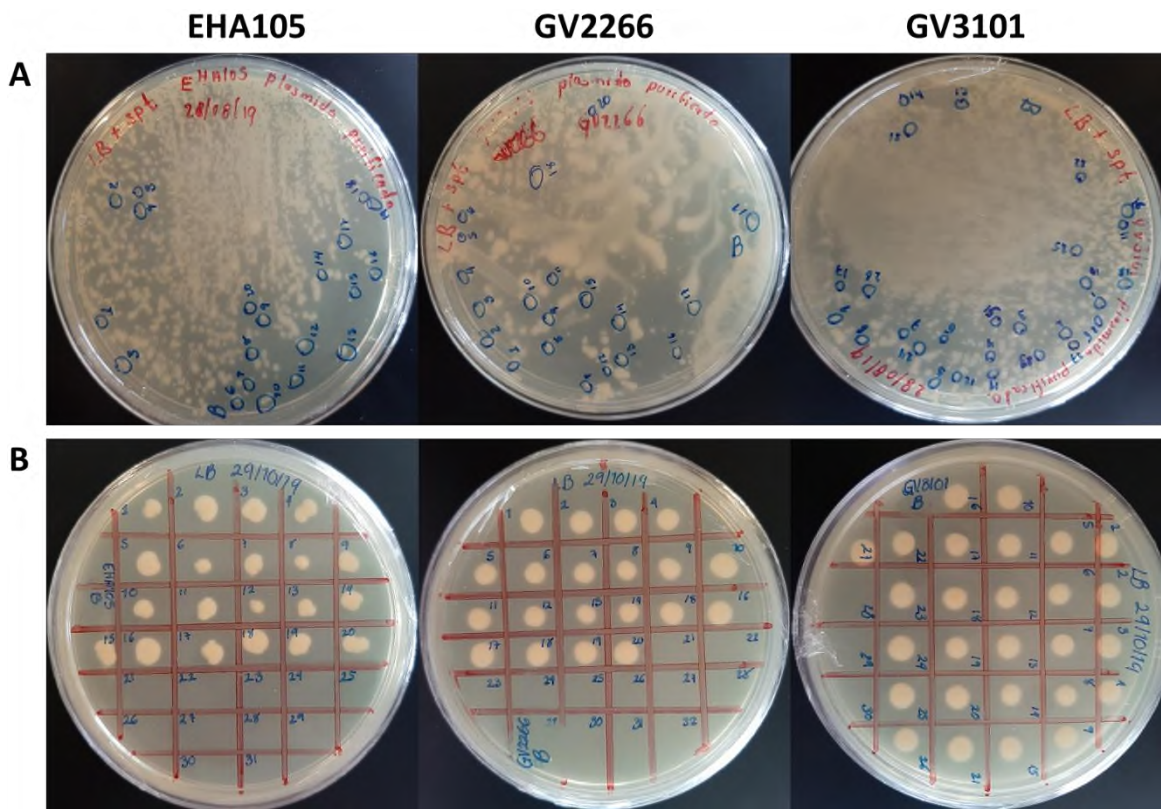


Figura 16: A) Cepas electroporadas de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA1105.1 e inoculadas en medio LB + 50 µg/mL de espectinomicina. B) Clonas de *Agrobacterium tumefaciens* seleccionadas para la verificación de la transformación.

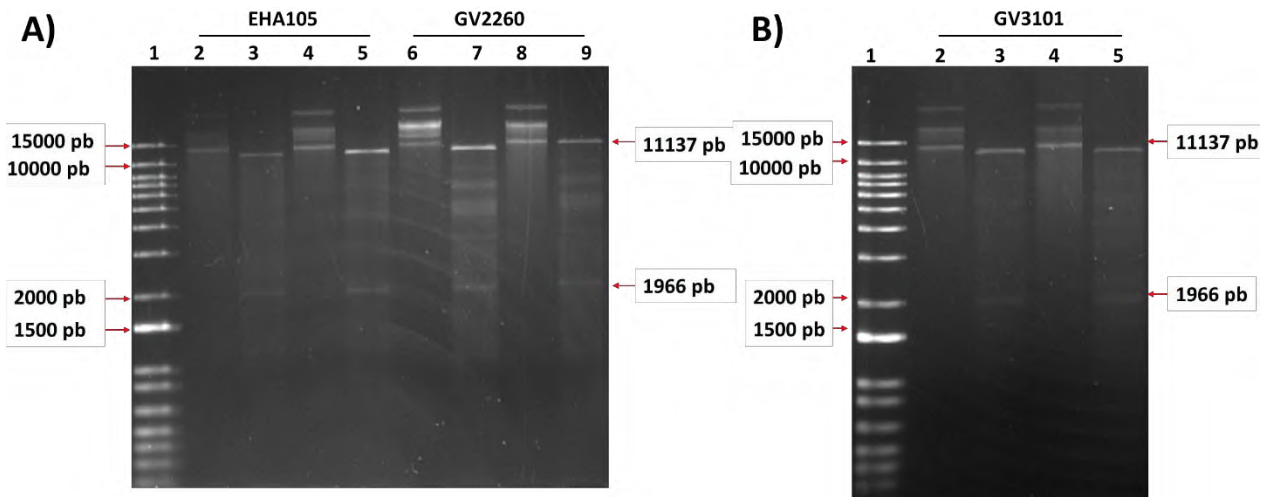


Figura 17: Digestiones del vector binario pCAMBIA1105.1 presente en cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con las enzimas de restricción. A) Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2-5: Cepa EHA105. Carril 6-9: Cepa GV2260. Carril 2, 4, 6 y 8: Plásmido sin digerir de las clonas obtenidas. Carril 3, 5, 7 y 9: Plásmido digerido. B) Carril 1: marcador de peso molecular 1 Kb. Carril 2-5: Cepa GV3101. Carril 2 y 4: Plásmido sin digerir de las clonas obtenidas. Carril 3 y 5: Plásmido digerido. Se emplearon EcoRI, y BglII como enzimas de restricción. Gel de agarosa 1%.

7.6. Tolerancia natural a higromicina en ecotipos (Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0) de *Arabidopsis thaliana*

Para determinar la tolerancia natural de los ecotipos silvestres Col-0, Bay-0, Cvi-0 e Ita-0 frente a higromicina se evaluaron 4 concentraciones (25, 50, 100 y 150 µg/mL) de higromicina, pues este antibiótico funciona como marcador de selección para las plántulas candidatas transformantes. El análisis mostró que los 4 ecotipos son sensibles a higromicina al comparar la presencia y ausencia del antibiótico en el medio MS, pues la germinación disminuyó conforme la concentración del antibiótico aumentó y las semillas que lograron germinar no se desarrollaron (Figura 18). De esta manera se evitó la generación de falsos positivos en el posterior escrutinio de plántulas candidatas transformantes, pues ninguno de los ecotipos presentó resistencia natural a higromicina

7.7. Tolerancia natural a cefotaxima en ecotipos (Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0) de *Arabidopsis thaliana*

Se evaluó la tolerancia natural de los ecotipos silvestres Col-0, Bay-0, Cvi-0 e Ita-0 frente a cefotaxima pues este antibiótico es requerido para la eliminación de *A. tumefaciens* remanente del proceso de desinfección. El análisis indicó que los 4 ecotipos son tolerantes a cefotaxima puesto que la presencia del antibiótico en ambas concentraciones (100 y 400 µg/mL) no afectó drásticamente el desarrollo de las plántulas (Figura 19), lo cual indica que la cefotaxima se puede emplear junto con higromicina y no interferirá en la selección de plántulas candidatas transformantes.

7.8. Uso de higromicina para la selección de transformantes primarios en *Arabidopsis thaliana*

Se realizó un ensayo con 4 concentraciones distintas de higromicina (25, 50, 100 y 150 µg/mL) para identificar cuál de estas ejercía una mejor presión de selección sobre las plántulas candidatas transformantes. Este ensayo se realizó en las semillas de *A. thaliana* Col-0 obtenidas después del Floral Dip con las 3 cepas de *A. tumefaciens* ya que aún no se cosechaban las semillas del resto de los ecotipos (Bay-0, Cvi-0 e Ita-0).

Habitualmente la germinación y crecimiento de *A. thaliana* en medio MS requiere de 7 días, pero debido a la presencia de higromicina en el medio fue necesario un tiempo de 13 días para hacer evidentes a las plántulas candidatas transformantes, en el día 10 se pudieron apreciar diferencias entre las plántulas y al día 12 era completamente evidente qué plántulas eran candidatas

transformantes ya que lograron desarrollarse completamente produciendo hojas verdes y raíces bien establecidas en el medio selectivo (Figura 20 A y B).

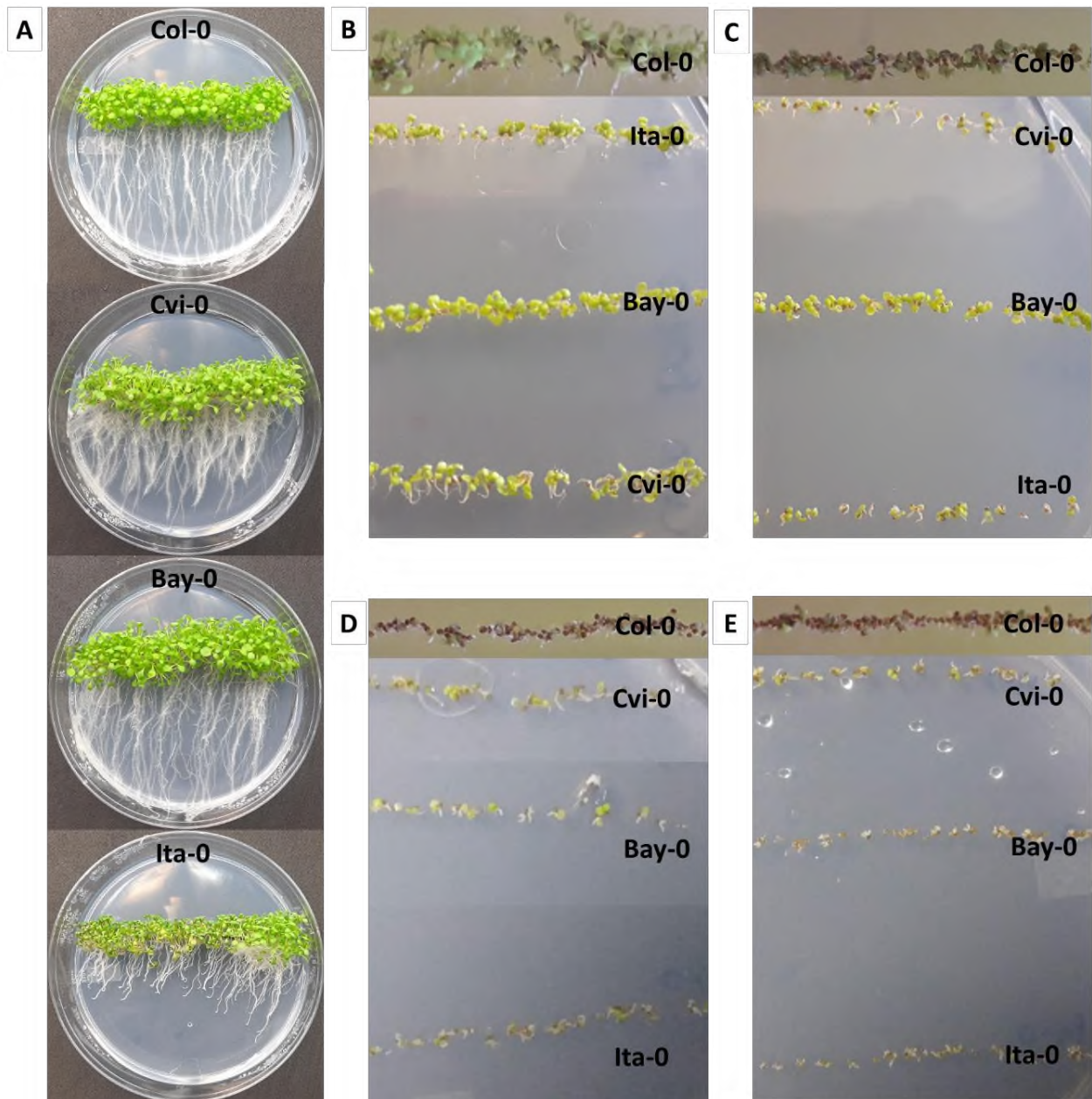


Figura 18: Tolerancia natural a higromicina en *Arabidopsis thaliana* Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0. Ecotipos germinados en MS, A) sin higromicina, B) + 25 µg/ml, C) + 50 µg/ml, D) + 100 µg/ml, E) + 150 µg/ml, de higromicina. Plántulas de 8 días de edad.

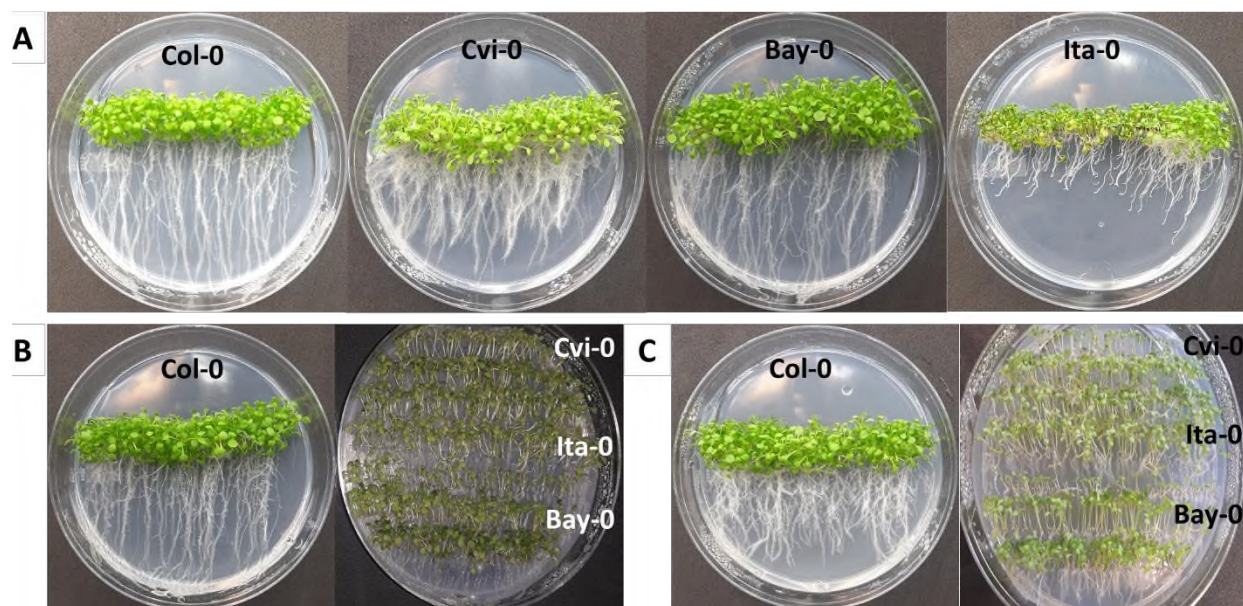


Figura 19: Tolerancia natural a cefotaxima en *Arabidopsis thaliana* Bay-0, Cvi-0, Col-0 e Ita-0. Ecotipos germinados en MS, A) sin cefotaxima, B) + 100 $\mu\text{g/ml}$, C) + 400 $\mu\text{g/ml}$. Plántulas de 8 días de edad.

El ensayo mostro que empleando las concentraciones de 150 y 25 $\mu\text{g/ml}$ no se observaron plántulas candidatas transformantes, para las concentraciones de 100 y 50 $\mu\text{g/ml}$ se observaron 1 y 6 plántulas candidatas transformantes respectivamente (Figura 20). De igual forma se ratificaron los resultados obtenidos por el ensayo de susceptibilidad a higromicina en plántulas silvestres de *A. thaliana* puesto que la germinación y desarrollo de las plántulas que no son candidatas transformantes disminuyó a medida que la concentración de higromicina aumentó de 25 a 150 $\mu\text{g/ml}$.

Durante el desarrollo de las plántulas se presentó contaminación en algunas cajas Petri por *A. tumefaciens* remanente del proceso de transformación y que no pudieron ser eliminadas por el proceso de desinfección (Figura 20 A).

Aun cuando no se observaron plántulas candidatas transformantes para la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina, esto se atribuyó a que en el número de semillas plaqueadas en esa concentración no se encontraba ninguna plántula candidata transformante y no a que la presión de selección fue mayor que con la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, debido a que en 50 $\mu\text{g/ml}$ se presentaron plántulas candidatas transformantes, así mismo esta concentración demostró ser capaz de suprimir el desarrollo de plántulas que no son candidatas transformantes.

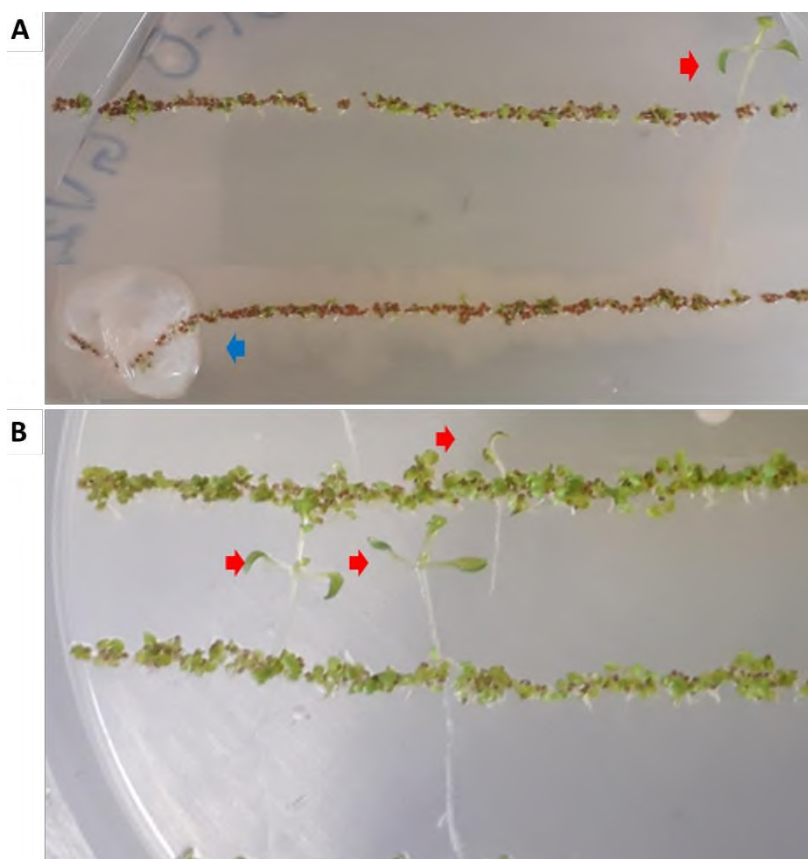


Figura 20: Evaluación de concentraciones de higromicina en Col-0. A) Col-0 obtenida con *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 germinadas en MS + 100 µg/mL de higromicina, B) Col-0 obtenida con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 germinadas en MS + 50 µg/mL de higromicina. Plántulas de 13 días de edad, las flechas rojas indican plántulas transformantes, las flechas azules muestran contaminación en el medio.

Basado en estos hechos y en el reporte de Bent, A. 2006 para la utilización de 25 µg/mL de higromicina en la selección de posibles transformantes de *A. thaliana* se eligió la menor concentración de higromicina probada, para su posterior utilización en el escrutinio de plántulas candidatas transformantes en los 3 ecotipos (Bay-0, Cvi-0 e Ita-0) restantes.

7.9. Uso de cefotaxima para reducir la carga bacteriana

Durante el análisis para determinar que concentración de higromicina ejercía una mejor presión de selección sobre las plántulas candidatas transformantes, se presentó contaminación por *A. tumefaciens* por lo cual en un ensayo posterior se adicionó cefotaxima para evaluar la reducción de la carga bacteriana, las semillas de Col-0 obtenidas después del Floral Dip de cada cepa se plaquearon en medio MS + 2 concentraciones de cefotaxima 100 y 400 µg/mL, ambas concentraciones mostraron resultados satisfactorios pues no se presentó ningún tipo de

contaminación (Figura 21B-C), por lo que se decidió bajar la concentración de cefotaxima a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ así como su utilización en conjunto con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de higromicina para el escrutinio de plántulas candidatas transformantes de los ecotipos Bay-0, Cvi-0 e Ita-0.

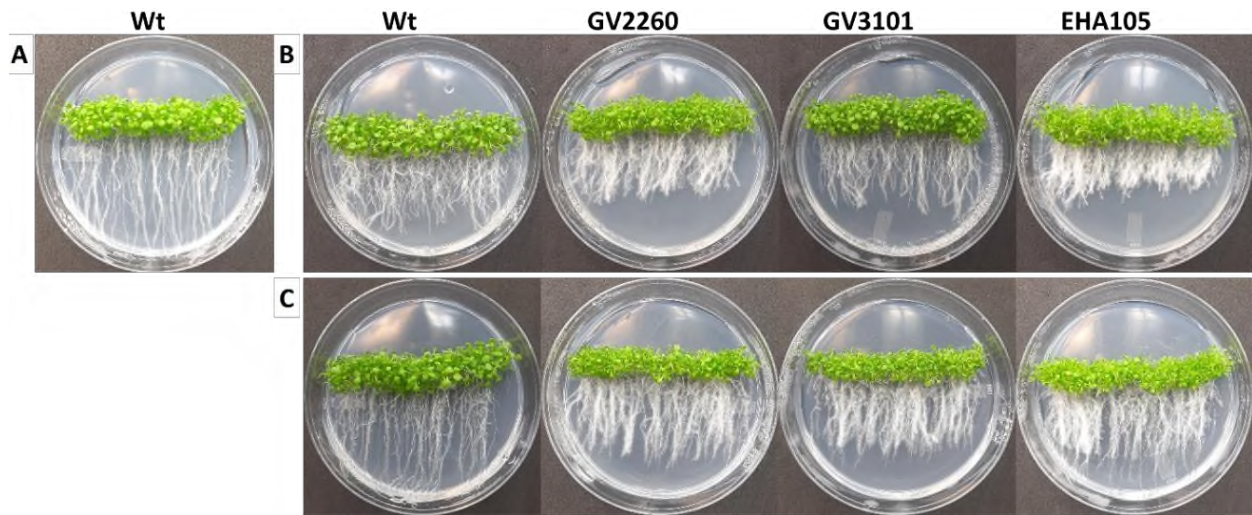


Figura 21: Evaluación de concentración de cefotaxima en *Arabidopsis thaliana* Col-0. A) *A. thaliana* Col-0 (Wt) germinadas en medio MS sin higromicina, B) Col-0 germinadas en medio MS + 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, C) Col-0 germinadas en medio MS + 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Plántulas de 13 días de edad.

7.10. Escrutinio de transformantes de *Arabidopsis thaliana*

La germinación y crecimiento se monitoreó por 13 días para hacer evidentes a las plántulas candidatas transformantes, que son más grandes en comparación, ya que producen hojas verdes y raíces bien establecidas en el medio selectivo (ejemplo/Figura 20).

Las plántulas que no son candidatas transformantes germinan, pero eventualmente sus cotiledones se vuelven amarillos o marrones debido a que se necrosan (Figura 22 Bay-0/GV220; Ita-0/GV220), sin embargo, este daño no es uniforme en las plántulas que no son candidatas transformantes puesto que los cotiledones permanecieron sin daño aparente en múltiples replicas dentro de una misma tanda de transformación. Según Zhang, *et al.*, 2006 los cotiledones de plántulas que no son candidatas transformantes pueden permanecer verdes durante más de 1 mes después de la germinación.

Se realizaron 6 experimentos de transformación independientes para cada combinación de cepa (GV2260, GV3101 y EHA105) y ecotipo (Bay-0, Cvi-0 e Ita-0), para evaluar posteriormente la frecuencia de transformación de las 3 cepas sobre cada ecotipo.

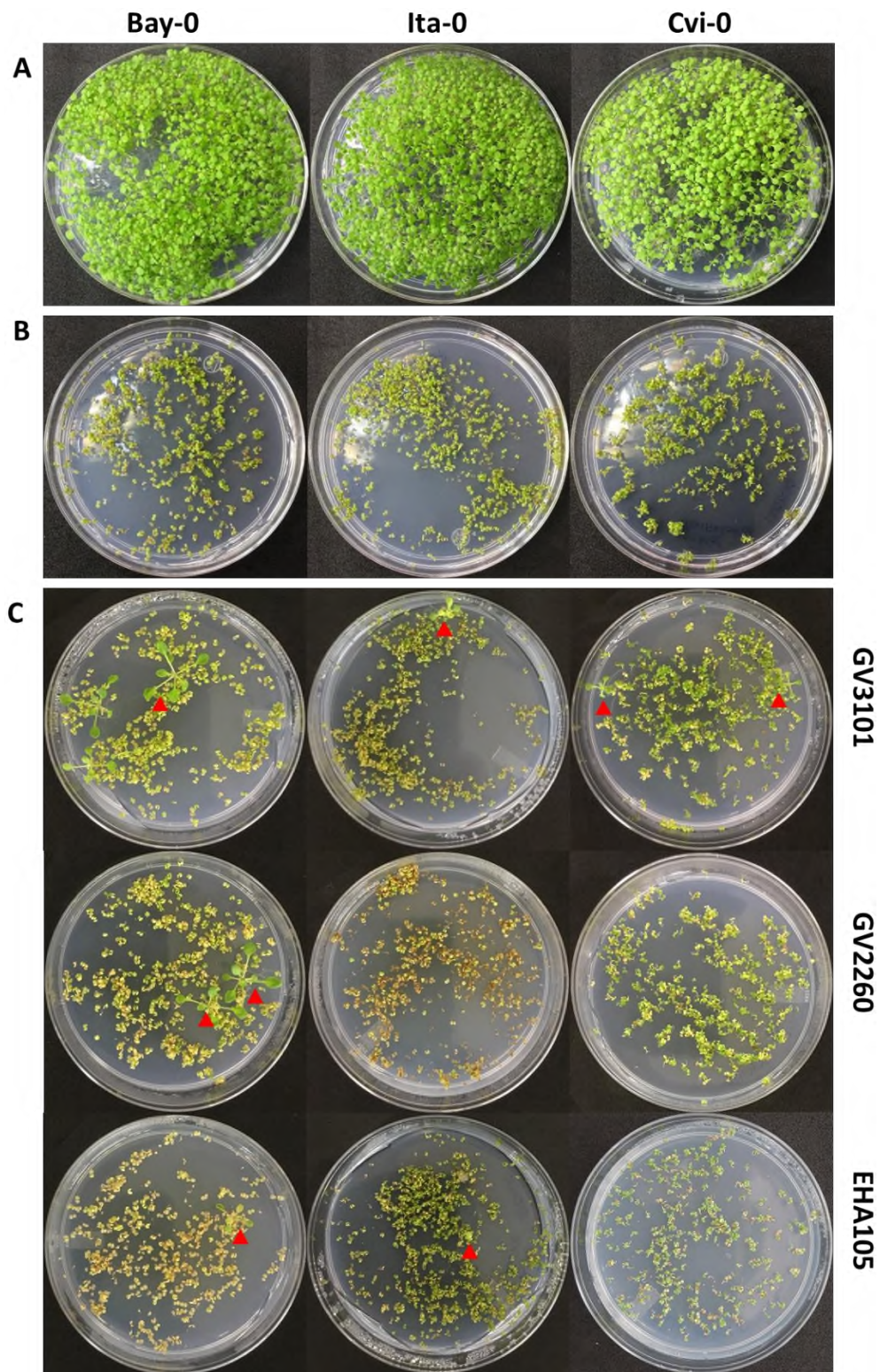


Figura 22: Escrutinio de plántulas candidatas transformantes de *Arabidopsis thaliana*. A) ecotipos Wt de *A. thaliana* germinados en MS sin antibióticos. B) ecotipos Wt de *A. thaliana* germinados en MS + 25 µg/mL de higromicina + 50 µg/mL de cefotaxima. C) ecotipos de *A. thaliana* germinados en MS + 25 µg/mL de higromicina y 50 µg/mL de cefotaxima, las flechas rojas indican plántulas transformantes. Plántulas de 12 días de edad desde su plaqueo en el medio.

La presencia de plántulas candidatas transformantes en cada experimento de transformación fue variable y de manera global se obtuvieron plántulas candidatas transformantes para 6 de 9 combinaciones, la cepa GV3101 transformó los 3 ecotipos, la cepa GV2260 solo transformó a Bay-0 y la cepa EHA105 transformó 2 ecotipos Bay-0 e Ita-0 (Figura 22).

7.10.1. Análisis de la frecuencia de transformación

El número de candidatos transformantes obtenidos y por tanto la frecuencia de transformación de cada combinación de cepa y ecotipo fue variable entre las 6 repeticiones del experimento (Tabla 6), sin embargo, todas las repeticiones del Floral Dip se llevaron a cabo en las mismas condiciones (temperatura, concentración de surfactante, tiempo de inoculación), las únicas dos diferencias fueron las concentraciones de los diferentes inóculos de *A. tumefaciens* entre cada repetición y entre todas las repeticiones. Diversos reportes (Clough & Bent 1998; Bent A, 2006; Ghedira, *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2020) informan que la concentración del inóculo de *A. tumefaciens* puede ser bajo y esto no compromete la eficiencia de transformación. La otra diferencia que se presentó fue la limitada producción de semillas después de la aplicación del Floral Dip en el ecotipo Cvi-0 por lo que para determinar su frecuencia media de transformación solo se utilizaron 1500 semillas.

Tabla 6: Frecuencias medias de transformación.

Cepa	Ecotipo	Repetición						FMT (%)
		1	2	3	4	5	6	
		Numero de transformantes						
GV3101	Bay-0	6	1	0	3	6	20	0.2003
	Cvi-0	2	0	1	0	0	0	0.0702
	Ita-0	0	0	0	2	0	0	0.0111
GV2260	Bay-0	4	1	0	0	0	7	0.06708
	Cvi-0	0	0	0	0	0	0	0
	Ita-0	0	0	0	0	0	0	0
EHA105	Bay-0	1	1	0	0	0	0	0.0111
	Cvi-0	0	0	0	0	0	0	0
	Ita-0	1	0	0	0	0	0	0.0056

Número de transformantes (TO) para Bay-0 e Ita-0 en 3000 semillas, para Cvi-0 en 1500 semillas. Las TO fueron obtenidas después de la transformación por Floral Dip de ~8 plantas por repetición. FMT = frecuencia de transformación media calculada de la siguiente manera: [(número de plantas resistentes a higromicina / número de plántulas germinadas)] × 100.

El análisis estadístico señaló que para las combinaciones Ita-0/GV3101, Bay-0/EHA105 e Ita-0/EHA105 las frecuencias medias de transformación estaban cercanas entre si (Figura 23) ya que no tenían diferencias significativas.

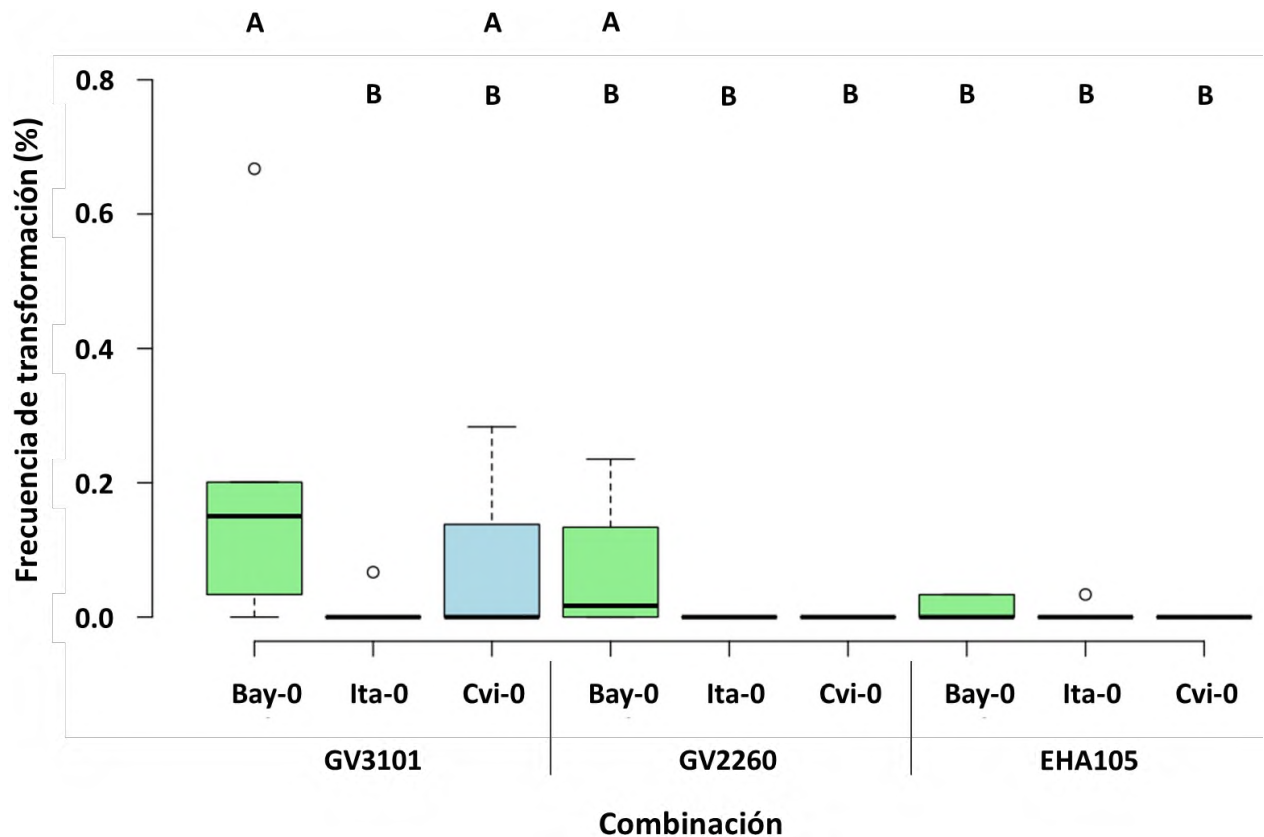


Figura 23: Efecto de la combinación de cepa/ecotipo sobre la frecuencia de transformación empleando el método Floral Dip. Datos de seis repeticiones independientes. Las mismas letras indican que no hay diferencias estadísticamente significativas según ANOVA de 1 vía ($p < 0,05$).

Con las frecuencias medias de transformación, así como en las diferencias significativas presentadas por ANOVA (Anexo 5) se determinó que la mejor combinación fue Bay-0/GV3101 (Figura 23). La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* es la más empleada debido a su alta frecuencia de transformación (Bent A. 2006), sin embargo, Ghedira, *et al.*, 2013 reportan que se pueden obtener frecuencias de transformación variables con una misma cepa para diferentes ecotipos (Tabla 7) por lo que las bajas frecuencias de transformación se atribuyen principalmente al ecotipo empleado.

Comparando las frecuencias de transformación reportadas en diversos proyectos para *A. thaliana* Col-0 (Tabla 8), se observa que las obtenidas en este trabajo son bajas, puesto que para Col-0 se

tienen precedentes de al menos el 1% de transformación. De igual forma hay diversos reportes en donde se han empleado las cepas de *A. tumefaciens* (propuestas en este trabajo) para la transformación genética de otros géneros de plantas (Tabla 9).

Con base en los datos de la literatura sintetizados en las tablas 7, 8 y 9 y su comparación con los resultados de frecuencia de transformación obtenidos en este trabajo, se infiere que los ecotipos propuestos en este trabajo (Bay-0, Cvi-0 e Ita-0) son más recalcitrantes a la transformación que el ecotipo estándar Col-0 empleando el método Floral Dip con las 3 cepas de *A. tumefaciens* propuestas (GV3101, GV2260 y EHA105).

Tabla 7: Frecuencias de transformación para diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* empleando el método Floral Dip y la cepa GV3101

Ecotipo	Frecuencia de transformación (Ft)	Método	Cepa	Referencia	
Col-0	1.30%	Floral Dip	GV3101	Davis, et al., 2009	
Esp-1	0.25%				
Jm-1	0.70%				
En-1	0.60%				
No-0	0.30%				
Oy-0	0.10%				
RLD	0.90%				
Tanz-1	0.50%				
Col-0	0.36%				
Ws-0	Ft similares a Col-0				
Nd-0					
No-0					
Dijon-G	Ft de 10-100 más bajas que las obtenidas para Col-0				Clough & Bent, 1998
Bla-2					
Ler-0	0%	Oltmanns, et al., 2010			
Ws-2	2.11%				
Col-0	2.6		Desfeux, et al., 2000		
Ler-0	0.06				

Tabla 8: Frecuencia de transformación para *Arabidopsis thaliana* Col-0.

Ecotipo	Método	Cepa	Frecuencia de transformación (%)	Referencia
Col-0	Floral Dip	GV3101 EHA105	~1	Zhang <i>et al.</i> , 2006
Col-0	Floral Dip	LMG62Riff	2.4	Ghedira <i>et al.</i> , 2013a
Col-0	Floral Dip	GV2260	1	Solís-Guzmán <i>et al.</i> , 2013
Col-0	Floral Dip	GV3101	~0.6	Wang <i>et al.</i> , 2020
Col-0	Floral Dip	C58C1Rifr	1%	Ghedira <i>et al.</i> , 2013b

Tabla 9: Transformaciones exitosas de diversos géneros de plantas empleando *Agrobacterium tumefaciens*.

Planta	Cepa	Transformación	Referencia
<i>Solanum lycopersicum</i> L.	EHA105 GV3101	Exitosa	Chetty <i>et al.</i> , 2013
<i>Lens culinaris</i>	GV2260	Exitosa	Bermejo <i>et al.</i> , 2019
<i>Moringa oleifera</i> Lam	EHA105	Exitosa	Zhang <i>et al.</i> , 2017

Según Ghedira, *et al.*, 2013a, las bajas frecuencias de transformación pueden deberse tanto a la cepa de *A. tumefaciens*, plásmido, mutaciones en el cromosoma bacteriano, pero principalmente se le atribuye al ecotipo empleado, lo cual sugiere hasta cierto punto, que los ecotipos con que presentan bajas frecuencias de transformación con la misma cepa son hasta cierto punto recalcitrantes a la transformación. La recalcitrancia de algunos ecotipos de *A. thaliana* para la transformación por Floral Dip podría ubicarse a nivel de la flor (morfología, accesibilidad al óvulo). Una mejor comprensión de estos parámetros podría descifrar los mecanismos que subyacen al método de transformación Floral Dip para ecotipos de *Arabidopsis* recalcitrantes (Desfeux, *et al.*, 2000; Yew, *et al.*, 2018).

8. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los datos fisiológicos de supervivencia y de porcentaje de hojas sanas, se determinó al ecotipo Col-0 como el más tolerante de los 4 y a los ecotipos Bay-0, Ita-0 y Cvi-0 como sensibles a inundación, confirmando la información de la literatura.

Conforme a los resultados obtenidos se determinó que la combinación del ecotipo Bay-0 con la cepa GV3101 presentó la mayor frecuencia de transformación, sin embargo, en comparación con las reportadas para *A. thaliana* Col-0 empleando la misma cepa, fue una frecuencia baja; aunque la frecuencia de transformación obtenida empleando el método Floral Dip, cepa GV3101 y ecotipo Bay-0 puede no ser alta, el número total de semillas producidas por *A. thaliana* asegura que se puedan recuperar suficientes eventos transgénicos en futuros experimentos de transformación genética.

El método de transformación genética Floral Dip abre la posibilidad de usar a Bay-0 (ecotipo sensible a inundación) para realizar pruebas de concepto para estudiar, identificar y caracterizar genes candidatos que puedan aumentar su tolerancia a inundación, así como para identificar los mecanismos moleculares que subyacen a su tolerancia a inundación.

La utilización de las otras combinaciones de cepa/ecotipo no quedan completamente descartadas puesto que los ecotipos (Cvi-0 e Ita-0) de *A. thaliana* siguen siendo de interés biotecnológico.

9. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

La utilización de las otras combinaciones de cepa/ecotipo no quedan descartadas puesto que los ecotipos Cvi-0 e Ita-0 de *A. thaliana* siguen siendo de interés biotecnológico, por pertenecer al mismo rango de sensibilidad a inundación que Bay-0, pero para su utilización en futuras investigaciones se debe aumentar su frecuencia de transformación para lo cual podrían implementarse modificaciones fisicoquímicas al método Floral Dip:

➤ Modificaciones físicas

- Aplicación de más un tratamiento de Floral Dip a los ecotipos.
- Transformación de un mayor número de plantas del ecotipo de *Arabidopsis* por tratamiento.
- Aplicación de vacío en conjunto con el Floral Dip para aumentar la infección por *Agrobacterium*.
- Implementación de un menor tiempo de humedad en oscuridad.
- Exploración de diversas formas de aplicación de la solución de *Agrobacterium* para evitar el daño excesivo de las inflorescencias.

➤ Modificaciones químicas

- Analizar diversas concentraciones de silwet L-77.
- Implementación glucosa en lugar de sacarosa en diversas concentraciones.

También podría explorarse la utilización de otras cepas de *A. tumefaciens*, cepas de *A. tumefaciens* con mutaciones en el cromosoma o la implementación de otros plásmidos.

De igual forma se debe realizar la confirmación de las plántulas candidatas de transformación obtenidas con los 3 ecotipos y las 3 cepas mediante PCR usando primers específicos para el ADN-T de pCAMBIA1105.1.

10. REFERENCIAS

- Abel, S., & Theologis, A. (1994). Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 5(3), 421–427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1994.00421.x>
- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Norhana, Z., Yusof, B., Atabaki, N., Sahebi, M., Valdiani, A., Kalhori, N., Azizi, P. & Hanafi, M. M. (2017). Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 134, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.015>
- Adam, L., Ellwood, S., Wilson, I., Saenz, G., Xiao, S., Oliver, R. P., Turner, J. G., & Somerville, S. (1999). Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 12(12), 1031–1043. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.12.1031>
- Akman, M., Bhikharie, A. V., McLean, E. H., Boonman, A., Visser, E. J., Schranz, M. E. & van Tienderen, P. H. (2012). Wait or escape? Contrasting submergence tolerance strategies of *Rorippa amphibia*, *Rorippa sylvestris* and their hybrid. *Annals of Botany*, 109(7), 1263–1276. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs059>
- Akman, M., Kleine, R., van Tienderen, P. H. & Schranz, E. M. (2017). Identification of the Submergence Tolerance QTL Come Quick Drowning1 (CQD1) in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Heredity*, 108(3), 308–317. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx014>
- Alonso-Blanco, C., Gomez-Mena, C., Llorente, F., Koornneef, M., Salinas, J., & Martínez-Zapater, J. M. (2005). Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 139(3), 1304–1312. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068510>
- Anwer, M. U., Boikoglou, E., Herrero, E., Hallstein, M., Davis, A. M., Velikkakam James, G., Nagy, F., & Davis, S. J. (2014). Natural variation reveals that intracellular distribution of ELF3 protein is associated with function in the circadian clock. *eLife*, 3, e02206. <https://doi.org/10.7554/eLife.02206>

- Azahar, I., Ghosh, S., Adhikari, A., Adhikari, S., Roy, D., Shaw, A. K., Singh, K. & Hossain Z. (2020). Comparative analysis of maize root sRNA transcriptome unveils the regulatory roles of miRNAs in submergence stress response mechanism. *Environmental and Experimental Botany*, 171, 103924. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103924>
- Bailey-Serres, J. & Voeselek, L. A. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 313–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092752>
- Bechtold N., & Bouchez D. (1995) In *Planta Agrobacterium-Mediated Transformation of Adult Arabidopsis thaliana Plants by Vacuum Infiltration*. In: Potrykus I., Spangenberg G. (eds) *Gene Transfer to Plants*. Springer Lab Manual. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79247-2_3
- Bent A. (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 343, 87–103. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:87>
- Beranová, M., Rakouský, S., Vávrová, Z. et al. Sonication assisted *Agrobacterium*-mediated transformation enhances the transformation efficiency in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 94, 253–259 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9335-z>
- Bermejo, C., Rodríguez, G., Gatti, I. & Cointry, E. (2019). An efficient agrobacterium-mediated genetic transformation system in lentil (*lens culinaris* Medik). *Agrociencia*, 53(5), 741-755.
- Bermejo, E. S. (2008). *Un análisis genético cuantitativo del tiempo de floración en Arabidopsis* [tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Madrid]. Repositorio UAM. https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1301/16426_sanchez_bermejo.pdf?sequence=1
- Boggs, N. A., Nasrallah, J. B., & Nasrallah, M. E. (2009). Independent S-locus mutations caused self-fertility in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*, 5(3), e1000426. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000426>
- Branco-Price, C., Kaiser, K. A., Jang, C. J., Larive, C. K. & Bailey-Serres, J. (2008). Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 56(5), 743–755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03642.x>

- 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. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.10.027>
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W. & Orozco-Cárdenas, M. L. (2013). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, 32(2), 239-247. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1358-1>
- Chung, M. H., Chen, M. K., & Pan, S. M. (2000). Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic research*, 9(6), 471-476. <https://doi.org/10.1023/a:1026522104478>
- Chung, S. M., Vaidya, M., & Tzfira, T. (2006). *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends in plant science*, 11(1), 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.001>
- Citovsky, V., Kozlovsky, S. V., Lacroix, B., Zaltsman, A., Dafny-Yelin, M., Vyas, S., Tovkach, A., & Tzfira, T. (2007). Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular microbiology*, 9(1), 9-20. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00830.x>
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (2008). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
- Damm, B., Schmidt, R. & Willmitzer, L (1989). Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet* 217, 6-12. <https://doi.org/10.1007/BF00330935>
- Desfeux, C., Clough, S. J. & Bent, A. F. (2000). Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology*, 123(3), 895-904. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.895>
- Díaz-Granados, C. & Chaparro Giraldo, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Actualidad y Divulgación Científica (Bogotá)*, 15(1), 49-61. <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/802>
- Eysholdt-Derzsó, E. & Sauter, M. (2017). Root Bending Is Antagonistically Affected by Hypoxia and ERF-Mediated Transcription via Auxin Signaling. *Plant physiology*, 175(1), 412-423. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00555>

- Eysholdt-Derzsó, E. & Sauter, M. (2019). Hypoxia and the group VII ethylene response transcription factor HRE2 promote adventitious root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 21, 103–108. <https://doi.org/10.1111/plb.12873>
- Fahd K., Pidre J. R. & Martín I. (2015). Gestión de los recursos hídricos, La gestión integrada de los Recursos Hídricos en Andalucía y Norte de Marruecos (pp. 1-57). Gracia, S.L., Sevilla.
- Feldmann, K.A., & David Marks, M. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Mole Gen Genet* 208, 1–9 (1987). <https://doi.org/10.1007/BF00330414>
- Foken, T. (2007). Das Klima von Bayreuth. *Standort*, 31(3), 150-152. DOI 10.1007/s00548-007-0045-x
- Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P. & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. *Frontiers in plant science*, 10, 340. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00340>
- Fukao, T., Xu, K., Ronald, P. C. & Bailey-Serres, J. (2006). A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell*, 18(8), 2021–2034. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043000>
- Gelvin S. B. (2006). *Agrobacterium* transformation of *Arabidopsis thaliana* roots: a quantitative assay. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 343, 105–113. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:105>
- Ghedira, R., De Buck, S., Nolf, J., & Depicker, A. (2013a). The efficiency of *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation is determined not only by the *Agrobacterium* strain used but also by the physiology and the ecotype of the dipped plant. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 26(7), 823–832. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-12-0267-R>
- Ghedira, R., De Buck, S., Van Ex, F., Angenon, G., & Depicker, A. (2013b). T-DNA transfer and T-DNA integration efficiencies upon *Arabidopsis thaliana* root explant cocultivation and floral dip transformation. *Planta*, 238(6), 1025–1037. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1948-3>
- Gil-Monreal, M., Giuntoli, B., Zabalza, A., Licausi, F., & Royuela, M. (2019). ERF-VII transcription factors induce ethanol fermentation in response to amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. *Journal of Experimental Botany*, 70(20), 5839–5851. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz355>
- Gonzali, S., Loreti, E., Cardarelli, F., Novi, G., Parlanti, S., Pucciariello, C., Bassolino, L., Banti, V., Licausi, F. & Perata, P. (2015). Universal stress protein HRU1 mediates ROS homeostasis under anoxia. *Nature Plants*, 1, 15151. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.151>

- Gordon, J. E., & Christie, P. J. (2014). The Agrobacterium Ti Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013>
- Gunaseelan, K., McAtee, P. A., Nardoza, S., Pidakala, P., Wang, R., David, K., Burdon, J. & Schaffer, R. J. (2019). Copy number variants in kiwifruit ETHYLENE RESPONSE FACTOR/APETALA2 (ERF/AP2)-like genes show divergence in fruit ripening associated cold and ethylene responses in C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR-like genes. *PLOS ONE*, 14(5), e0216120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216120>
- Haak, D. C., Fukao, T., Grene, R., Hua, Z., Ivanov, R., Perrella, G. & Li, S. (2017). Multilevel Regulation of Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1564. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01564>
- Hattori, Y., Nagai, K., Furukawa, S., Song, X. J., Kawano, R., Sakakibara, H., Wu, J., Matsumoto, T., Yoshimura, A., Kitano, H., Matsuoka, M., Mori, H. & Ashikari, M. (2009). The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*, 460(7258), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nature08258>
- Hellens, R., Mullineaux, P. & Klee, H. (2000). Technical Focus:a guide to Agrobacterium binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(00)01740-4)
- Hwang, H. H., Yu, M. & Lai, E. M. (2017). Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Instituto Tecnológico de Canarias. (2015, 16 de junio). Proyecto ISLHÁGUA. <http://www.islhagua.itccanarias.org/web/guest/informes-y-resultados>
- Ismond, K. P., Dolferus, R., de Pauw, M., Dennis, E. S. & Good, A. G. (2003). Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiology*, 132(3), 1292–1302. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022244>
- Jakobson, L., Vaahtera, L., Töldsepp, K., Nuhkat, M., Wang, C., Wang, Y. S., Hõrak, H., Valk, E., Pechter, P., Sindarovska, Y., Tang, J., Xiao, C., Xu, Y., Gerst Talas, U., García-Sosa, A. T., Kangasjärvi, S., Maran, U., Remm, M., Roelfsema, M. R., Hu, H., ... Brosché, M. (2016). Natural Variation in Arabidopsis Cvi-0 Accession Reveals an Important Role of MPK12 in Guard Cell CO₂ Signaling. *PLoS biology*, 14(12), e2000322. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000322>

- Jiménez, J. D. L. C., Moreno, L. P. & Magnitskiy, S. (2012). Respuesta de las plantas a estrés por inundación: una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 2011-2173. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2012v6i1.1287>
- Jung, J., Won, S. Y., Suh, S. C., Kim, H., Wing, R., Jeong, Y., Hwang, I. & Kim, M. (2007). The barley ERF-type transcription factor HvRAF confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*, 225(3), 575–588. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0373-2>
- Juntawong, P., Butsayawarapat, P., Songserm, P., Pimjan, R. & Vuttipongchaikij, S. (2020). Overexpression of *Jatropha curcas*ERFVII2 Transcription Factor Confers Low Oxygen Tolerance in Transgenic *Arabidopsis* by Modulating Expression of Metabolic Enzymes and Multiple Stress-Responsive Genes. *Plants*, 9(9), 1068. <https://doi.org/10.3390/plants9091068>
- Kajiyama, S. I., Inoue, F., Yoshikawa, Y., Shoji, T., Fukusaki, E., & Kobayashi, A. (2007). Novel plant transformation system by gene-coated gold particle introduction into specific cell using ArF excimer laser. *Plant biotechnology*, 24(3), 315-320. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.315>
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J. & Komari, T. (2007). Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiology*, 145(4), 1155–1160. <https://doi.org/10.1104/pp.107.105734>
- Krassowska, W. & Filev, P. D. (2007). Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical journal*, 92(2), 404–417. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094235>
- Kreklow, J., Tetzlaff, B., Burkhard, B., & Kuhnt, G. (2020). Radar-Based Precipitation Climatology in Germany—Developments, Uncertainties and Potentials. *Atmosphere*, 11(2), 217. <https://doi.org/10.3390/atmos11020217>
- Larik, A., Ahmed Siddiqui, K., & Ahmed Soomro, Z. (2004). Novel vistas of gene transfer to cereals. *Proc. Pakistan Acad. Sci*, 41(2), 153-164.
- Lee, L. Y. & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <https://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- Lee, S. C., Mustrup, A., Sasidharan, R., Vashisht, D., Pedersen, O., Oosumi, T., Voeselek, L. A. & Bailey-Serres, J. (2011). Molecular characterization of the submergence response of the *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *The New Phytologist*, 190(2), 457–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03590.x>

- Licausi, F., Kosmacz, M., Weits, D. A., Giuntoli, B., Giorgi, F. M., Voeselek, L. A., Perata, P., & van Dongen, J. T. (2011). Oxygen sensing in plants is mediated by an N-end rule pathway for protein destabilization. *Nature*, *479*(7373), 419–422. <https://doi.org/10.1038/nature10536>
- Loreti, E., van Veen, H. & Perata, P. (2016). Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.06.005>
- Martirena-Ramírez, A., & Veitía, N. (2013). Factores que influyen en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens* en *Phaseolus vulgaris* L. *Bioteconología Vegetal*, *13*(2), 67-74. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/97/79>
- Mendiondo, G. M., Gibbs, D. J., Szurman-Zubrzycka, M., Korn, A., Marquez, J., Szarejko, I., Maluszynski, M., King, J., Axcell, B., Smart, K., Corbineau, F. & Holdsworth, M. J. (2016). Enhanced waterlogging tolerance in barley by manipulation of expression of the N-end rule pathway E3 ligase PROTEOLYSIS6. *Plant Biotechnology Journal*, *14*(1), 40–50. <https://doi.org/10.1111/pbi.12334>
- Mickelbart, M. V., Hasegawa, P. M. & Bailey-Serres, J. (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*, *16*(4), 237–251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>
- Minami, A., Yano, K., Gamuyao, R., Nagai, K., Kuroha, T., Ayano, M., Nakamori, M., Koike, M., Kondo, Y., Niimi, Y., Kuwata, K., Suzuki, T., Higashiyama, T., Takebayashi, Y., Kojima, M., Sakakibara, H., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kurata, N., Ashikari, M., ... Reuscher, S. (2018). Time-Course Transcriptomics Analysis Reveals Key Responses of Submerged Deepwater Rice to Flooding. *Plant Physiology*, *176*(4), 3081–3102. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00858>
- Mitchell-Olds, T. & Schmitt, J. (2006). Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature*, *441*(7096), 947–952. <https://doi.org/10.1038/nature04878>
- Morigaki, K., & Walde, P. (2007). Fatty acid vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *12*(2), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.05.005>
- Müller, M. & Munné-Bosch, S. (2015). Ethylene Response Factors: A Key Regulatory Hub in Hormone and Stress Signaling. *Plant Physiology*, *169*(1), 32–41. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00677>
- Mustroph, A. (2018). Improving flooding tolerance of crop plants. *Agronomy*, *8*(9), 160. <https://doi.org/10.3390/agronomy8090160>
- Mustroph, A., Lee, S. C., Oosumi, T., Zanetti, M. E., Yang, H., Ma, K., Yaghoubi-Masihi, A., Fukao, T. & Bailey-Serres, J. (2010). Cross-kingdom comparison of transcriptomic adjustments to low-oxygen

- stress highlights conserved and plant-specific responses. *Plant Physiology*, 152(3), 1484–1500. <https://doi.org/10.1104/pp.109.151845>
- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiology*, 140(2), 411–432. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073783>
- Narusaka, M., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., & Narusaka, Y. (2010). The floral inoculating protocol: a simplified Arabidopsis thaliana transformation method modified from floral dipping. *Plant Biotechnology*, 27(4), 349-351. 10.5511/plantbiotechnology.27.349
- Oltmanns, H., Frame, B., Lee, L. Y., Johnson, S., Li, B., Wang, K., & Gelvin, S. B. (2010). Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the Agrobacterium chromosome. *Plant physiology*, 152(3), 1158–1166. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148585>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s.f.). Los desastres causan pérdidas agrícolas millonarias, con la sequía a la cabeza. Consultado el 24 de diciembre de 2019. <http://www.fao.org/news/story/es/item/1107192/icode/>
- Oropeza O. y C. Enríquez (2007) Zonas susceptibles a inundaciones. NA-XIV-2. mapa escala 1:4,000,000. In: Proyecto Institucional: Nuevo Atlas http://www.igeograf.unam.mx/Geodig/nvo_atlas/index.html/5_naturaleza_ambiente/14_peligros/NA_XIV_2.JPG
- Ortiz-López, E. (2020). Implementación y análisis de un protocolo para la transformación genética estable de los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 de *Arabidopsis thaliana*, resistentes a inundación [Tesis de licenciatura no publicada, Universidad del Papaloapan]
- Paul, M. V., Iyer, S., Amerhauser, C., Lehmann, M., van Dongen, J. T. & Geigenberger, P. (2016). Oxygen Sensing via the Ethylene Response Transcription Factor RAP2.12 Affects Plant Metabolism and Performance under Both Normoxia and Hypoxia. *Plant Physiology*, 172(1), 141–153. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00460>
- Peña-Castro, J. M. (2014). Respuesta molecular de las plantas ante el estrés por inundación: lecciones aprendidas del gen SUB1A. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(4), 325-337. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v37n4/v37n4a6.pdf>
- Peña-Castro, J. M., van Zanten, M., Lee, S. C., Patel, M. R., Voesenek, L. A., Fukao, T. & Bailey-Serres, J. (2011). Expression of rice SUB1A and SUB1C transcription factors in Arabidopsis uncovers flowering inhibition as a submergence tolerance mechanism. *The Plant Journal*, 67(3), 434–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04605.x>

- Phoenix Bioinformatics Corporation. (s. f.). The Arabidopsis Information Resource. Consultado el 14 de mayo de 2019a. <https://www.arabidopsis.org/servlets/Search>
- Phoenix Bioinformatics Corporation. (s. f.). The Arabidopsis Information Resource. Consultado el 14 de mayo de 2019b. <https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>
- Phukan, U. J., Mishra, S., & Shukla, R. K. (2016). Waterlogging and submergence stress: affects and acclimation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(5), 956–966. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1064856>
- Pucciariello, C., Voeselek, L. A., Perata, P. & Sasidharan, R. (2014). Plant responses to flooding. *Frontiers in Plant Science*, 5, 226. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00226>
- Rea, A. C., & Nasrallah, J. B. (2015). In vivo imaging of the S-locus receptor kinase, the female specificity determinant of self-incompatibility, in transgenic self-incompatible Arabidopsis thaliana. *Annals of botany*, 115(5), 789–805. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv008>
- Rivera-Contreras, I. K., Zamora-Hernández, T., Huerta-Heredia, A. A., Capataz-Tafur, J., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P. & Peña-Castro, J. M. (2016). Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive Brachypodium distachyon ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Scientific Reports*, 6, 27686. <https://doi.org/10.1038/srep27686>
- Sanz Hueso, C. (2020). Hidrogeología de la isla de Santiago (Cabo Verde) [tesis de maestría, Universidad de Alcalá]. Repositorio Institucional UN.
- Sarukhán, J. (2017). *Capital natural de México, síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidad humanas e institucionales*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Capital%20Natural%20de%20Mexico_Sintesis.pdf
- Sasidharan, R. & Voeselek, L. A. (2015). Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress. *Plant Physiology*, 169(1), 3–12. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00387>
- Sasidharan, R., Bailey-Serres, J., Ashikari, M., Atwell, B. J., Colmer, T. D., Fagerstedt, K., Fukao, T., Geigenberger, P., Hebelstrup, K. H., Hill, R. D., Holdsworth, M. J., Ismail, A. M., Licausi, F., Mustroph, A., Nakazono, M., Pedersen, O., Perata, P., Sauter, M., Shih, M. C., Sorrell, B. K., ... Voeselek, L. (2017). Community recommendations on terminology and procedures used in flooding and low oxygen stress research. *The New Phytologist*, 214(4), 1403–1407. <https://doi.org/10.1111/nph.14519>

- Sasidharan, R., Hartman, S., Liu, Z., Martopawiro, S., Sajeev, N., van Veen, H., Yeung, E. & Voesenek, L. (2018). Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiology*, 176(2), 1106–1117. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01232>
- Seki, M., Shigemoto, N., Komeda, Y., Imamura, J., & Yamada, Y. (1991). Transgenic Arabidopsis thaliana plants obtained by particle-bombardment-mediated transformation. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(2), 228-230. <https://doi.org/10.1007/BF00164425>
- Septiningsih, E. M., Pamplona, A. M., Sanchez, D. L., Neeraja, C. N., Vergara, G. V., Heuer, S., Ismail, A. M. & Mackill, D. J. (2009). Development of submergence-tolerant rice cultivars: the Sub1 locus and beyond. *Annals of Botany*, 103(2), 151–160. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn206>
- Singh, S., Mackill, D. J. & Ismail, A. M. (2009). Responses of SUB1 rice introgression lines to submergence in the field: yield and grain quality. *Field Crops Research*, 113(1), 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.04.003>
- Singh, U. S., Dar, M. H., Singh, S., Zaidi, N. W., Bari, M. A., Mackill, D. J., ... & Singh, R. K. (2013). Field performance, dissemination, impact and tracking of submergence tolerant (Sub1) rice varieties in South Asia. *SABRAO Journal of Breeding & Genetics*, 45(1).
- Solís-Guzmán, M. G., Rodríguez, J. F. A., Chimalhua, E. V., Abud, Y. C. & Trujillo, M. M. (2013). Análisis de la expresión del gen At4g12640 en plantas transformadas de Arabidopsis thaliana. *Biológicas*, 15(1): 31 – 37
- Stewart Jr, C. N. (Ed.). (2016). *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*. John Wiley & Sons.
- Strickler, S. R., Tantikanjana, T., & Nasrallah, J. B. (2013). Regulation of the S-locus receptor kinase and self-incompatibility in Arabidopsis thaliana. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3(2), 315–322. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004879>
- Tamang, B. G. & Fukao, T. (2015). Plant Adaptation to Multiple Stresses during Submergence and Following Desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30164–30180. <https://doi.org/10.3390/ijms161226226>
- Tsai, K. J., Lin, C. Y., Ting, C. Y. & Shih, M. C. (2016). Ethylene-Regulated Glutamate Dehydrogenase Fine-Tunes Metabolism during Anoxia-Reoxygenation. *Plant Physiology*, 172(3), 1548–1562. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00985>
- Universidad de Missouri. (2020, 10 de diciembre). Diciembre de 2020 El clima y sus impactos en Missouri. <http://climate.missouri.edu/>

- Valvekens, D., Van Montagu, M., & Van Lijsebettens, M. (1988). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(15), 5536–5540. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.15.5536>
- van Dongen, J. T. & Licausi, F. (2015). Oxygen sensing and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *66*, 345–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114813>
- van Veen, H., Vashisht, D., Akman, M., Girke, T., Mustroph, A., Reinen, E., Hartman, S., Kooiker, M., van Tienderen, P., Schranz, M. E., Bailey-Serres, J., Voesenek, L. A. & Sasidharan, R. (2016). Transcriptomes of Eight Arabidopsis thaliana Accessions Reveal Core Conserved, Genotype- and Organ-Specific Responses to Flooding Stress. *Plant Physiology*, *172*(2), 668–689. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00472>
- Vashisht, D., Hesselink, A., Pierik, R., Ammerlaan, J. M., Bailey-Serres, J., Visser, E. J., Pedersen, O., van Zanten, M., Vreugdenhil, D., Jamar, D. C., Voesenek, L. A. & Sasidharan, R. (2011). Natural variation of submergence tolerance among Arabidopsis thaliana accessions. *The New Phytologist*, *190*(2), 299–310. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03552.x>
- Vashisht, D., van Veen, H., Akman, M. & Sasidharan, R. (2016). Variation in Arabidopsis flooding responses identifies numerous putative "tolerance genes". *Plant Signaling & Behavior*, *11*(11), e1249083. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1249083>
- Vasil, I.K. A short history of plant biotechnology. *Phytochem Rev* *7*, 387–394 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9075-z>
- Vicente, J., Mendiondo, G. M., Movahedi, M., Peirats-Llobet, M., Juan, Y. T., Shen, Y. Y., Dambire, C., Smart, K., Rodriguez, P. L., Charng, Y. Y., Gray, J. E., & Holdsworth, M. J. (2017). The Cys-Arg/N-End Rule Pathway Is a General Sensor of Abiotic Stress in Flowering Plants. *Current Biology: CB*, *27*(20), 3183–3190.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.006>
- Voesenek, L. A. & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: an overview. *The New Phytologist*, *206*(1), 57–73. <https://doi.org/10.1111/nph.13209>
- Wang, Y., Yaghmaiean, H. & Zhang, Y. (2020). High transformation efficiency in Arabidopsis using extremely low Agrobacterium inoculum. *F1000Research*, *9*(356), 356. <https://doi.org/10.12688/f1000research.23449.2>

- Weits, D. A., Giuntoli, B., Kosmacz, M., Parlanti, S., Hubberten, H. M., Riegler, H., Hoefgen, R., Perata, P., van Dongen, J. T. & Licausi, F. (2014). Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nature communications*, *5*, 3425. <https://doi.org/10.1038/ncomms4425>
- Xu, K. & Mackill, D. J. (1996). A major locus for submergence tolerance mapped on rice chromosome 9. *Molecular Breeding*, *2*(3), 219-224. <https://doi.org/10.1007/BF00564199>
- Xu, K., Xu, X., Fukao, T., Canlas, P., Maghirang-Rodriguez, R., Heuer, S., Ismail, A. M., Bailey-Serres, J., Ronald, P. C. & Mackill, D. J. (2006). Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*, *442*(7103), 705–708. <https://doi.org/10.1038/nature04920>
- Yew, C. L., Kakui, H. & Shimizu, K. K. (2018). Agrobacterium-mediated floral dip transformation of the model polyploid species *Arabidopsis kamchatica*. *Journal of Plant Research*, *131*(2), 349–358. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0982-9>
- Yildiz, M., Aycan, M & Park, S. (2016). New Approaches to *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Gene Transfer to Plants. Farrukh Jamal (Ed.), *Genetic Engineering - An Insight into the Strategies and Applications* (pp 23). IntechOpen. DOI: 10.5772/66465.
- Yuan, L. B., Dai, Y. S., Xie, L. J., Yu, L. J., Zhou, Y., Lai, Y. X., Yang, Y. C., Xu, L., Chen, Q. F. & Xiao, S. (2017). Jasmonate Regulates Plant Responses to Postsubmergence Reoxygenation through Transcriptional Activation of Antioxidant Synthesis. *Plant physiology*, *173*(3), 1864–1880. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01803>
- Zhang, J., Lin, M., Chen, H., & Chen, X. (2017). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of drumstick (*Moringa oleifera* Lam.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *31*(6), 1126-1131. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1368415>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W. & Chua, N. H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, *1*(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zuther, E., Büchel, K., Hundertmark, M., Stitt, M., Hinch, D. K., & Heyer, A. G. (2004). The role of raffinose in the cold acclimation response of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, *576*(1-2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.09.006>

11. ANEXOS

Anexo 1

- **Preparación de soluciones de lisis.**

- Solución de lisis I

Diluir y disolver 100 μL de EDTA 10 mM en 4775 μL de agua desionizada, posteriormente agregar 125 μL de Tris HCl 25 mM, para obtener un volumen final de 5000 μL . La solución se debe mantener en hielo durante su utilización.

- Solución de lisis II

Diluir y disolver 100 μL de NaOH 10 N en 4400 μL de agua desionizada, posteriormente agregar 500 μL de SDS 1%, para obtener un volumen final de 5000 μL . La solución se debe mantener a temperatura ambiente durante su utilización.

- Solución de lisis III

Diluir y disolver 3000 μL de acetato de potasio 5 M en 1425 μL de agua desionizada, posteriormente agregar 575 μL de ácido glacial acético, para obtener un volumen final de 5000 μL . La solución se debe mantener en hielo durante su utilización.

Anexo 2

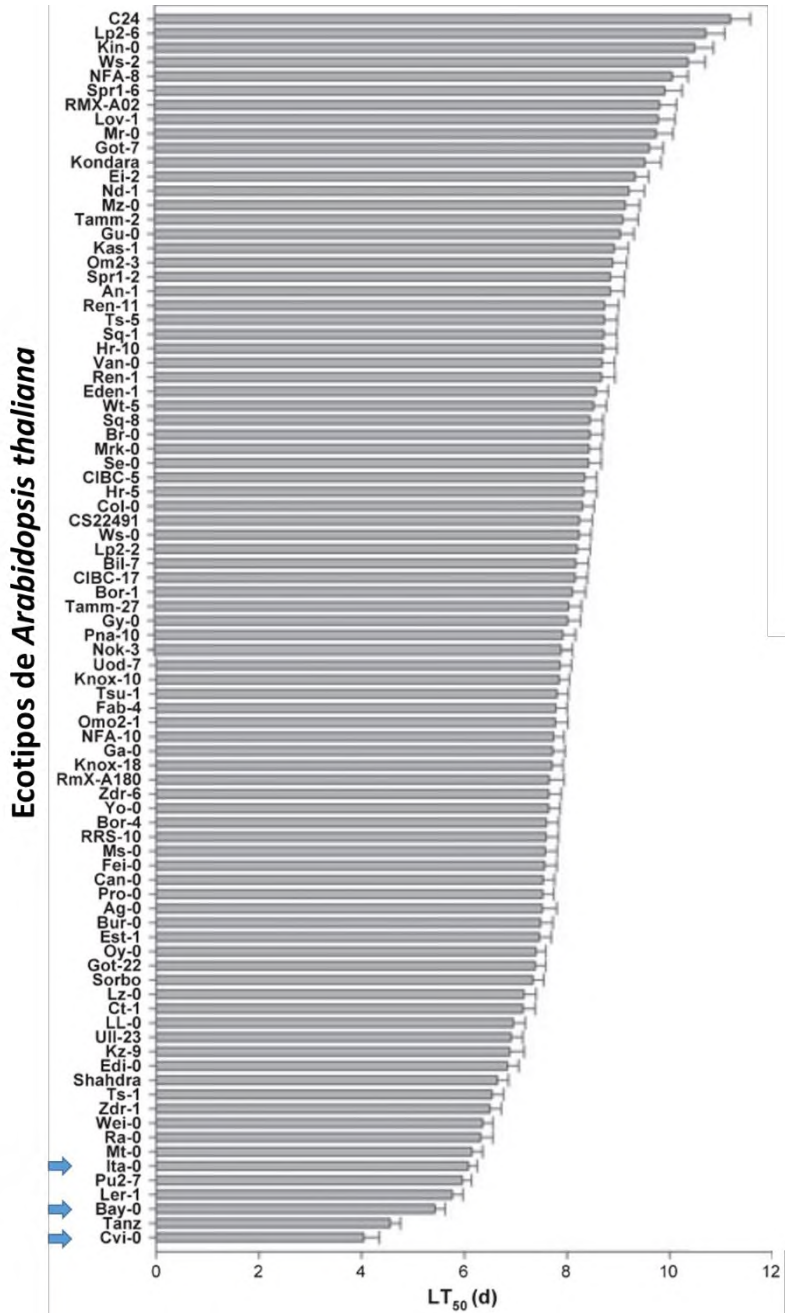
- **TAE 50X**

Se disuelven 242 g de TRIS en 100 ml de EDTA 0.5 M y 57.1 ml de ácido acético en ddH₂O, se afora a 1 L y se verifica el pH a 8.0. Para preparar 100 ml de TAE 1X se toman 2 ml de TAE 50 X y se mezclan con 98 ml de ddH₂O.

Anexo 3

- Variación de tolerancia a sumersión en oscuridad entre 86 ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, (Vashisht, et al., 2011).

La tolerancia a la sumersión está en función del parámetro estadístico LT_{50} (tiempo letal medio + EE). Las flechas azules indican los ecotipos de *A. thaliana* utilizados en este trabajo.



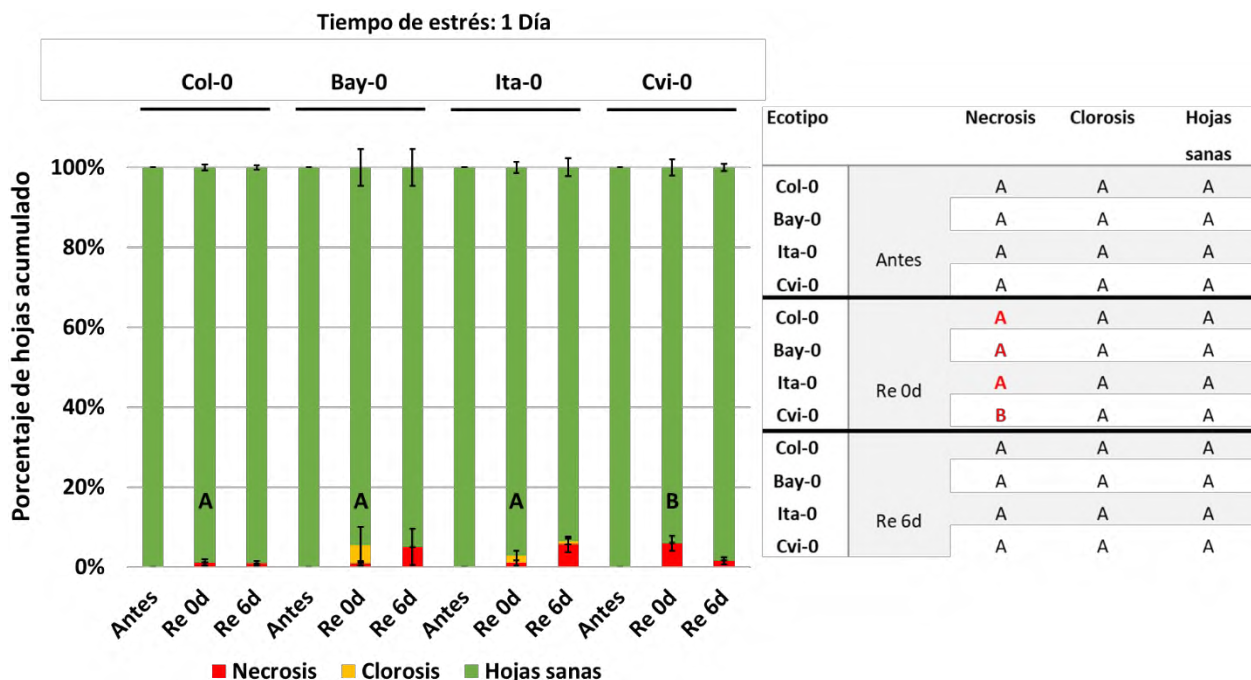
Anexo 4

- Índice de daño en hojas (con datos fisiológicos de hojas sanas y hojas dañadas por clorosis y necrosis) y comparaciones de media de cuatro ecotipos de *A. thaliana* sometidos a estrés por inundación.

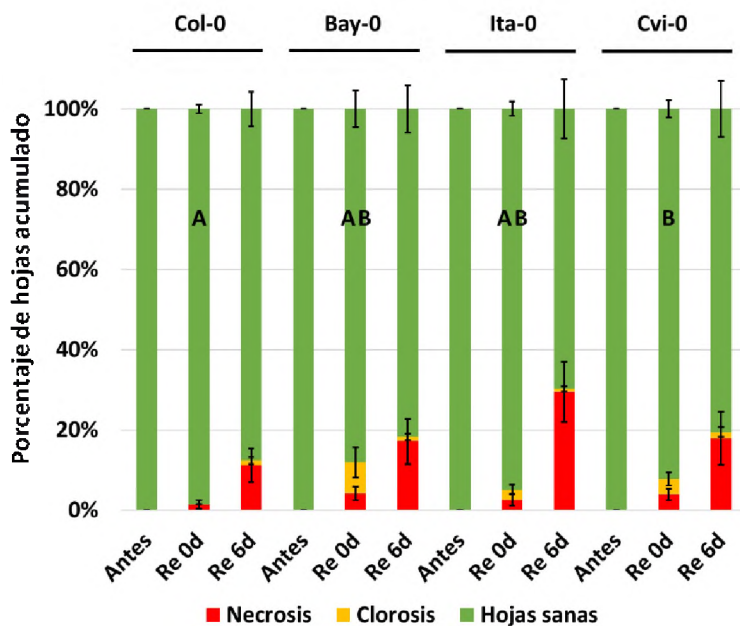
Índice de daño en hojas por ecotipo de *A. thaliana* antes y después de 0 y 6 días de recuperación (Re 0 y Re 6) posteriores al estrés por inundación. Datos promedio de 2 experimentos independientes, \pm E.E.

Tablas de comparacion de medias (prueba t de Student $p < 0.05$) de necrosis, clorosis y hojas sanas entre Col-0 vs Bay-0, Cvi-0 o Ita-0 antes y después de 0 y 6 días de recuperación (Re 0 y Re 6) posteriores al estrés por inundación. Letras diferentes indican diferencias significativas entre ecotipos.

El orden en que aparecen las letras en las gráficas de índice de daño es descendente (hojas sanas, clorosis, necrosis), solo se muestran las que indican diferencias entre ecotipos.

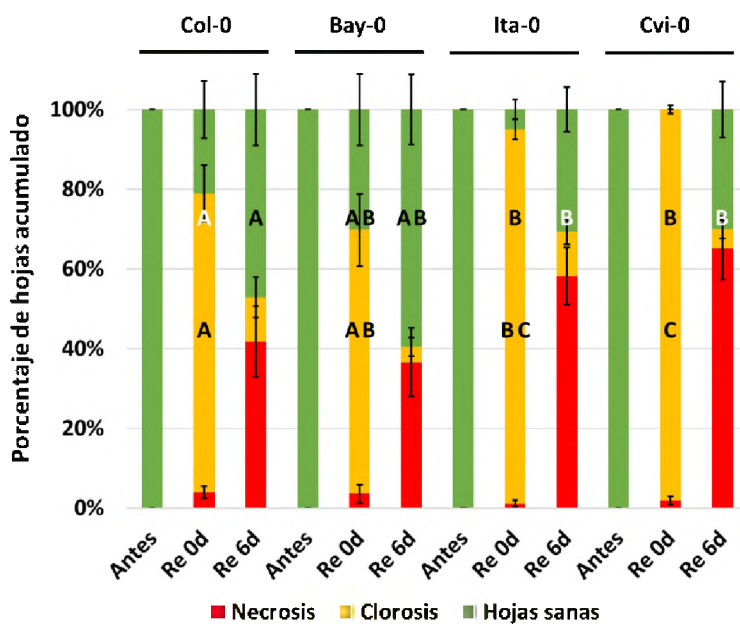


Tiempo de estrés: 2 Días



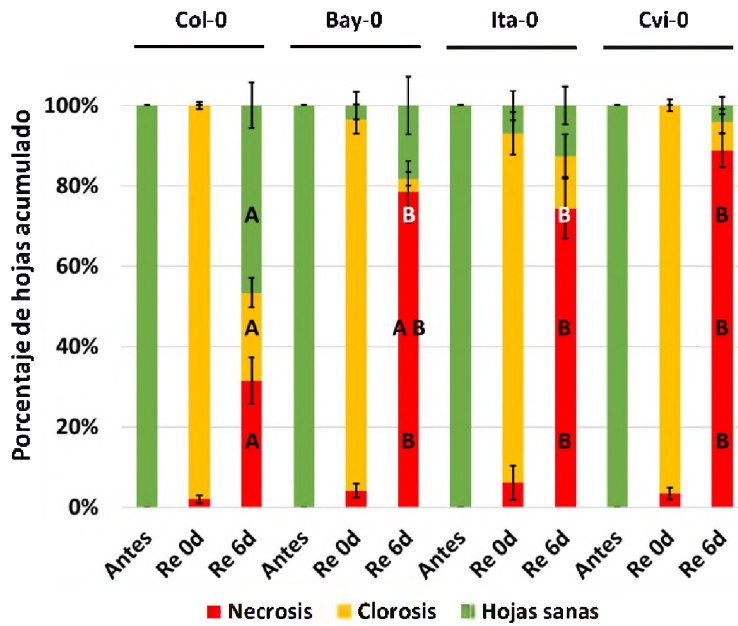
Ecotipo	Necrosis	Clorosis	Hojas sanas
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A B
Ita-0	A	A	A B
Cvi-0	A	A	B
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A

Tiempo de estrés: 3 Días



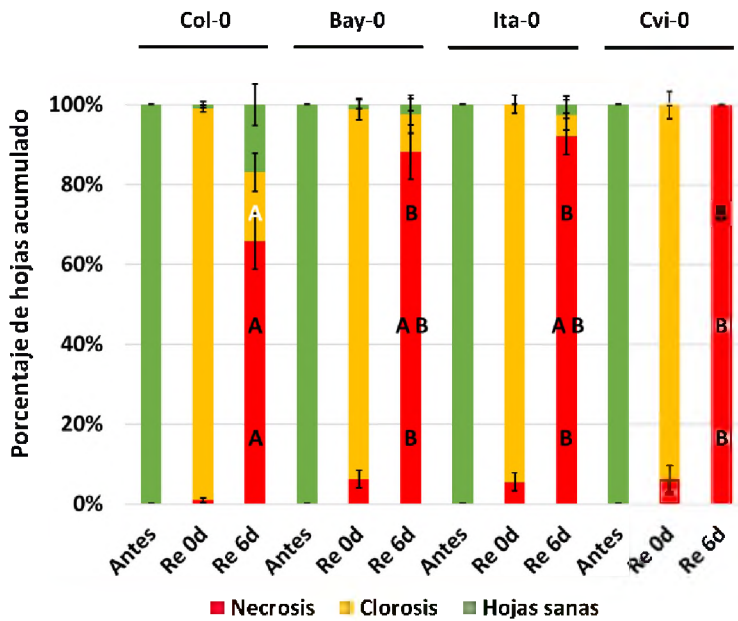
Ecotipo	Necrosis	Clorosis	Hojas sanas
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A B	A B
Ita-0	A	B C	B
Cvi-0	A	C	B
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A B
Ita-0	A	A	B
Cvi-0	A	A	B

Tiempo de estrés: 4 Días



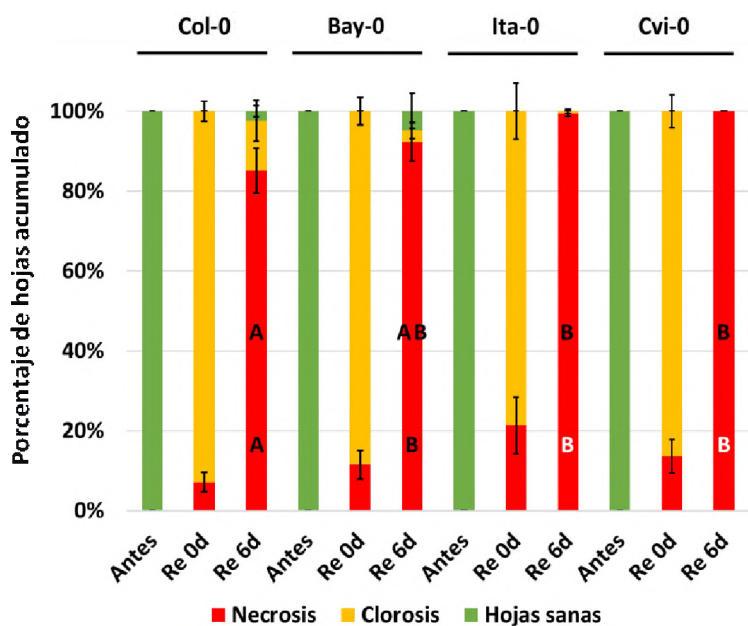
Ecotipo	Necrosis	Clorosis	Hojas sanas
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	B	A B	B
Ita-0	B	B	B
Cvi-0	B	B	B

Tiempo de estrés: 5 Días



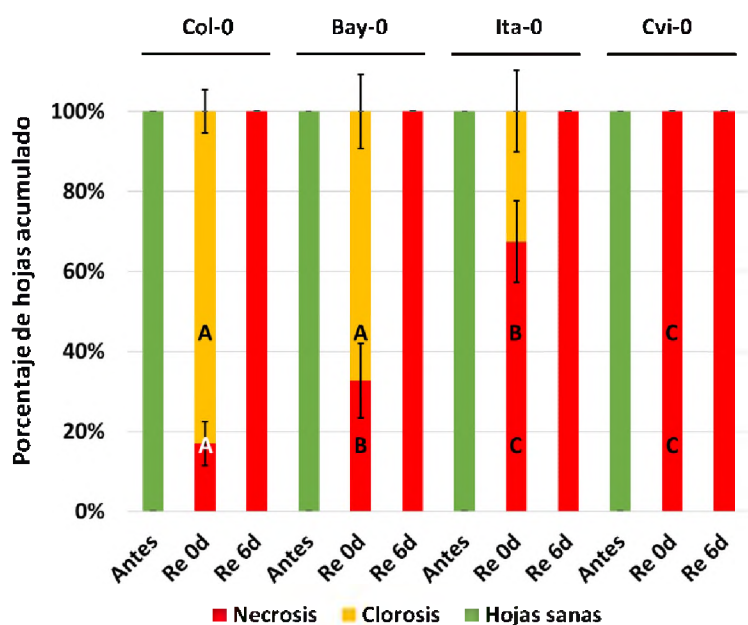
Ecotipo	Necrosis	Clorosis	Hojas sanas
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	B	A B	B
Ita-0	B	A B	B
Cvi-0	B	B	B

Tiempo de estrés: 6 Días



Ecotipo	Necrosis	Clorosis	Hojas sanas
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	B	A B	A
Ita-0	B	B	A
Cvi-0	B	B	A

Tiempo de estrés: 9 Días



Ecotipo	Necrosis	Clorosis	Hojas sanas
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	B	A	A
Ita-0	C	B	A
Cvi-0	C	C	A
Col-0	A	A	A
Bay-0	A	A	A
Ita-0	A	A	A
Cvi-0	A	A	A

Anexo 5

- **ANOVA de un solo factor: Frecuencia de transformación**

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Combinación	8	0.2101	0.026257	2.82	0.013
Error	45	0.4194	0.009321		
Total	53	0.6295			

Comparaciones en parejas de Tukey

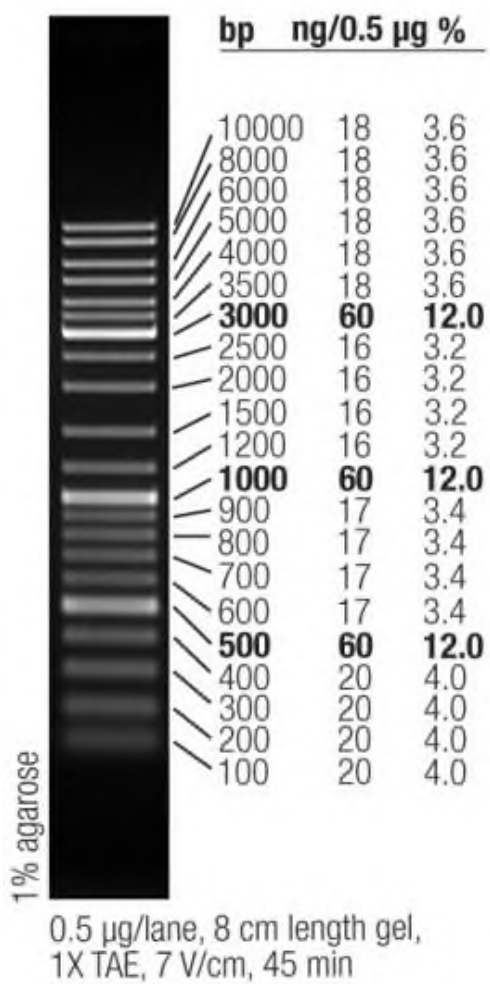
Combinación	N	Media	Agrupación
Bay-0/GV3101	6	0.2004	A
Cvi-0/GV3101	6	0.0702	A B
Bay-0/GV2260	6	0.0671	A B
Ita-0/GV3101	6	0.0111	B
Bay-0/EHA105	6	0.01114	B
Ita-0/EHA105	6	0.00560	B
Ita-0/GV2260	6	0.000000	B
Cvi-0/GV2260	6	0.000000	B
Cvi-0/EHA105	6	0.000000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 6

- Marcador de peso molecular: Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix, número de catálogo SM0332

GeneRuler DNA Ladder Mix



Anexo 7

- Marcador de peso molecular: Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018

