



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

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 la  
inundación

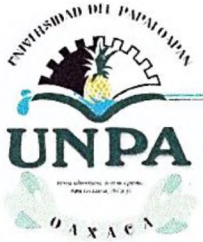
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
Ingeniero en Biotecnología

PRESENTA:  
ERICK ORTIZ LÓPEZ

DIRECTORA: DRA. BLANCA ESTELA BARRERA FIGUEROA

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 22 de junio de 2021 a las 12 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 "**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 la inundación**" presentada por el alumno **Erick Ortiz López**, con número de matrícula **14090180**, 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 22 de junio de 2021

ATENTAMENTE  
LA COMISIÓN REVISORA

**Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**  
Universidad del Papaloapan  
Director de Tesis

**Dr. Edgar Baltazar Sepúlveda García**  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

**Dr. Paul Sánchez Ocampo**  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

**Dr. Edgar García López**  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de Tesis

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



## UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 23 de junio de 2021  
Oficio No. JCIB/006/06/2021

**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 **Erick Ortiz López** titulado "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 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:

Presidente: Dr. Edgar García López  
Secretario: Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García  
Vocal: Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo  
Primer Suplente: Dr. Julián Mario Peña Castro  
Segundo Suplente: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.



JEFATURA DE INGENIERÍA  
EN BIOTECNOLOGÍA  
CAMPUS TUXTEPEC

**Dr. Julián Mario Peña Castro**  
Jefe de Carrera de Ingeniería en  
Biotecnología  
Universidad del Papaloapan

**Atentamente**  
*Terra uberrima, mens aperta*  
*Bou Lo-tama, chí jí jú*



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

c.c.p. Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa. Directora de tesis, Para su conocimiento  
c.c.p. Erick Ortiz López, Alumno, Para su conocimiento  
c.c.p. Archivo

## I. DECLARACIÓN 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.

## II. 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.

Agradezco de corazón a la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa por creer en mí y brindarme la oportunidad de aprender de ella, por su paciencia y dedicación en la dirección de esta tesis.

Dr. Julián Mario Peña Castro por su colaboración, apoyo incondicional y enseñanza durante el desarrollo de este trabajo.

Dr. Edgar García López por todo su apoyo y conocimientos compartidos para la transformación genética de *Agrobacterium tumefaciens*.

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.

Dra. Jacqueline Capataz Tafur, Dr. Alejandro Aparicio Saguilán en su colaboración con equipos a lo largo de este trabajo.

IBT. Mayra Santiago Velasco e IBT. Lucisabel Medina Chávez por compartir sus experiencias y su orientación brindada en las técnicas utilizadas en el desarrollo de este proyecto.

A mis amigos y compañeros Alexis Flores Méndez, Wendy Panamá Raymundo, Joaquin Sánchez y Zurysadai Corrales Ocampo por su amistad brindada y acompañarme durante mi trayectoria escolar.

A mis mejores amigos LCQ. Sadia Joyce Méndez Velasco e Ing. Gonzalo Isaí Méndez Velasco con los cuales siempre estaré agradecido por su apoyo incondicional en diferentes etapas de mi vida estudiantil como personal y hacer más agradable mi experiencia universitaria.

Finalmente, a todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron brindándome su ayuda y comprensión en los momentos que más los necesite.

### **III. DEDICATORIAS**

A mis padres, Isabel López Bazán y Bulmaro Ortiz López por nunca dejarme solo, apoyarme incondicionalmente, creer y confiar en mí, por siempre impulsarme a ser mejor cada día y sentar las bases para superar situaciones adversas.

A mi hermana Dalia Ortiz López, no podría haber tenido una mejor, para demostrarle que con trabajo y dedicación se pueden cumplir muchos sueños.

## IV. ÍNDICE

V.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
VI.	ÍNDICE DE TABLAS.....	X
VII.	RESUMEN.....	XI
VIII.	ABSTRACT.....	XII
1.	MARCO TEÓRICO .....	1
1.1.	Las inundaciones como consecuencia de cambio climático .....	1
1.2.	Respuestas de las plantas ante el estrés por inundación .....	1
1.3.	<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo para el estudio de la tolerancia natural a la inundación .....	6
1.3.1.	Variabilidad natural de la tolerancia a la inundación en <i>A. thaliana</i> .....	6
1.4.	Transformación genética de plantas.....	8
1.5.	Proceso natural de transformación de plantas mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	10
1.6.	Protocolos de transformación de plantas mediante <i>A. tumefaciens</i> .....	12
1.6.1.	Método de inmersión floral .....	14
1.7	<i>A. thaliana</i> como modelo para el estudio de la tolerancia a la inundación empleando transformación genética.....	15
1.	JUSTIFICACIÓN .....	17
2.	HIPÓTESIS.....	18
3.	OBJETIVOS.....	18
4.1.	Objetivo general.....	18
4.2.	Objetivos específicos.....	18
5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
6.	METODOLOGÍA .....	20
6.1.	Obtención del material vegetal.....	20
6.2.	Ensayo de inundación .....	20
6.3.	Plásmido pCAMBIA1105.1.....	21
6.4.	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	21
6.4.1.	Digestión y electroforesis del plásmido pCAMBIA1105.1 de <i>E. coli</i> .....	22
6.5.	Preparación de células electrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
6.6.	Electroporación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	24
6.6.1.	Extracción y digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
6.7.	Ensayo de tolerancia a antibióticos de los ecotipos silvestres.....	25
6.8.	Trasformación genética de los ecotipos de <i>A. thaliana</i> (Lp2-6, Kin-0 y C24) utilizando el método de inmersión floral.....	26

6.8.1.	Obtención del material vegetal.....	26
6.8.2.	Transformación de ecotipos de <i>A. thaliana</i> por inmersión floral .....	26
6.9.	Selección de transformantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
7.1.	Ensayo de inundación .....	29
7.1.1.	Porcentaje de supervivencia de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0.....	31
7.1.2.	Índice de supervivencia .....	32
7.1.3.	Índice de daño en las hojas de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
7.2.	Confirmación de la presencia del plásmido pCAMBIA1105.1 de <i>E. coli</i> .....	39
7.3.	Análisis de la susceptibilidad natural de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a antibióticos de selección.....	40
7.4.	Confirmación de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	41
7.5.	Análisis de pCAMBIA1105.1 a partir de transformantes de <i>A. tumefaciens</i> .....	41
7.6.	Ensayo de tolerancia natural a antibióticos en los ecotipos Lp2-6, Kin-0, C24 y Col-0.....	42
7.7.	Análisis de resultados de la transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	45
8.	CONCLUSIONES .....	51
9.	PERSPECTIVAS .....	52
10.	REFERENCIAS.....	53
11.	ANEXOS .....	57

## V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de los carbohidratos bajo condiciones de hipoxia. ....	3
Figura 2. Modelo de los mecanismos regulatorios responsables de las respuestas a la quiescencia y de escape a la inundación en el arroz. ....	5
Figura 3. Diagrama simplificado del mecanismo molecular de transferencia de T-ADN mediado por <i>Agrobacterium</i> . ....	12
Figura 4: Sistema de vector binario para la transformación con <i>Agrobacterium</i> . ....	13
Figura 5. Plásmido pCAMBIA1105.1. ....	22
Figura 6. Transformación genética por el método de inmersión floral. ....	26
Figura 7. Plantas de los cuatro ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidos a estrés por inundación. ....	30
Figura 8. Porcentaje de hojas sanas por ecotipo de <i>Arabidopsis thaliana</i> después de seis días de recuperación posteriores al estrés por inundación. ....	31
Figura 9. Tiempo letal 50 (LT <sub>50</sub> ) de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0 de <i>Arabidopsis thaliana</i> en estrés por inundación. ....	32
Figura 10. Índice de daño en los ecotipos de <i>A. thaliana</i> Col-0, C24, Lp2-6 y Kin-0. ....	35
Figura 11. Electroforesis de la doble digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 clonado y extraído de <i>E. coli</i> . ....	39
Figura 12. Cepas de <i>A. tumefaciens</i> sin plásmidos pCAMBIA1105.1. ....	40
Figura 13. Selección de <i>A. tumefaciens</i> transformada con el plásmido pCAMBIA1105.1 extraído y purificado de <i>E. coli</i> . ....	41
Figura 14. Doble digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 extraído de las cepas EHA105, GV2260 Y GV3101. ....	42
Figura 15. Ensayo de tolerancia natural a higromicina de ecotipos silvestres Lp2-6, Kin-0 y C24 en medio MS. ....	43
Figura 16. Ensayo de tolerancia a higromicina en el ecotipo silvestre Col-0. ....	44
Figura 17. Ensayo de tolerancia a cefotaxima en ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24. ....	44
Figura 18. Ensayo de tolerancia a cefotaxima en el ecotipo silvestre Col-0. ....	45
Figura 19. Selección de plantas candidatas transformantes de <i>A. thaliana</i> . ....	46
Figura 20. Comparación de plantas de <i>A. thaliana</i> ecotipo Lp2-6 posibles transformantes y no transformantes con el plásmido pCAMBIA1105.1. ....	47
Figura 21. Frecuencia de transformación. ....	48

## VI. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de ecotipos de <i>A. thaliana</i> tolerantes a la inundación. ....	7
Tabla 2. Comparación de los métodos más populares para la transformación genética de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	9
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	10
Tabla 4. Mezcla de reacción para digestión del plásmido pCAMBIA 1105.1 extraído de <i>e. coli</i> .....	23
Tabla 5. Mezcla de reacción para electroforesis del plásmido extraído y digerido de <i>E. coli</i> .....	23
Tabla 6. Dosis de exposición a antibióticos en ecotipos silvestres. ....	25
Tabla 7. Comparación de $LT_{50}$ .....	33
Tabla 8. Número de transformantes obtenidas después de la transformación por inmersión floral .....	48
Tabla 9. Soluciones para el aislamiento del plásmido pCAMBIA 1105.1 .....	60

## VII. RESUMEN

La agricultura es una de las actividades más importantes para la supervivencia humana. En México se dedica una superficie de ocho millones de hectáreas al cultivo del maíz, con un valor de producción de 79,596 millones de pesos. Según las estimaciones, es muy probable que para finales de este siglo los episodios de precipitación extrema sean más intensos y más frecuentes, por lo que las inundaciones constituyen una amenaza creciente para la agricultura, siendo los pequeños productores y la población rural pobre los más vulnerables a los efectos del cambio climático. De modo que es prioritario el desarrollo de cultivos de alto rendimiento que sean más tolerantes al estrés provocado por las inundaciones.

*Arabidopsis thaliana* es una planta que posee diversidad genética natural en su capacidad para tolerar la inundación, pueden servir como modelo funcional para probar estrategias biotecnológicas y aumentar la tolerancia al estrés provocado por las inundaciones en plantas con importancia agrícola.

En el presente trabajo, se analizó la tolerancia a la inundación de los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 de *Arabidopsis thaliana*, utilizando el ecotipo Col-0 como control. Los datos fisiológicos recolectados en el ensayo de inundación (clorosis, necrosis, hojas sanas y LT50) demostraron que los ecotipos C24 y Lp2-6 son más tolerantes al estrés por inundación respecto a Col-0. Con respecto a las frecuencias de transformación genética utilizando en método de inmersión, los ecotipos Lp2-6 y Kin-0 fueron los más susceptibles a la transformación con las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 y GV2260 (Lp2-6-GV3101: 1.16% y Kin-0-GV2260: 0.90%), mientras que la cepa EHA105 presentó las frecuencias de transformación más bajas con los tres ecotipos (Lp2-6: 0.06%, Kin-0: 0.13%, C24: 0.03%). Por otra parte, el ecotipo C24 presentó las menores frecuencias de transformación por inmersión floral (GV3101: 0.13%, GV2260: 0.36% EHA105: 0.03%). Esto indica que el ecotipo C24 es, hasta cierto punto, recalcitrante a la transformación por inmersión floral. Por lo tanto, las frecuencias de transformación están influenciadas por el ecotipo de *A. thaliana* y la cepa de *A. tumefaciens*.

Los resultados obtenidos abren las posibilidades de utilizar estos ecotipos como modelos para el estudio de genes con función desconocida y para explorar estrategias dirigidas al aumento de la tolerancia a la inundación en plantas con importancia agrícola.

## VIII. ABSTRACT

Agriculture is one of the most important activities for survival. In Mexico up to eight million Ha are dedicated to corn production, up to 70,596 million pesos. According to estimations, it is probable that by the end of this century the episodes of extreme rainfall will increase in intensity and frequency. Thus, floods constitute an increasing threat to agriculture, being the small farmers and rural population in poverty the most vulnerable to the effects of climate change. In this way, the development of crops of high yield and superior tolerance to flooding stress is a priority.

*Arabidopsis thaliana* is a plant with natural genetic diversity of tolerance to flooding that could be useful as a functional model to explore biotechnological approaches for increasing tolerance to flooding stress in important crop plants.

In this work, it was analyzed the tolerance to flooding in the *Arabidopsis thaliana* ecotypes Lp2-6, Kin-0, with Col-0 as a control ecotype. Physiological data in flooding assays, including chlorosis, necrosis, healthy leaves and Letal Time (LT<sub>50</sub>), demonstrated that ecotypes C24 and Lp2-6 were more tolerant to flooding stress than Col-0. Regarding the analysis of genetic transformation using the floral dip method, ecotypes Lp2-6 and Kin-0 were the most susceptible to transformation with *Agrobacterium* strains GV3101 and GV2260 (Lp2-6-GV3101: 1.16% y Kin-0-GV2260: 0.90%), while strain EHA105 showed the lowest transformation frequency with the three ecotypes tested (Lp2-6: 0.06%, Kin-0: 0.13%, C24: 0.03%). Moreover, the ecotype C24 showed the lowest transformation frequencies (GV3101: 0.13%, GV2260: 0.36% EHA105: 0.03%). This indicated that ecotype C24 is recalcitrant to transformation by floral dip to certain level. Based on these findings, it is concluded that transformation frequencies are influenced by the *A. thaliana* ecotype and the *A. tumefaciens* strain.

The results of this work open the possibilities of using these ecotypes as models for the study of genes of unknown function and to explore strategies leading to the improvement of tolerance to flooding stress in crops.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Las inundaciones como consecuencia de cambio climático

Algunas actividades humanas, como la tala de bosques y la quema de combustibles, han ocasionado un aumento en la cantidad de CO<sub>2</sub> atmosférico que ha intensificado el efecto invernadero y el calentamiento global (Fletcher y Smith, 2020), causando fenómenos que amenazan la producción de alimentos (Naciones Unidas, 2018). Los efectos negativos del cambio climático se dejarán sentir en todos los países y con mayor intensidad en los países con menor desarrollo (FAO, 2017). Según las estimaciones, los episodios de precipitación extrema sean más intensos y más frecuentes a medida que vaya aumentando la temperatura media global en la superficie de nuestro planeta (IPCC, 2014). Estas condiciones afectarán la productividad agrícola, donde los pequeños productores y la población rural pobre de los países en desarrollo son especialmente vulnerables a los efectos del cambio climático (FAO, 2017).

Entre 1970 y 2016, 230 ciclones tropicales impactaron las costas de México (CONAGUA, 2017), dejando tras de sí miles de hectáreas sembradas bajo el agua por días y hasta semanas. En consecuencia, las pérdidas económicas han llegado a alcanzar hasta el 35% o más por inundación, y por temporada se puede acumular un déficit de cientos de millones de dólares para la economía regional (Peña-Castro, 2014), por lo que las inundaciones constituyen una amenaza creciente para la agricultura en México, principalmente por el aumento en el número e intensidad de los ciclones.

### 1.2. Respuestas de las plantas ante el estrés por inundación

Las inundaciones debidas a fenómenos meteorológicos extremos pueden ser muy perjudiciales para los ecosistemas naturales y agrícolas (Yeung, et al., 2018). Los eventos de inundación se pueden clasificar en inmersión, donde la raíz y el sistema aéreo están bajo el agua, es decir, el agua cubre totalmente la planta, y anegamiento, donde solo se ve afectado el sistema de raíces dentro del suelo (Voeselek, *et al.*, 2016; Mustroph, 2018).

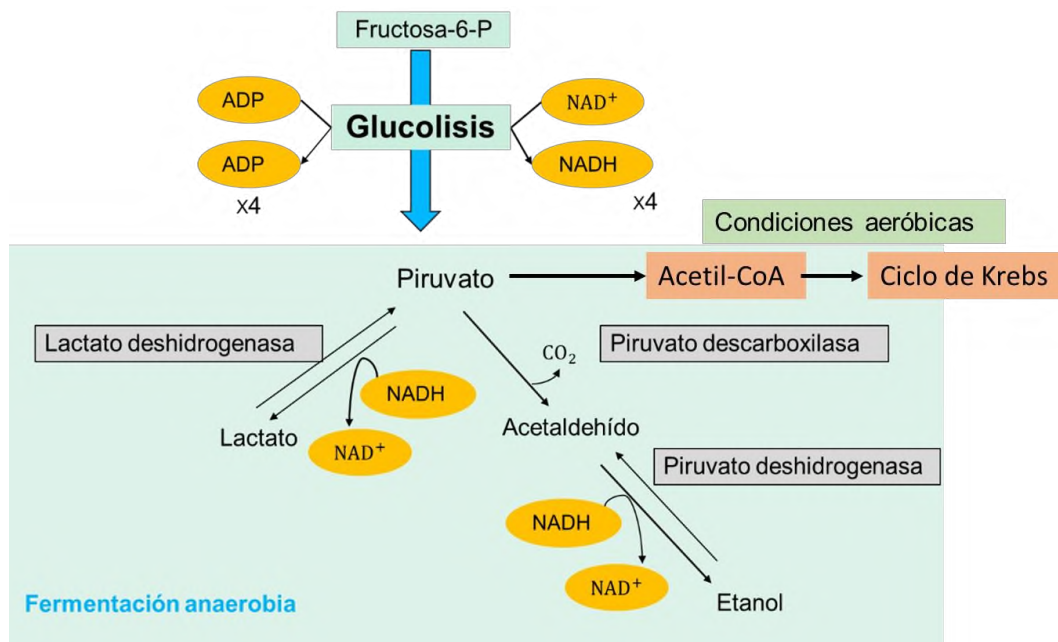
En condiciones de inundación, las plantas experimentan múltiples perturbaciones ambientales que incluyen disminución de la luz al aumentar la turbidez del agua debida a sólidos

suspendidos, limitación de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, acumulación excesiva de etileno y elementos tóxicos en el suelo, como el manganeso (Mn<sup>2+</sup>), hierro (Fe<sup>2+</sup>) y sulfuro (H<sub>2</sub>S, HS<sup>-</sup>, S<sup>2-</sup>) (Voesenek & Bailey-Serres, 2015; Schmidt, *et al.*, 2018; Gill, *et al.*, 2019). El oxígeno y el CO<sub>2</sub> no pueden intercambiarse fácilmente a través de los estomas y las paredes celulares bajo el agua, lo que conduce gradualmente a la disminución de oxígeno disponible (hipoxia) dentro de las partes de la planta inundada donde las concentraciones normales de O<sub>2</sub> son de 21 % p/p (peso/peso). Adicionalmente, la baja disponibilidad de CO<sub>2</sub> en las hojas inundadas restringe la fotosíntesis (Mustroph, 2018), y por lo tanto la formación de nuevas hojas. Además, las condiciones alteradas de luz y de disponibilidad de O<sub>2</sub> ocasionan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden llevar a daños celulares importantes, dejando tejidos susceptibles al ataque de patógenos. Estas condiciones causan una severa crisis energética dentro de las células vegetales al disminuir o limitar la eficiencia de las rutas aeróbicas de síntesis de ATP (ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cadena de transporte de electrones) (Loreti & Perata, 2021). De esta manera, la sumersión o el anegamiento pueden afectar negativamente los rendimientos agrícolas al retrasar la siembra, reducir el vigor, alterar el desarrollo y aumentar la susceptibilidad a las enfermedades (Voesenek & Bailey-Serres, 2015).

Para responder a la hipoxia, en cuestión de minutos a horas, las plantas cambian de un metabolismo aerobio a uno anaerobio, y esto se logra mediante la expresión de un conjunto de genes denominados Genes Centrales de Hipoxia (GCH) (Rivera-Contreras, *et al.*, 2016; Fukao, *et al.*, 2019), que codifican entre otras proteínas, las enzimas alcohol deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa para facilitar la producción de ATP y NAD<sup>+</sup> vía glicólisis y la fermentación a nivel sustrato. En condiciones normóxicas, el ATP se produce a través de la fosforilación oxidativa (Voesenek, *et al.*, 2016), dado que la producción de ATP mitocondrial está limitada por la disponibilidad de oxígeno, las plantas dependen de la producción de ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato (Voesenek, *et al.*, 2015; Mustroph, 2018).

Durante la glucólisis, el NADH se acumula y necesita ser oxidado a NAD para mantener el proceso glicolítico. Esto se realiza mediante (1) una estimulación de la fermentación de lactato y etanol (Fig. 1), y / o por (2) conversión mejorada de piruvato a través de vías que conducen a alanina, ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) y succinato, y (3), la reducción de nitrato (conversión de nitrato en nitrito) requiere NADH como co-sustrato y, por lo tanto, se supone que este ciclo

denominado óxido nítrico (NO) es una fuente alternativa de  $\text{NAD}^+$  (Van Dongen & Licausi, 2015). Sin embargo, la utilización de estas vías significa una menor producción de energía ya que se producen 2 mol de ATP por mol de glucosa en glucólisis comparada con 30–36 mol de ATP por mol de glucosa en la respiración oxidativa mitocondrial (Mustroph, 2018). En consecuencia, cuando el estrés es muy prolongado (días) las especies de plantas sensibles a menudo mueren por deficiencia de energía debido al agotamiento de sustratos fermentables (Peña-Castro, 2014).



**Figura 1.** Metabolismo de los carbohidratos bajo condiciones de hipoxia. Figura modificada de (Fukao & Bailey-Serres, 2004). ADP: adenosín difosfato. NADH: nicotamida adenina dinucleótico.

Las plantas tolerantes que crecen en ambientes acuáticos (pantanos, manglares, ríos) tienen o inician el desarrollo de mecanismos de aclimatación para hacer frente a una afluencia transitoria de agua en su entorno (Tamang & Fukao, 2015). Una de las estrategias para superar el estrés producido por la inundación, consiste en evitar la deficiencia de oxígeno dentro de las partes de las plantas inundadas a través de modificaciones anatómicas y morfológicas que mejoran el intercambio de gases con el entorno (Yamauchi, *et al.*, 2018). Las modificaciones se reflejan en la formación de aerénquima, misma que se regula por señalización de auxinas y etileno (Yamauchi, *et al.*, 2020), y que promueven el transporte eficiente y la distribución de

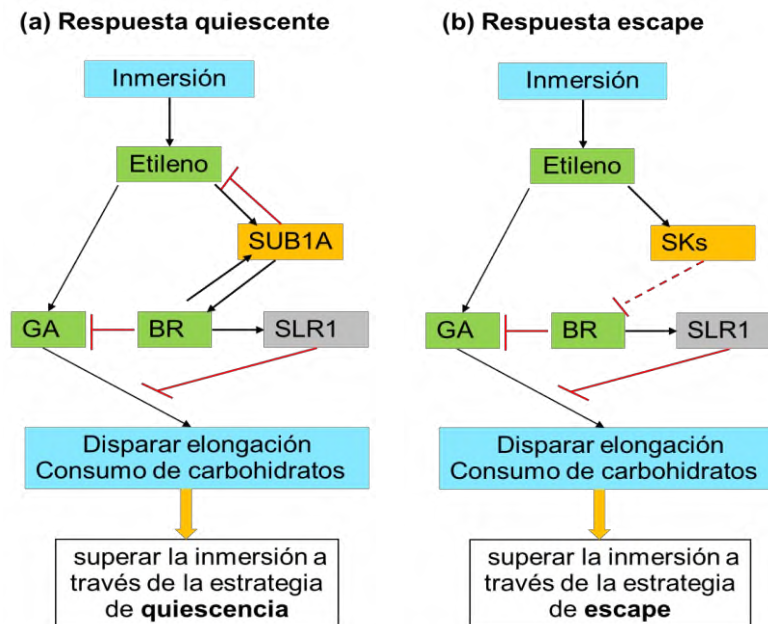
gases dentro de los tejidos vegetales sumergidos. Además, se tiene la formación de raíces porosas (raíces adventicias), una reducción en el grosor de la cutícula y la pared de la célula epidérmica para una menor resistencia a la difusión, y el alargamiento del peciolo para superar el nivel de la columna de agua (Sasidharan & Voesenek, 2015).

Las plantas que no tienen adaptaciones naturales a los ambientes acuáticos realizan modificaciones. A ese respecto, se han descrito dos mecanismos para administrar las reservas de carbohidratos bajo el estrés por inundación (Voesenek & Bailey-Serres, 2015), y se ha observado que la mayoría de las plantas tiene un mecanismo u otro. El primer mecanismo de supervivencia, conocido como “escape”, es útil en las plantas que enfrentan inundaciones constantes, pero de baja profundidad, dicho mecanismo incluye una serie de características como un alto consumo de carbohidratos, lo que permite un rápido alargamiento de los órganos aéreos para escapar de la inundación, al mantener las hojas por encima del nivel del agua y facilitar la difusión del oxígeno. El segundo mecanismo se ha nombrado “quiescencia” e implica la represión del consumo de carbohidratos. Esto ocasiona la inhibición del crecimiento de las plantas, como el atraso en el tiempo a floración, y la planta permanece en un estado de pausa hasta que la inundación cede, se alivia el estrés y se reprimen las respuestas a la inundación (Peña-Castro, *et al.*, 2011; Voesenek, *et al.*, 2016; Rivera-Contreras, *et al.*, 2016).

Durante la inundación, compuestos gaseosos como el oxígeno, el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el etileno y el óxido nítrico (NO) participan para regular en forma espacial y temporal los mecanismos de tolerancia adaptativa de las plantas (Sasidharan, *et al.* 2018). La especie donde mejor se han caracterizado los mecanismos de tolerancia a la inundación es el arroz (*Oryza sativa* L.) (Peña-Castro, 2014). Las investigaciones realizadas en esta planta determinaron que uno de los reguladores moleculares responsables de la quiescencia es el locus *SUBMERGENCE1* (*SUB1*) que codifica dos o tres factores de transcripción *SUB1A*, *SUB1B* y *SUB1C* (Fukao, *et al.*, 2006; Xu, *et al.*, 2006). La inundación promueve la biosíntesis y la acumulación del etileno, que estimula un aumento de ARNm de *SUB1A*, sin embargo, *SUB1A* finalmente reduce la producción de etileno, lo que conduce a la supresión de la producción de ácido giberélico (AG) mediada por etileno. *SUB1A* también aumenta la abundancia de producción de brassinoesteroides (BR) lo que mejora la degradación de AG, resultando en la restricción de la elongación mediada por AG y el consumo de carbohidratos en la inmersión (Tamang & Fukao, 2015). Además se

comprobó que en *Arabidopsis*, *SUB1 A* inhibe la iniciación de la floración como una estrategia de supervivencia en el mecanismo de quiescencia (Peña-Castro, *et al.*, 2011). Por su parte, los genes *SNORKEL1* y *SNORKEL2* (*SK1 / SK2*) cuya transcripción es inducida por el etileno, son los responsables de la respuesta de escape. Se ha reconocido que el etileno promueve la biosíntesis y la capacidad de respuesta al GA; y así GA induce la elongación de los entrenudos en el arroz para escapar del nivel del agua (Tamang & Fukao, 2015; Rivera-Contreras, *et al.*, 2016) (Fig. 2).

A pesar de tener funciones opuestas, *SNK1/2* y *SUB1A* pertenecen al grupo VII de la familia génica de los *Ethylene Response Factors (ERFs)*, los cuales codifican proteínas de unión al ADN del tipo AP2 que funcionan como factores de transcripción (Giuntoli & Perata, 2018), donde una de sus funciones es inducir los Genes Centrales de Hipoxia (GCH) que le permite a la planta cambiar de un metabolismo aerobio a uno anaerobio.



**Figura 2.** Modelo de los mecanismos regulatorios responsables de las respuestas a la quiescencia y de escape a la inundación en el arroz. Recuperado y modificado de (Tamang & Fukao, 2015). Líneas negras y rojas representan regulación positiva y negativa, respectivamente. Una línea discontinua indica una relación hipotética. Abreviaturas: SKs (Genes *SNORKEL*), *SUB1A* (Gen *SUB1A*), BR (brassinosteroides), SLR1 (Proteína DELLA SLR1), GA (Ácido giberélico).

### **1.3. *Arabidopsis thaliana* como modelo para el estudio de la tolerancia natural a la inundación**

Por definición, un organismo modelo es una especie estudiada extensivamente para el entendimiento de un fenómeno biológico particular, con la expectativa que los descubrimientos puedan facilitar el entendimiento del fenómeno en otros organismos (Andréa Delatorre & Alves da Silva, 2008). *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) es una planta pequeña con flores, diploide con  $2n=10$  cromosomas, perteneciente a la familia Brassicaceae, que desde finales de la década de 1970 adquirió importancia como modelo para realizar estudios genéticos y moleculares (Koornneef & Meinke, 2010; NCBI, 2018).

*Arabidopsis* se adoptó originalmente como un organismo modelo debido a que tiene un ciclo de vida corto, un tamaño pequeño que limita el requisito de instalaciones de crecimiento (puede ser cultivada incluso en placas de Petri), posee un genoma pequeño de  $\sim 120$  Mb, provee una producción prolífica de semillas a través de la autopolinización (alrededor de 5,000 semillas por planta dentro de 6 u 8 semanas después de la germinación), y crece vigorosamente en luz artificial e *in vitro* (Meinke, *et al.*, 1998; Koornneef & Meinke, 2010).

#### **1.3.1. Variabilidad natural de la tolerancia a la inundación en *A. thaliana***

*A. thaliana* posee diversas subpoblaciones genéticas, conocidas como ecotipos, que se diferencian de acuerdo a su hábitat específico, ambiente particular y ecosistema definido con límites de tolerancia a los factores ambientales (Lorca, 2018). En general, cuando se le compara con otras plantas, *A. thaliana* resulta ser relativamente tolerante a la inundación. Por ejemplo, uno de los ecotipos más estudiados de *A. thaliana*, Col-0, presenta síntomas visibles de estrés tras 5 días en sumersión (Vashisht, *et al.*, 2011), mientras que ecotipos de otras plantas como *Brachypodium distachyon* Bd21, muestran efectos dramáticos desde los 2 días de tratamiento (Rivera-Contreras, *et al.*, 2016).

Aun considerando que *A. thaliana* es relativamente tolerante a la inundación cuando se le compara con otras plantas, posee entre sus ecotipos amplia variabilidad natural en tolerancia a

la inundación. Por ejemplo, los ecotipos C24, Lp2-6 y Kin-0, cuyas características se resumen en la Tabla 1, se reportan como los más tolerantes de un total de 86 ecotipos analizados (Vashisht, *et al.*, 2011). En contraste, otros ecotipos como Bay-0, Tanz y Cvi-0, resultan menos tolerantes. La diferencia de tolerancia entre los ecotipos contrastantes de *A. thaliana* va desde un tiempo letal de inundación (LT<sub>50</sub>) de 4 días para los susceptibles, hasta 10 días para los tolerantes.

Hasta ahora, el ecotipo más utilizado para el estudio de la tolerancia a inundación es Col-0, que presenta una tolerancia intermedia. Sin embargo, la existencia de ecotipos más tolerantes abre las oportunidades para indagar en los mecanismos de tolerancia más eficientes. A través del estudio de ecotipos de tolerancia a inundación contrastantes de *A. thaliana*, se ha demostrado que a nivel molecular, las diferencias en tolerancia se basan ajustes en el procesamiento de transcritos (splicing alternativo) y la plasticidad del transcriptoma ante las etapas tempranas del estrés (Van Veen *et al.*, 2016).

**Tabla 1.** Características de ecotipos de *A. thaliana* tolerantes a la inundación.

Ecotipo	Número (ABRC)	Roseta	Hojas	Tiempo a floración	Altura (cm)	Tolerancia a inundación
<b>C24</b>	CS78417	Pequeña	Numerosas y puntiagudas, márgenes dentados	Intermedio	43	Alta
<b>Lp2-6</b>	CS22595	Mediana	Márgenes lisos	Intermedio	37-43	Alta
<b>Kin-0</b>	CS78456	Medianas a grandes	Márgenes irregularmente aserrados	Intermedio	42-50	Alta

El empleo de ecotipos con variabilidad natural en tolerancia a la inundación ha demostrado ser una estrategia útil para la identificación de mecanismos y genes involucrados en la tolerancia. Adicionalmente, la disponibilidad de un amplio espectro de niveles de tolerancia a la inundación puede facilitar la selección de ecotipos modelo para el estudio funcional de genes a través de la transformación genética de *A. thaliana*.

#### 1.4. Transformación genética de plantas

La transformación genética es una estrategia biotecnológica para el desarrollo de plantas mejor adaptadas al cambio climático ya que permite modificar directamente las características de las plantas de cultivo (Mehrotra & Goyal, 2012; Ziemienowicz, 2014). Por otra parte, a nivel de investigación básica, la transformación genética de plantas modelo como *A. thaliana*, es una herramienta de utilidad para investigar las funciones de los genes y profundizar en el conocimiento de las bases biológicas de la tolerancia a diversos tipos de estrés ambiental.

La transformación de plantas se ha definido como la incorporación estable de genes foráneos y la expresión de éstos en las plantas transformadas (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). Dentro del núcleo de la planta, el ADN transferido es capaz de integrarse en el genoma para heredarlo a la siguiente generación (transformación estable). Alternativamente, el ADN extraño puede permanecer transitoriamente en el núcleo sin integrarse en el genoma, pero todavía puede transcribirse para producir productos genéticos deseables (transformación transitoria) (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017).

Se han desarrollado diversos métodos de transformación genética con la finalidad de hacer eficiente la transferencia de ADN hacia células o tejidos vegetales. Estos métodos pueden ser directos, implicando la transferencia de genes mediante procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica y mecánica (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). Ejemplos de métodos directos son la electroporación, el bombardeo de partículas, la filtración al vacío, el ultrasonido, la sonicación, la transformación mediada por fibras de carburo de silicio, la microinyección, macroinyección y el microláser (Leonor Rivera, *et al.*, 2012; Enikeev, 2018).

Por su parte, los métodos indirectos se basan en la utilización de vectores biológicos, empleando sus características naturales de patogenicidad en plantas, para la introducción de los genes de interés al genoma vegetal. Entre estos sistemas de transformación se ha descrito el uso de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y el uso de virus (Díaz Granados & Chaparro-Giraldo, 2012). En la Tabla 2 se enlistan métodos directos e indirectos usados para la transformación genética de *A. thaliana* y otras plantas.

Debido a limitaciones e inconvenientes de los métodos de transformación física, el método de transferencia de genes usando *Agrobacterium tumefaciens* sigue siendo el más utilizado y el más popular para la transformación genética de plantas de *A. thaliana* y plantas de cultivos (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Comparación de los métodos más populares para la transformación genética de *Arabidopsis thaliana*. Recuperada y modificada de (Leonor Rivera, *et al.*, 2012).

Método	Procedimiento	Ventajas	Desventajas
<b>Agrobacterium</b>	Una bacteria patógena introduce un gen portador de plásmido.	Integración precisa, herencia estable, inserciones de transgenes simples con extremos definidos y bajo número de copias, expresión génica consistente durante generaciones. Protocolos reproducibles y eficientes para muchos cultivos dicotiledóneos y algunos monocotiledóneos. Alta eficiencia.	Parámetros difíciles de manejar que afectan la eficiencia de transformación y la regeneración de la planta. Proceso lento. Introducción de vectores asociados innecesarios. Requiere protocolos de esterilidad.
<b>Electroporación</b>	Los impulsos eléctricos inducen la permeabilización de la membrana, lo que proporciona una fuerza motriz local para el transporte iónico y molecular a través de los poros.	Se puede aplicar a protoplastos vegetales. Sencillo, rápido y barato.	Protocolos laboriosos. A menudo requiere la formación de protoplastos. Depende de las características electrofisiológicas de la planta. Baja eficiencia de transformación.
<b>Biobalística</b>	Partículas metálicas cubiertas con genes que penetran la pared celular al ser aceleradas.	Fácil y no requiere tratamiento de la pared celular. Múltiples transgenes.	Costoso. Requiere consumibles continuos. El ADN puede ser dañado. Inserción de múltiples copias. Baja eficiencia y efectos no deseados.

### 1.5. Proceso natural de transformación de plantas mediada por *A. tumefaciens*

*Agrobacterium* es un grupo heterogéneo de microorganismos gramnegativos del suelo, que comprende cuatro especies, de las cuales tres son patógenas e inducen la formación de tumores en las plantas. Estas son *A. tumefaciens*, *A. rubi* y *A. rhizogenes*. Por su parte, una cuarta especie, *A. radiobacter*, prefiere un estilo de vida independiente (Enikeev, 2018). *Agrobacterium* es el único organismo celular en la Tierra que es naturalmente capaz de transferir material genético entre los reinos de la vida, desde procariotas a eucariotas (Mehrotra & Goyal, 2012).

*Agrobacterium tumefaciens* fue aislado hace más de 100 años. Puede infectar a la mayoría de las plantas dicotiledóneas y causar enfermedades tumorales, generalmente en la región de unión del tallo y la raíz (Nester, 2015; Guo, *et al.*, 2019). En la Tabla 3 se muestra la clasificación taxonómica de *A. tumefaciens*.

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *Agrobacterium tumefaciens*

<b>Dominio</b>	<b>Bacteria</b>
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Alphaproteobacteria
<b>Orden</b>	Rhizobiales
<b>Familia</b>	Rhizobiaceae
<b>Género</b>	<i>Agrobacterium</i>
<b>Especies</b>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

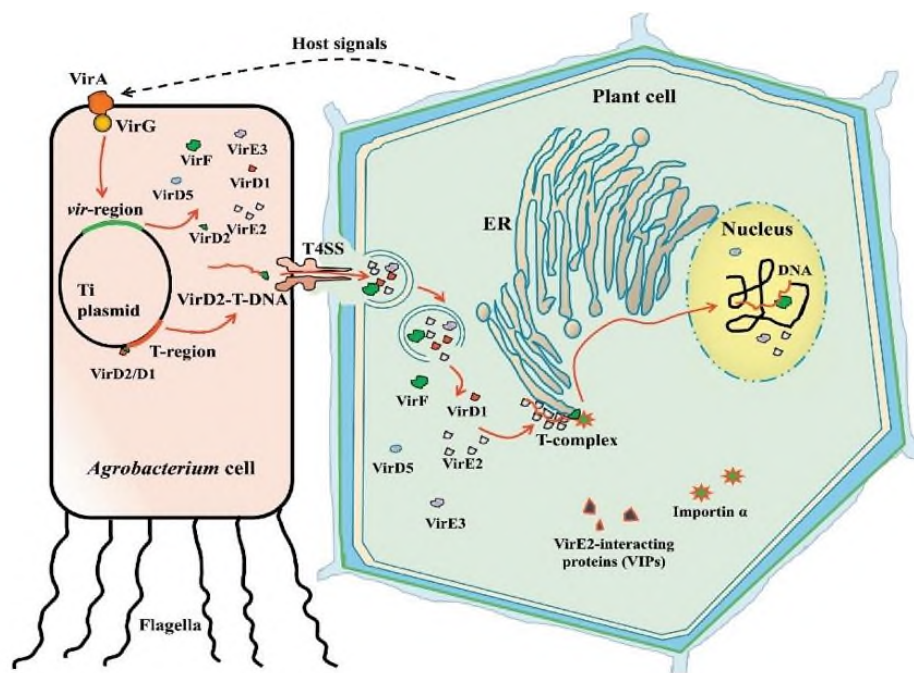
*Agrobacterium* transforma genéticamente a su huésped mediante la transferencia de un segmento de ADN bien definido (T-ADN), que es transportado de su plásmido inductor de tumores (Ti) al genoma de la célula huésped donde finalmente se integra en el genoma ( Tzfira & Citovsky, 2006; Gordon, J & Christie, P. 2014; Krenek, *et al.*, 2015).

El proceso de transformación genética de las plantas mediado por *A. tumefaciens* requiere la presencia de dos componentes genéticos ubicados en el plásmido Ti de la bacteria. El primer componente esencial es el T-DNA, rodeado por 25 pares de bases conservadas en los extremos

de la región T llamadas secuencias de borde ( Tzfira & Citovsky, 2006; Hau-Hsuan, *et al.*, 2017). El segundo componente es la región de virulencia (*vir*) que no se transfiere a la célula huésped, y está compuesta de aproximadamente siete loci (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF* y *virG*) que codifican para la mayoría de las proteínas de virulencia (proteínas Vir) requeridas para el transporte e integración del T-DNA en el genoma del huésped (Tzfira & Citovsky, 2003; Krenek, *et al.*, 2015). Las proteínas VirA y VirG son reguladores de dos componentes que activan la expresión de los genes virales VirB, VirC, VirD, VirE y quizás VirF, quienes están involucrados en el procesamiento, la transferencia y la integración del T-ADN de *A. tumefaciens* en una célula vegetal (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017).

En la naturaleza, al herirse las plantas segregan savia con un pH ácido, diferentes compuestos fenólicos, y ácidos necesarios para reparar el tejido dañado (Subramoni, *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos son la única señal absolutamente necesaria para iniciar la vía de señalización y la activación de los genes de virulencia de *Agrobacterium*, ya que interactúan directamente con la proteína sensorial transmembranal VirA. (Krenek, *et al.*, 2015).

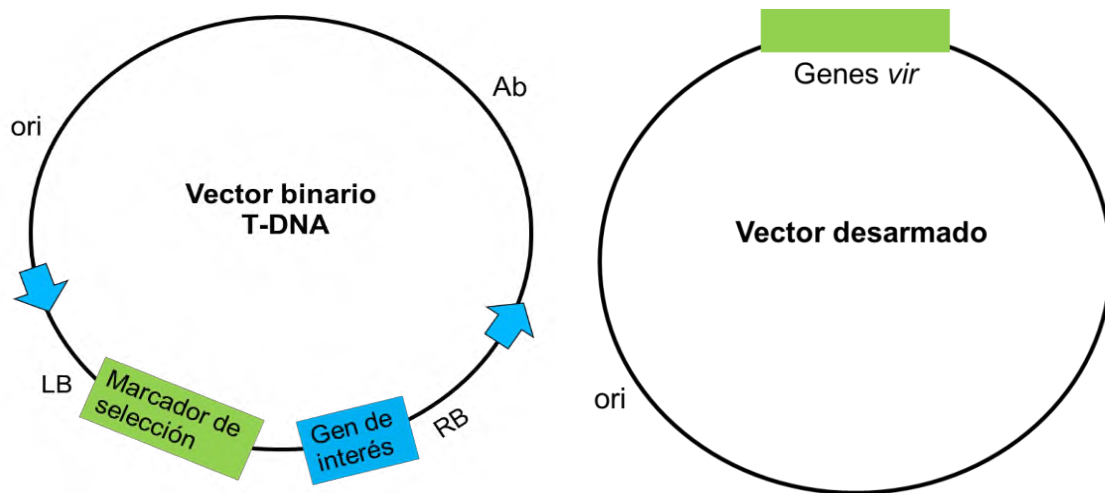
El proceso patogénico de *Agrobacterium* es complejo (Fig. 3). De manera simplificada, cuando la virulencia de *A. tumefaciens* se induce y se activa por la señal del huésped, la región del T-DNA se elimina del plásmido Ti y se forma en el T-DNA de una sola hebra. Después de que el T-DNA se transfiere a la célula huésped y se integra en el genoma del huésped, los genes en el T-DNA pueden expresarse en el huésped e inducir un tumor, ya que el T-DNA nativo lleva genes que codifican enzimas para la síntesis de hormonas vegetales (citoquinina y auxina) y opina, siendo estas hormonas las responsables de la formación de tumores en las plantas. El T-ADN nativo puede ser reemplazado por cualquier secuencia de ADN de interés sin ningún efecto sobre la transferencia de ADN de *A. tumefaciens* al huésped (Guo, *et al.*, 2019). Este fenómeno es la base de la ingeniería genética para la transformación de plantas mediante *Agrobacterium*.



**Figura 3.** Diagrama simplificado del mecanismo molecular de transferencia de T-ADN mediado por *Agrobacterium* (Guo, *et al.*, 2019).

### 1.6. Protocolos de transformación de plantas mediante *A. tumefaciens*

Una de las estrategias más importantes para mejorar la aplicación de la transformación genética mediada por *Agrobacterium* fue el desarrollo del sistema de transformación binario, en el cual las dos regiones funcionales del plásmido Ti, que son la región Vir y la región T-DNA, se separan en dos plásmidos (Lee & Gelvin, 2008). El plásmido que contiene la región Vir es además desprovisto de la región oncogénica, y se llama así, plásmido desarmado (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017). El vector binario diseñado, que es propiamente el vector que contiene el T-DNA, contiene típicamente sitios para el inicio de la replicación en *Escherichia coli* y *Agrobacterium*, un marcador de selección de resistencia a antibióticos, un gen reportero y una región de T-DNA para la inserción del gen de interés (Lee & Gelvin, 2008). En la Fig. 4 se muestra la estructura típica de un sistema de vector binario para la transformación con *Agrobacterium*.



**Figura 4:** Sistema de vector binario para la transformación con *Agrobacterium*.  
Modificada de Lee & Gelvin (2008).

La agrotransformación se ha optimizado mejorando diversos aspectos del protocolo básico, entre los cuales destacan la competencia del tejido vegetal y la virulencia de *Agrobacterium* mediante el control de la temperatura, el pH y la adición de metabolitos inductores como la acetosiringona, el aumento de la densidad bacteriana, el uso de vacío para infiltrar, la duración del cocultivo planta-*Agrobacterium*, y la adición de biosurfactantes (Clough & Bent, 1998; Zhang, *et al.*, 2006). Más recientemente, se ha empleado la presión atmosférica negativa del explante, el magnetismo y la radiación gamma para incrementar la frecuencia de transformación de *Agrobacterium*.

Otro aspecto que es importante en la agrotransformación es el tipo de tejido o células a transformar. En muchos casos, se requiere una cuidadosa preparación de células o tejidos vegetales y la introducción de ADN usando *Agrobacterium tumefaciens* (Clough & Bent, 1998), seguido de la selección y regeneración de plantas transgénicas de las células transformadas a través de técnicas de cultivo de tejidos. Estos métodos de transformación requieren tiempo, mano de obra calificada e instalaciones de laboratorio relativamente caras (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017). Es por ello que desde el primer uso de *Agrobacterium* para la transformación de la planta ha existido un interés significativo en el desarrollo de métodos de transformación que no dependan de regeneración a través de cultivo de tejidos. Tal es el caso del método desarrollado por Clough y Bent (1998) llamado Floral Dip (inmersión floral) para *Arabidopsis*.

### 1.6.1. Método de inmersión floral

El método de inmersión floral es el protocolo más ampliamente utilizado para la producción de *Arabidopsis thaliana* transgénicas por su facilidad, ya que consiste en sumergir órganos florales de la planta en una suspensión que contiene *Agrobacterium* transformada con la construcción de interés. Este método ofrece varias ventajas, en primer lugar, se requiere un trabajo mínimo, un equipo relativamente barato, y puede ser realizado fácilmente por no especialistas ( Zhang, *et al.*, 2006). En segundo lugar, es fácilmente escalable y por lo tanto permite la producción de un gran número de líneas transgénicas dentro de un corto período de tiempo, lo que reduce al mínimo la mano de obra ( Zhang, *et al.*, 2006). Además, este método fue desarrollado para excluir por completo el requisito de cultivo de tejidos de plantas o etapas de regeneración, por lo tanto, se reduce la tasa de mutagénesis y variaciones somaclonales inducidas a través del cultivo *in vitro* (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017).

Se ha demostrado que los tres requisitos principales para una transformación exitosa son: (1) selección de la etapa correcta de desarrollo de la planta (número máximo de grupos de yemas florales sin abrir); (2) azúcar; y (3) surfactante (Silwet L-77) y / o vacío para ayudar a la infiltración (Clough & Bent, 1998). Las frecuencias de transformación generalmente oscilan entre el 0.1 y el 3 % de las semillas obtenidas después de la inmersión floral. Estos porcentajes de transformación, así como las plantas recalcitrantes, es decir, plantas que se resisten a la transformación, se pueden explicar dado que el acceso de las bacterias a los gametofitos femeninos puede ser limitado, por ejemplo, porque solo unas pocas flores tienen la morfología y la etapa de desarrollo adecuadas para que las bacterias ingresen al óvulo (Ghedira, *et al.*, 2013).

Una vez obtenidas las semillas, como en cualquier método de transformación, se debe realizar un escrutinio para explorar su capacidad de germinar en medios selectivos de acuerdo a los marcadores de selección incluidos en el plásmido, y mediante prueba directa de la presencia del transgén por PCR.

## 1.7 *A. thaliana* como modelo para el estudio de la tolerancia a la inundación empleando transformación genética

*A. thaliana* es fácilmente transformable por *Agrobacterium* mediante el método de inmersión floral, lo que ha facilitado su empleo como modelo para el estudio de la función de los genes a través de mutantes de inserción de T-DNA, o a través de la transformación directa con genes de interés (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017). Debido a su facilidad de transformación *A. thaliana* es un buen modelo de estudio de la tolerancia a la inundación que se ha empleado para investigar la importancia de una variedad de genes. Por ejemplo, mediante la agrotransformación de *A. thaliana* con el gen RAP2.2, que codifica un factor de transcripción APETALA2, se observó un aumento de la tolerancia a la hipoxia en las plantas transformadas. Por otra parte, las plantas transformadas con una inserción de TDNA en el gen RAP2.2 (mutantes knockout), fueron más susceptibles a la hipoxia, incluso más que las plantas silvestres (Hinz *et al.*, 2010).

En un trabajo posterior, se generaron plantas de *A. thaliana* agrotransformadas para sobre-expresar el gen que codifica al factor de transcripción HaWRKY76 (Rainieri *et al.*, 2018). Estas plantas resultaron ser más tolerantes a la inundación, sin producir defectos de desarrollo o penalidades de rendimiento de biomasa, y con mayor desarrollo de aerénquima y estabilidad de membranas que los controles no transformados. En dicho estudio también se concluyó que la tolerancia superior estaba relacionada con una producción menor de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disminución del metabolismo de carbohidratos (Rainieri *et al.*, 2018).

Por otra parte, los genes codificantes de aminociclopropano-1-carboxylato (ACC) oxidasa, y ACC deaminasa, fueron investigados por grupos independientes por su implicación en la tolerancia a inundación. Estas enzimas actúan antagónicamente en la síntesis de etileno. Por una parte, la ACC oxidasa la promueve, mientras que la ACC deaminasa la inhibe. En el primer caso, la ACC oxidasa (ACCO) de *A. thaliana*, fue sobre-expresada bajo el control de un promotor constitutivo en *A. thaliana* mediante agrotransformación (Ramadoss *et al.*, 2018). Las plantas transformadas fueron capaces de tolerar hasta 35 días al tratamiento de inundación, mientras que las no transformadas solo sobrevivieron a 20 días de tratamiento, mostrando el potencial de la ACCO en el mejoramiento de la tolerancia a la inundación. En el otro caso, la enzima ACC deaminasa (ACDS) de origen bacteriano (*Pseudomonas veronii*) se sobreexpresó por agrotransformación en *A.*

*thaliana* (Jung *et al.*, 2018). De forma interesante, las plantas transgénicas mostraron un incremento en la tolerancia a la inundación y al estrés salino, sugiriendo que la disminución en la acumulación de etileno en la respuesta a la inundación podría resultar benéfico para disminuir los cambios que se regulan por esta molécula, como la abscisión y el arresto del crecimiento y desarrollo (Jung *et al.*, 2018).

Adicionalmente, el gen ANAC017, que codifica un factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés oxidativo asociado a la sumersión, se sobreexpresó por agrotransformación en *A. thaliana* y se analizó a través de la etapa juvenil y adulta de la planta (Bui *et al.*, 2020). En este estudio se observó que ANAC07 contribuye positivamente a la tolerancia a la inundación en *A. thaliana*, y que las diferencias en tolerancia que se observan entre las etapas de desarrollo podrían estar originadas por el estado de la cromatina de las regiones de ADN a las que se une ANAC017.

Todos los estudios mencionados demuestran la utilidad del empleo de *A. thaliana* como planta modelo para la elucidación de las bases de la tolerancia a la inundación a través de la agrotransformación. Todos los estudios emplearon el ecotipo Col-0, por lo que aún existe un gran número de ecotipos por evaluar en su capacidad para ser transformados por *Agrobacterium*. Esto permitiría ampliar el catálogo de ecotipos seleccionables para transformar y considerar la elección de respuestas basales que permitan explorar todo el potencial funcional de los genes de interés en la respuesta a la inundación.

Por todo lo anterior, *A. thaliana*, con todas las características deseables de una planta modelo y su amplia variabilidad natural, posee potencial para revelar la función de genes en la respuesta a la inundación, y para lograrlo, es necesario investigar la susceptibilidad de diferentes ecotipos de *A. thaliana* a la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

## 1. JUSTIFICACIÓN

El aumento en la cantidad de CO<sub>2</sub> atmosférico es en gran medida responsable del cambio climático (Caballero, *et al.*, 2007). Según las estimaciones, es muy probable que para finales de este siglo sean más intensos y más frecuentes los episodios de precipitación extrema (IPCC, 2014), y por esta razón, la producción de alimentos se verá amenazada debido a que la mayoría de las especies vegetales de interés agrícola son muy sensibles a la inundación. Por consiguiente, es urgente el desarrollo de cultivos de alto rendimiento que sean más tolerantes al estrés provocado por las inundaciones (Voeselek, *et al.*, 2016).

La transformación genética es una herramienta de la biotecnología vegetal que permite la transferencia de características agronómicas deseables a plantas de cultivo. Desde su perspectiva más básica, la transformación permite también la investigación de la función de los genes. *Arabidopsis thaliana* es una planta modelo fácilmente transformable por *Agrobacterium tumefaciens*, vía inmersión floral.

Por otra parte, *A. thaliana* posee diversidad genética natural en su capacidad para tolerar la inundación. Recientemente se reportó la identificación de varios ecotipos tolerantes a la inundación (Lp2-6, Kin-0 y C24) (Vashisht, *et al.*, 2011) que podrían servir como modelos funcionales para probar estrategias biotecnológicas para el aumento de la tolerancia al estrés por inundación en plantas con importancia agrícola, así mismo, dichos ecotipos son un buen modelo de estudio para revelar la función de genes en la respuesta al estrés por inundación. Para esto, es necesario establecer protocolos de transformación genética estable para estos ecotipos (Ghedira, *et al.*, 2013). Al mismo tiempo, utilizando el método de inmersión floral para los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24, será posible identificar una cepa de *Agrobacterium* que pueda resultar en una frecuencia de transformación elevada en dichos ecotipos.

## 2. HIPÓTESIS

Los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* tolerantes a la inundación (Lp2-6, Kin-0 y C24) tendrán diferentes susceptibilidades de transformación genética con las cepas (GV3101, GV2260 y EHA105) de *Agrobacterium tumefaciens*.

## 3. OBJETIVOS

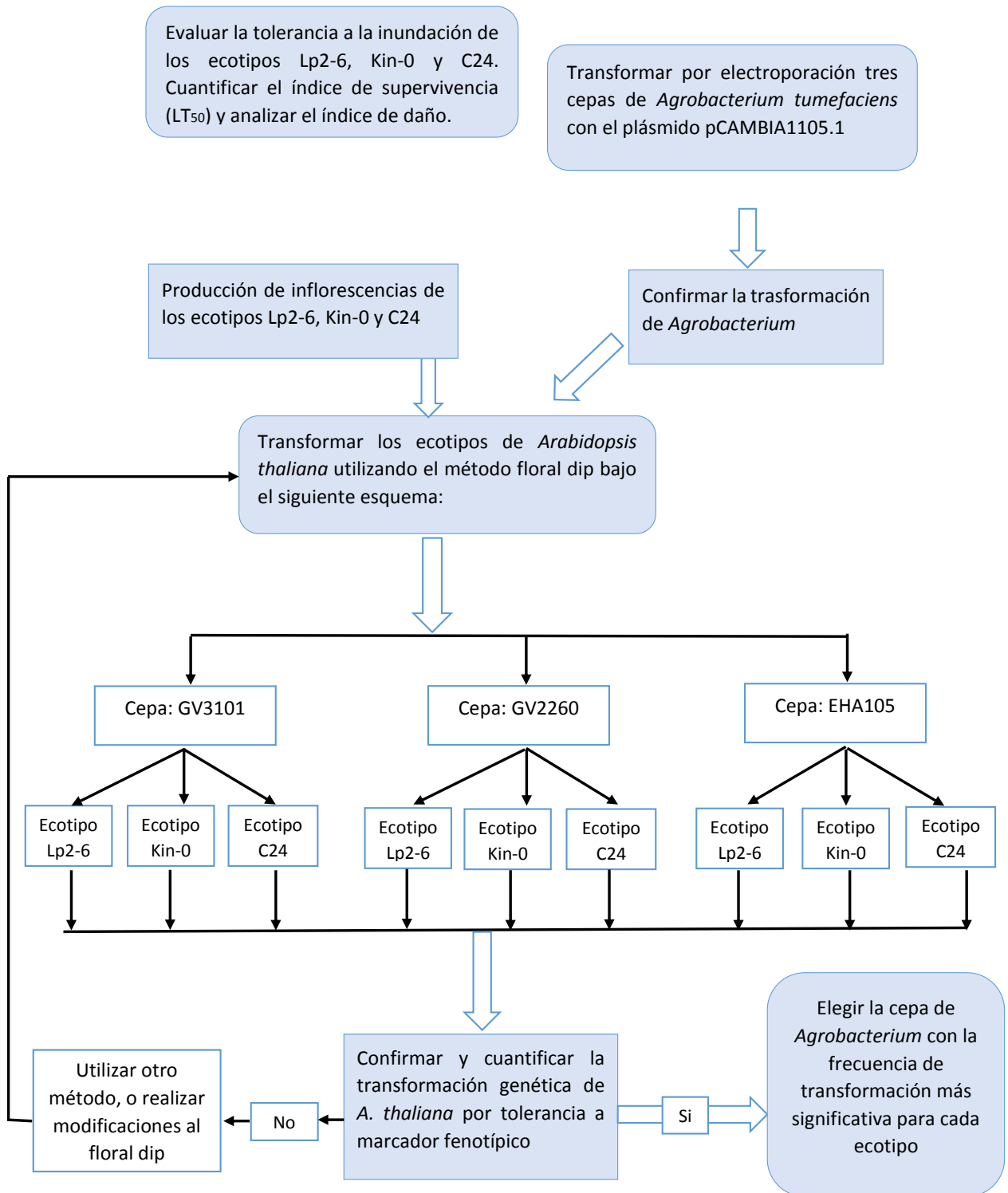
### 4.1. Objetivo general

Implementar un protocolo de agrotransformación y analizar su frecuencia de transformación en ecotipos de *A. thaliana* tolerantes a la inundación (Lp2-6, Kin-0 y C24).

### 4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Evaluar la tolerancia a la inundación de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* reportados como tolerantes (Lp2-6, Kin-0 y C24) con respecto a Col-0.
- 4.2.2. Transformar por electroporación tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido binario pCAMBIA1105.1.
- 4.2.3. Transformar genéticamente por el método de inmersión floral los ecotipos de *A. thaliana* (Lp2-6, Kin-0 y C24) con tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens*.
- 4.2.4. Determinar la frecuencia de transformación de los tratamientos resultantes de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Lp2-6, Kin-0 y C24) con las cepas empleadas.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Obtención del material vegetal

Las semillas de los ecotipos (C24, Lp2-6 y Kin-0) utilizados en el presente trabajo se obtuvieron del Centro de Recursos Biológicos de *Arabidopsis* (ABRC) con número de catálogo CS78417, CS22595, CS78456 respectivamente. Para la obtención de las plantas, las semillas de los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 se desinfectaron en tubos eppendorf agregando 1 ml de etanol al 70% (v/v) y agitando constantemente por 5 minutos. Se desechó el etanol y se continuó con el lavado agregando 1 ml de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 50 % (preparado con agua destilada estéril). Se agitó por 2 minutos, se desechó el cloro y se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril (deH<sub>2</sub>O). Para finalizar, las semillas se resuspendieron en 1 ml de agua deH<sub>2</sub>O y se incubaron por 7 días a 4 °C para detener la dormancia.

Después de la incubación, para iniciar el proceso de germinación se sembraron entre 30 y 35 semillas bajo condiciones de esterilidad en cajas Petri con medio MS estéril (sales MS 0.5X, sacarosa 1 %, agar 1 %, pH 5.7) (Anexo 1). Las cajas Petri sembradas se colocaron verticalmente en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo corto de 8 h luz y 16 h oscuridad a 23 °C por 7 días. Las plántulas desarrolladas se sembraron en macetas que contenían una mezcla húmeda de sustrato y perlita, enriquecida con fertilizante Nitrofoska 12-12-17 (N, P y K) (Anexo 2). Las macetas se colocaron en el cuarto de crecimiento con un fotoperiodo corto de 8 h luz y 16 h oscuridad y se regaron cada dos días durante 2 semanas, siendo éste el tiempo aproximado en alcanzar una edad de 10 hojas.

### 6.2. Ensayo de inundación

Los ensayos de inundación se realizaron bajo condiciones de oscuridad. Todas las plantas utilizadas se crecieron bajo las mismas condiciones previamente descritas en la sección 6.1.

Un día antes del inicio de los experimentos de inmersión, se seleccionaron 54 macetas homogéneas por ecotipo para sumergirlas; 54 para controles en condiciones de oscuridad no sumergidas y 9 por ecotipo para controles de luz. Las 54 macetas con 4 plantas cada una, se sumergieron suavemente de manera aleatoria en diferentes tinas de plástico desinfectadas, que se llenaron con agua hasta el borde un día antes del inicio del experimento y se colocaron en el

cuarto de crecimiento a 23 °C. Las plantas de control se colocaron en tinas similares sin agua en el mismo cuarto. El rescate de las plantas tuvo lugar en puntos de tiempo predeterminados (bajo una lámpara de luz verde) mediante la colecta de 3 macetas por ecotipo de las tinas inundadas, así como sus respectivos controles de oscuridad. Se dejó que las plantas rescatadas se recuperaran durante 6 días en un cuarto de cultivo con un fotoperiodo corto de 8 h luz y 16 h oscuridad a 23 °C. Para llevar un registro visual, se tomaron fotografías inmediatamente después del rescate de las plantas y diariamente durante los 6 días de recuperación. Del mismo modo, se recolectaron datos fisiológicos en las hojas, tales como clorosis, necrosis y número de hojas sanas, se calculó el tiempo letal 50 (LT<sub>50</sub>) haciendo uso del servidor ic50.tk.

### **6.3. Plásmido pCAMBIA1105.1**

Se utilizó el plásmido binario pCAMBIA1105.1 (Fig. 5), donado por el Dr. Edgar García López del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec. El plásmido binario pCAMBIA1105.1 (Figura 5) alberga un gen de resistencia espectinomicina y estreptomomicina, por lo tanto, las células de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas poseen resistencia a dichos antibióticos. Además, contiene un T-ADN que confiere resistencia a higromicina a plantas transformadas.

### **6.4. Transformación de células competentes de *E. coli***

Se utilizaron las células de *Escherichia coli* One Shot Top 10 del catálogo #C4040-03 para 20 reacciones. Las células top 10 almacenadas a -80 °C, se descongelaron en hielo y se agregaron 5 µl de ADN plasmídico pCAMBIA 1105.1 (1-5 µl de 10 ng a 100 ng) en el vial con 50 µl de células competentes de *E. coli* y se mezclaron suavemente. Posteriormente, se enfrió el vial en hielo por 30 minutos, seguido de un choque térmico por 30 segundos a 42 °C sin agitación. Inmediatamente después se colocó el vial en hielo por 2 minutos. En condiciones de esterilidad, usando una campana de flujo laminar, se agregaron 250 µl de medio LB estéril (anexo 3), para posteriormente incubar el vial a 37 °C por una hora con agitación a 225 rpm. Pasado el tiempo se depositó 100 µl de cada transformación en cajas Petri con medio LB sólido adicionadas con espectinomicina (50 µg/ml) como antibiótico de selección (el antibiótico fue previamente esterilizado por filtración



tubos eppendorf se añadió 10 µl de la mezcla de reacción 3.4X y 10 µl del ADN plasmídico diluido. Enseguida los tubos se incubaron a 37 °C durante 40 minutos.

<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción para digestión del plásmido pCAMBIA 1105.1 extraído de <i>e. coli</i>		
Componente	Volumen (µl)	3.4X (µl)
Agua	6	20.4
Buffer	2	6.8
Enzimas: BglII	1	3.4
EcoRI	1	3.4
ADN diluido	10	
Volumen total	20 µl	34 µl

Los productos de la digestión obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1% en una cámara de electroforesis con el buffer TAE al 1X. Una vez terminada la electroforesis el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio con una concentración de 1 µg/ml durante 2 minutos, y después se enjuagó en agua desionizada durante 5 minutos. Posteriormente, el gel se visualizó en un fotodocumentador con lámpara UV. Los volúmenes de carga se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Mezcla de reacción para electroforesis del plásmido extraído y digerido de *E. coli*.

ADN ladder	Plásmido sin digerir	Plásmido digerido
4 µl de H <sub>2</sub> O	10 µl de H <sub>2</sub> O	0 µl
1 µl de buffer 6X	4 µl de buffer 6X	4 µl de buffer 6X
1 µl ladder	10 µl de plásmido	20 µl de digerido
6 µl	24 µl	24 µl

### **6.5. Preparación de células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens***

Las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 de *A tumefaciens*, 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.

Las bacterias se cultivaron en 5 ml de medio LB líquido estéril sin antibióticos. Posteriormente, los tubos se incubaron en oscuridad con agitación constante a 28 °C y 190 rpm durante 40 horas. Este cultivo bacteriano se utilizó para inocular con 500 µl un volumen de medio contenido en matraces de 50 ml en condiciones de esterilidad, mismos que se incubaron bajo las mismas condiciones monitoreando la densidad óptica (DO) hasta alcanzar una DO de 0.5-0.7 a 600 nm para garantizar que el cultivo se encontraba en fase exponencial. Este proceso requirió aproximadamente 8 horas. Una vez alcanzada la DO requerida, los matraces se colocaron en hielo por 30 minutos, y el cultivo se recuperó mediante centrifugaciones secuenciales a 5000 rpm por 20 min a 4 °C (Centrífuga Universal) en tubos Falcon de 15 ml estériles hasta agotar el contenido del matraz. El sedimento se resuspendió en un volumen inicial (14 ml) de agua desionizada estéril fría. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en la mitad del volumen inicial (7 ml) con agua desionizada estéril, se centrifugó a 5000 rpm por 20 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Después, se resuspendió en 1/10 del volumen inicial con glicerol al 10 % estéril frío (1.4 ml) y nuevamente se centrifugó a 5000 rpm por 20 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Por último, el sedimento se resuspendió en 1/100 del volumen inicial del cultivo en glicerol al 10 % frío (140 µl), se disolvió suavemente y se hicieron alícuotas de 40µl en tubos Eppendorf estériles bien etiquetados, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

### **6.6. Electroporación de *Agrobacterium tumefaciens***

Las células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* almacenadas a -80 °C se descongelaron en hielo. En condiciones de esterilidad, se agregaron 50 µl de *Agrobacterium* a la celda de electroporación y se añadió el plásmido a una concentración de 50 ng/µl, se mezclaron suavemente, y el equipo se configuró con las condiciones precargadas para las células de *Agrobacterium* (Agr: 4.8-5 kV de 5-5.8 ms). Una vez dado el pulso, en condiciones de esterilidad,

se agregó 1 ml de medio LB líquido estéril sin antibióticos, se mezcló por inversión suave y se transfirió por decantación en tubos Eppendorf estériles. Los tubos se incubaron por 3 horas a 28 °C a 200 rpm. Una vez concluida la incubación, 1 ml de las células transformadas se esparcieron en cajas Petri con medio LB sólido estéril con antibióticos de selección (50 µg/ml) y se cultivaron en una incubadora a 28 °C por 2 días.

#### 6.6.1. Extracción y digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 de *Agrobacterium tumefaciens*

Para confirmar la transformación de las células de *A. tumefaciens*, se realizó una extracción del plásmido pCAMBIA1105.1 con la metodología descrita en el anexo 4 de dos colonias transformadas de cada cepa de *A. tumefaciens* (GV3101, GV2260 y EHA105). Posteriormente se realizó una doble digestión del ADN plasmídico con las enzimas de restricción específicas EcoRI y BglII para obtener bandas de peso molecular conocidas, tal como se describe en la sección 6.4.1.

#### 6.7. Ensayo de tolerancia a antibióticos de los ecotipos silvestres

El plásmido pCAMBIA1105.1 contiene un T-ADN que confiere resistencia a higromicina, lo que permite emplearlo como marcador de selección. Para confirmar en principio que los ecotipos Lp2-6, Kin-0, C24 y Col-0 no son naturalmente resistentes a higromicina, ni a la cefotaxima que se empleó para eliminar las bacterias de *A. tumefaciens* que pudieran sobrevivir al proceso de desinfección de las semillas, se realizaron ensayos de tolerancia. Para esto, las semillas de los cuatro ecotipos silvestres fueron desinfectadas y almacenadas a 4 °C por 7 días, y posteriormente sembradas (entre 30 y 35 semillas) en cajas Petri con medio MS sólido estéril con higromicina y cefotaxima a diferentes concentraciones. Las cajas Petri se colocaron verticalmente en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo largo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 23°C durante 8 días. Los tratamientos para cada ecotipo se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Dosis de exposición a antibióticos en ecotipos silvestres.

Ecotipos	Antibiótico	Concentración (µg/ml)
Lp2-6, Kin-0, C24 y Col-0	Sin antibiótico	
Lp2-6, Kin-0, C24 y Col-0	Higromicina	25, 50, 100, 150
Lp2-6, Kin-0, C24 y Col-0	Cefotaxima	100 y 400

## 6.8. Transformación genética de los ecotipos de *A. thaliana* (Lp2-6, Kin-0 y C24) utilizando el método de inmersión floral.

### 6.8.1. Obtención del material vegetal

Todas las plantas utilizadas en la transformación genética se crecieron bajo las mismas condiciones previamente descritas en la sección 6.1, con la única diferencia, de que las plantas utilizadas para este experimento, se cultivaron con un fotoperiodo largo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 23 °C. Se regaron cada dos días durante aproximadamente 4 semanas, siendo éste el tiempo aproximado de la floración. Se cortaron los primeros tallos para permitir la proliferación de inflorescencias secundarias de las yemas axilares de la roseta, las cuales volvieron a cortarse. La transformación se realizó en flores no abiertas, 4 días después del último corte.

### 6.8.2. Transformación de ecotipos de *A. thaliana* por inmersión floral

De cada una de las cepas de *A. tumefaciens* GV3101, GV2260 y EHA105 transformadas con el plásmido pCAMBIA1105.1, se seleccionó una colonia para ser utilizada en la transformación de los ecotipos Lp2-6, Kin-0, C24 de *A. thaliana* de aproximadamente 4 semanas de edad, mediante el método de inmersión floral descrito por ( Zhang, *et al.*, 2006). Brevemente, este método consiste en sumergir brotes florales de *A. thaliana*, (Figura 6) en una suspensión celular de *A. tumefaciens* portadora el plásmido pCAMBIA1105.1 que contiene un T-DNA que confiere tolerancia a higromicina. Se realizaron 6 montajes experimentales independientes, y en cada experimento fue sumergida una maceta por ecotipo, con 5 plantas, en el mismo cultivo de *Agrobacterium*.



**Figura 6.** Transformación genética por el método de inmersión floral

Para la transformación se empleó el protocolo clásico ( Zhang, *et al.*, 2006) que se describe a continuación. Se cultivaron las cepas de *Agrobacterium* previamente transformadas con el plásmido pCAMBIA1105.1 que confiere tolerancia a espectinomicina. Para esto se inoculó una colonia aislada única de *Agrobacterium* en 5 ml de medio LB líquido estéril suplementado con espectinomicina 50 µg/ml. El cultivo se incubó a 28 °C y 190 rpm durante 2 días y posteriormente se utilizó este cultivo para inocular 500 ml de medio LB líquido estéril con espectinomicina 50 µg/ml. El cultivo se desarrolló a 28 °C y 190 rpm monitoreando la densidad óptica (DO) requerida de aproximadamente 1.5-2.0, para utilizar exclusivamente células que crecen hasta la fase estacionaria.

Una vez alcanzada la fase de crecimiento estacionaria, se recolectaron las células de *A. tumefaciens* por centrifugación a 4,000 g en tubos Falcon de 50 ml durante 10 minutos a temperatura ambiente hasta agotar el contenido del cultivo. El sedimento bacteriano se resuspendió suavemente en 500 ml de una solución recién preparada de sacarosa al 5% p/v (peso/volumen) y Silwet L-77 a una concentración de 0.02 % (v/v) (100 µl por 500 ml de solución). Las plantas se sumergieron en esta suspensión de células durante 10 s con agitación suave, tratando que todas las flores se encontraran inmersas en la solución y evitando que el líquido entrara en contacto con la tierra. Realizado lo anterior, se retiraron las plantas sumergidas en la solución y se drenó el exceso de líquido durante 3-5 s. Luego, las macetas se envolvieron con plástico negro y se colocaron sobre sus lados durante 24 h para mantener la humedad alta. Se almacenaron a 23 grados en condiciones de oscuridad. La suspensión bacteriana restante se trató con 1 volumen de cloro comercial para matar las bacterias y ser desechadas de una manera segura.

Al día siguiente se retiró el plástico de las macetas, y las plantas se enviaron de vuelta al cuarto de crecimiento, donde se dejaron crecer hasta la obtención de semillas maduras por aproximadamente 4 semanas. Se recolectaron las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron manualmente de los restos de vainas y tierra, y se conservaron a 23 °C hasta el momento de su análisis.

### 6.9. Selección de transformantes de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas recolectadas en las seis tandas de transformación fueron desinfectadas como se explicó en la sección 6.1, ~3000 semillas por ecotipo y por cada tanda de transformación en tubos eppendorf de 1.5 ml con 1000 semillas cada uno (50 mg = 2,000 semillas ( Ghedira, et al., 2013)). Luego se sembraron en cajas de Petri con medio MS suplementado con higromicina 25 µg/ml utilizado como antibiótico de selección, más 50 µg/ml de cefotaxima para inhibir el crecimiento de las células de *Agrobacterium* que podrían aún estar presentes.

Las cajas Petri con semillas sembradas fueron colocadas horizontalmente en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo largo de 16 h luz y 8 h oscuridad a 23 °C. Después de 7-10 días, los transformantes se distinguieron fácilmente como plántulas con cotiledones verdes, hojas y raíces verdaderas que se extienden al medio selectivo. Por su parte, las plántulas no transformadas también germinaron, pero sus cotiledones se tornaron de un color amarillo y murieron muy pronto.

La frecuencia de transformación se calculó como  $[(\# \text{ plántulas resistentes a higromicina}) / (\# \text{ total de plántulas analizadas})] \times 100$ . Para analizar las frecuencias de transformación y determinar si existen diferencias entre los tratamientos, se realizó un ANOVA de dos vías con una prueba Tukey a una significancia de  $p=0.05$  con el programa estadístico IBM SPSS Statistics 25 (anexo 5).

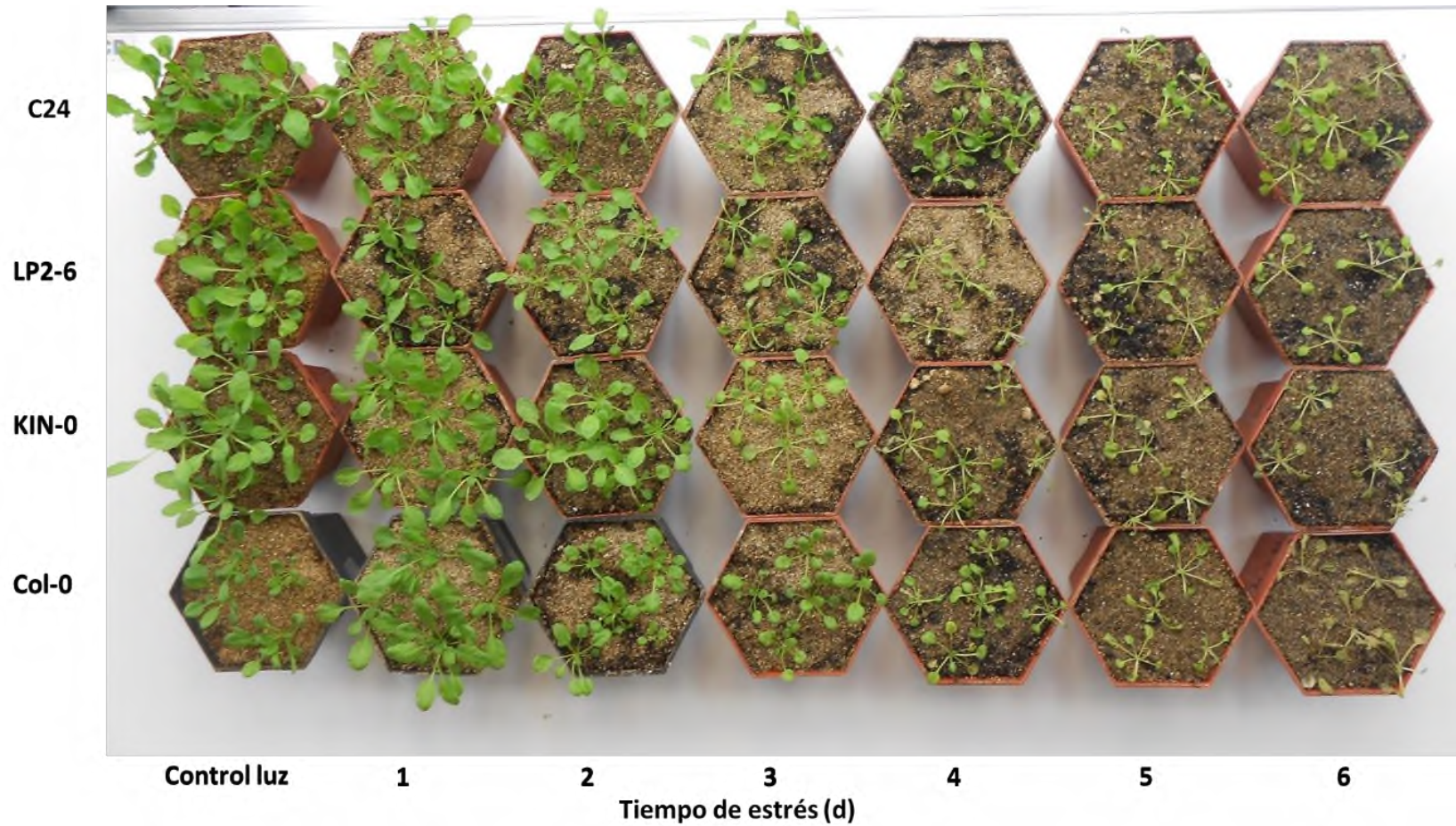
## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Ensayo de inundación

En el 2011 se analizaron 86 ecotipos *Arabidopsis thaliana*, de los cuales C24, Lp2-6 y Kin-0 se reportaron como tolerantes a la inundación, mientras que el ecotipo Col-0 se clasificó en el nivel de tolerancia intermedia (Vashisht, *et al.*, 2011).

Para confirmar la tolerancia a la inundación previamente reportada en los tres ecotipos bajo estudio, se realizó un primer ensayo de inundación con los días 6, 9, 12 y 15, utilizando el ecotipo Col-0 con tolerancia intermedia como control. Los principales cambios fisiológicos que se observaron en los tres ecotipos se manifestaron en las hojas con síntomas de clorosis y necrosis. Al rescatar las plantas del agua el daño no era visible. Sin embargo, después de 9 días de estrés más 6 días de recuperación se observó la muerte de las plantas. En el primer ensayo únicamente se obtuvieron datos de los individuos sumergidos por 6 días, ya que para los 9, 12 y 15 días, el estrés fue muy intenso y ninguna planta sobrevivió pasado el lapso de recuperación. Es por ello, que el siguiente ensayo se delimitó a una duración de 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días. Con estos tiempos, se realizaron 2 experimentos independientes y se tomaron datos fisiológicos de clorosis, necrosis y hojas sanas.

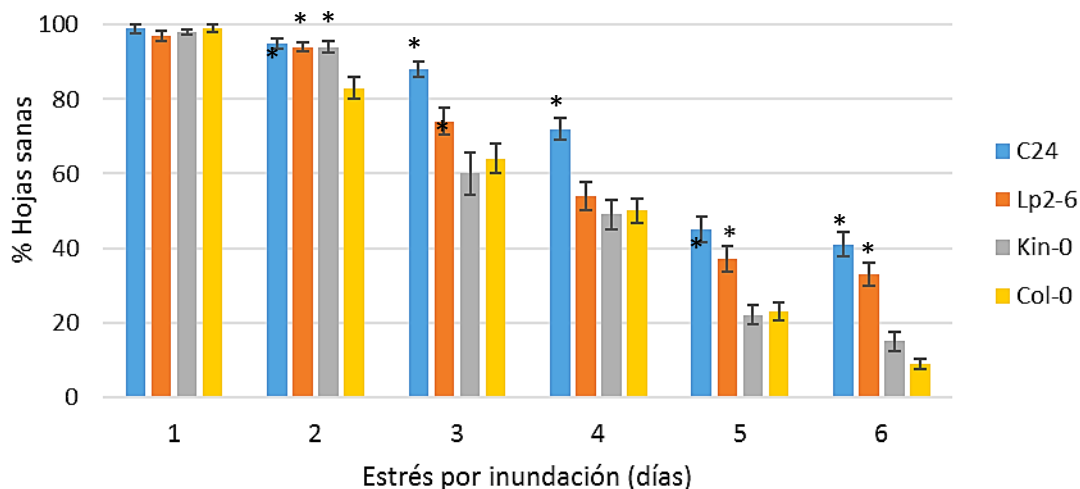
En los días 1 y 2 de estrés, y tras 6 días de recuperación, no se producen afectaciones severas. Comparados con los controles, el daño empieza a ser visible en los individuos con más de 3 días de estrés; la mayoría presentó clorosis o necrosis, sin embargo, es hasta 4 días de estrés, con tres días recuperación donde el daño empieza a ser más evidente (Figura 7).



**Figura 7.** Plantas de los cuatro ecotipos de *Arabidopsis thaliana* sometidos a estrés por inundación. Plantas con 24 días de edad y fotografiadas con 6 días de recuperación después del tiempo de estrés indicado.

### 7.1.1. Porcentaje de supervivencia de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de supervivencia de los cuatro ecotipos. Para esto, se tomaron datos de hojas sanas (sin marchitamiento o necrosis) por individuo y días de estrés. Los datos se tomaron cuando cada colecta tenía 6 días de recuperación posteriores al estrés por inundación. De acuerdo a los resultados, se observó que conforme aumentaron los días de estrés las plantas sufrieron un mayor daño, lo que dificultó su recuperación en los 6 días posteriores a su rescate de la inundación (Fig. 8). El ecotipo C24 presentó el mayor porcentaje de hojas sanas, mientras que los ecotipos Lp2-6 y Kin-0 resultaron con mayor afectación. Con base en estas observaciones, el orden de supervivencia para los tres ecotipos concuerda con lo reportado por Vashisht, *et al.*, (2011).



**Figura 8.** Porcentaje de hojas sanas por ecotipo de *Arabidopsis thaliana* después de seis días de recuperación posteriores al estrés por inundación. Corresponde a los datos de 2 experimentos independientes  $\pm$  D.E. \* indica diferencias significativas entre los ecotipos C24, Lp2-6 y Kin-0 respecto a Col-0, prueba t de Student  $p < 0.05$ . Los días corresponden a la duración del estrés.

Para el ecotipo Kin-0 no se presentaron afectaciones severas durante los primeros dos días de estrés, sin embargo, en el tercer día de estrés ocurrió una caída al 60 % de hojas vivas y no existe diferencia estadística comparado con el ecotipo Col-0; en cambio, para el ecotipo Col-0 con tolerancia intermedia, desde el segundo día de estrés sufrió daño en el 20% de sus hojas, y así continuó de manera gradual. Por alguna razón, en los días 3, 4 y 5 Col-0 sobrevivió ligeramente

más que Kin-0 (Fig. 8). En lo que se refiere a Kin-0 y Col-0, en este trabajo no se observaron las diferencias que reportó previamente Vashisht *et al.* (2011) entre estos dos ecotipos (Tabla 10).

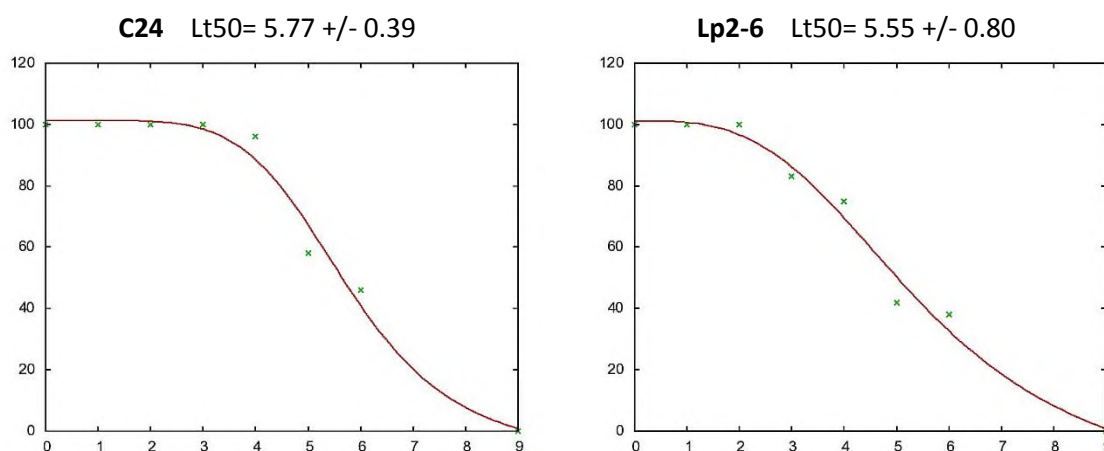
### 7.1.2. Índice de supervivencia

Para cuantificar el índice de supervivencia se calculó el tiempo letal 50 (LT<sub>50</sub>). Dicho parámetro indica el tiempo en que el 50 % de los individuos de cada ecotipo ha muerto. En la Figura 9 se muestran las gráficas del LT<sub>50</sub> de los 4 ecotipos.

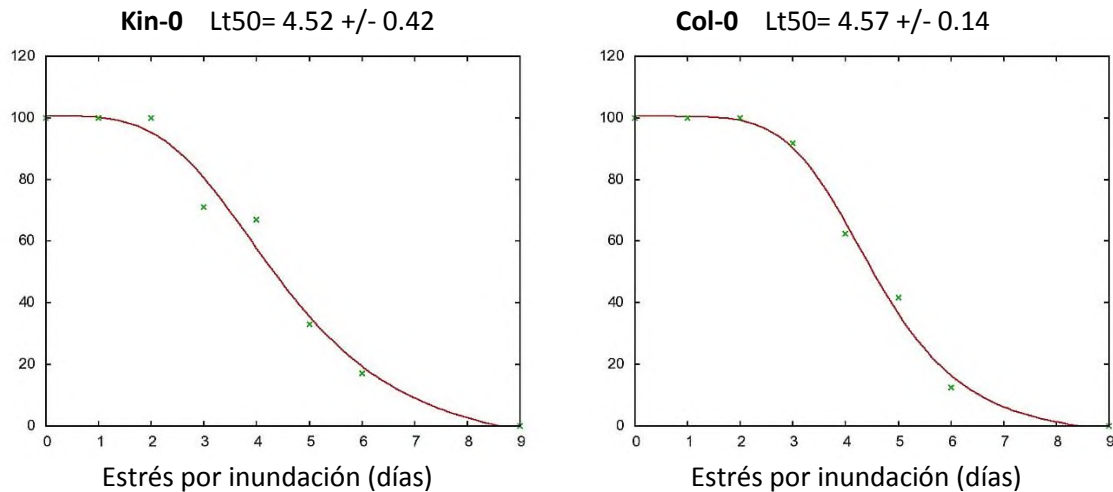
Es importante señalar que bajo las condiciones en las que se trabajó en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad del Papaloapan, el LT<sub>50</sub> calculado fue menor que los reportados por Vashisht *et.*, al (2011) (Tabla 10). No obstante, el orden de supervivencia observado en el presente estudio coincide con el reportado, siendo el ecotipo C24 (LT<sub>50</sub> = 5.77 +/- 0.39) el más resistente seguido por Lp2-6 (LT<sub>50</sub> = 5.55 +/- 0.80) y Kin-0 (LT<sub>50</sub> = 4.52 +/- 0.42).

### 7.1.3. Índice de daño en las hojas de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0 de *Arabidopsis thaliana*

Para analizar el nivel de daño en la parte aérea como consecuencia de los tratamientos de inundación, se determinó el índice de daño en las hojas de *Arabidopsis thaliana* a los 0 y 6 días de recuperación posteriores al estrés por inundación (Fig. 10). Se analizaron las hojas por individuo y días de estrés evaluando clorosis, necrosis y hojas sanas, inmediatamente después del rescate y a los 6 días de recuperación.



**Figura 9.** Tiempo letal 50 (LT<sub>50</sub>) de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0 de *Arabidopsis thaliana* en estrés por inundación. Datos de supervivencia tras 6 días de recuperación posteriores al estrés por inundación. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes.



**Continuación Figura 9.** Tiempo letal 50 ( $LT_{50}$ ) de los ecotipos C24, Lp2-6, Kin-0 y Col-0 de *Arabidopsis thaliana* en estrés por inundación.

**Tabla 7. Comparación de  $LT_{50}$**

Datos obtenidos		Datos reportados por Vashisht, <i>et al.</i> , 2011.	
Ecotipo	$LT_{50}$ (días)	Ecotipo	$LT_{50}$ (días)
C24	5.77 +/- 0.39	C24	11.2
Lp2-6	5.55 +/- 0.80	Lp2-6	10
Kin-0	4.52 +/- 0.42	Kin-0	9.5
Col-0	4.57 +/- 0.14	Col-0	8.3

Para los cuatro ecotipos, durante los días 1 y 2 de estrés los daños resultaron ser mínimos, tanto en el día 0 como en el día 6 de recuperación (Figura 10 A, B). Fue a partir del tercer día de estrés donde la clorosis se hizo evidente desde el inicio de la recuperación (Figura. 10 C). Sin embargo, para el día 6 de recuperación, la clorosis y el porcentaje de hojas sanas disminuyó e incrementó el porcentaje de necrosis para todos los ecotipos; por lo tanto, a medida que avanzan los días de estrés por inundación las plantas sufren un mayor daño, lo que dificulta su recuperación en los 6 días posteriores a su rescate (Figura. 10 D, E y F).

Se analizaron los resultados obtenidos de los porcentajes de hojas sanas, clorosis y necrosis Figura 10, comparando los ecotipos C24, Lp2-6 y Kin-0 contra Col-0. No se obtuvieron diferencias

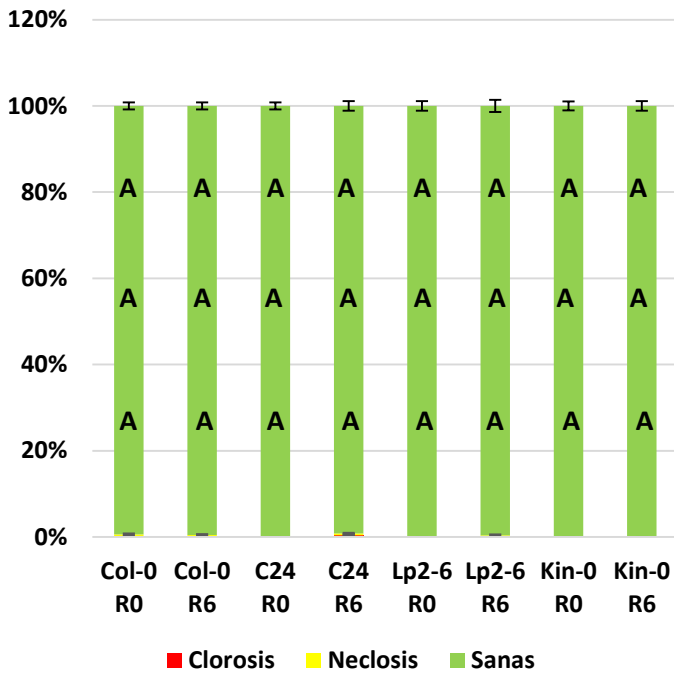
estadísticas significativas para los días 1 y 2 de estrés con 0 y 6 días de recuperación en ningún de los datos fisiológicos recolectados, para los días 3, 4, 5 y 6 de estrés con 0 y 6 días de recuperación sí se obtuvieron diferencias significativas en clorosis, necrosis y hojas sanas.

Durante todas las colectas, el ecotipo C24 sufrió el menor nivel de daño, seguido por Lp2-6, Kin-0 y Col-0. Resulta importante remarcar que, a excepción de la clorosis, el daño causado inmediatamente después del estrés no fue tan contrastante entre los cuatro ecotipos. Tanto para los ecotipos reportados como tolerantes, y para Col-0 con tolerancia intermedia, los mayores daños se observaron durante la reoxigenación.

En plantas bajo estrés por inundación, el daño más grave puede ocurrir durante la reoxigenación, aún por encima de la anoxia (Shikov, *et al.*, 2020). A medida que las aguas de la inundación retroceden, el regreso de las plantas a las condiciones normales de aireación después de estar en un ambiente libre de oxígeno plantea nuevas condiciones de estrés (Yeung, *et al.*, 2018; Shikov, *et al.*, 2020). Debido a la deficiencia energética durante la anoxia, las actividades mitocondriales y fotosintéticas que se reactivan rápidamente durante la reoxigenación promueve una formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), que causan daño oxidativo irreversible a macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Yuan, *et al.*, 2017; Yeung, *et al.*, 2019).

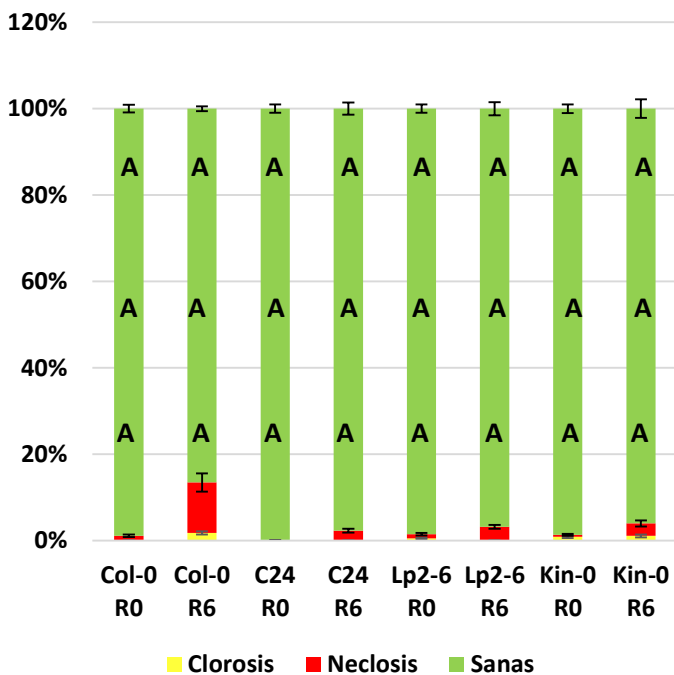
El manejo del estrés oxidativo posterior a la inmersión es importante para minimizar el daño celular y facilitar una recuperación más rápida (Yeung, *et al.*, 2019). Para hacer frente al aumento de los niveles de ROS, las células activan los sistemas de defensa antioxidante para mantener la homeostasis redox celular, por lo tanto, las plantas tolerantes a la inmersión tienen mejores mecanismos de defensa antioxidante para combatir los efectos dañinos de ROS (Yuan, *et al.*, 2017; Yeung, *et al.*, 2019). El jasmonato actúa como una molécula de señalización esencial para las respuestas de las plantas a la reoxigenación después de la inmersión al activar el sistema de defensa antioxidante (Yuan, *et al.*, 2017).

### A Tiempo de estrés: 1 día



Ecotipo		Hojas sanas	Clorosis	Necrosis
Col-0	R 0	A	A	A
C24		A	A	A
Lp2-6		A	A	A
Kin-0		A	A	A
Col-0	R 6	A	A	A
C24		A	A	A
Lp2-6		A	A	A
Kin-0		A	A	A

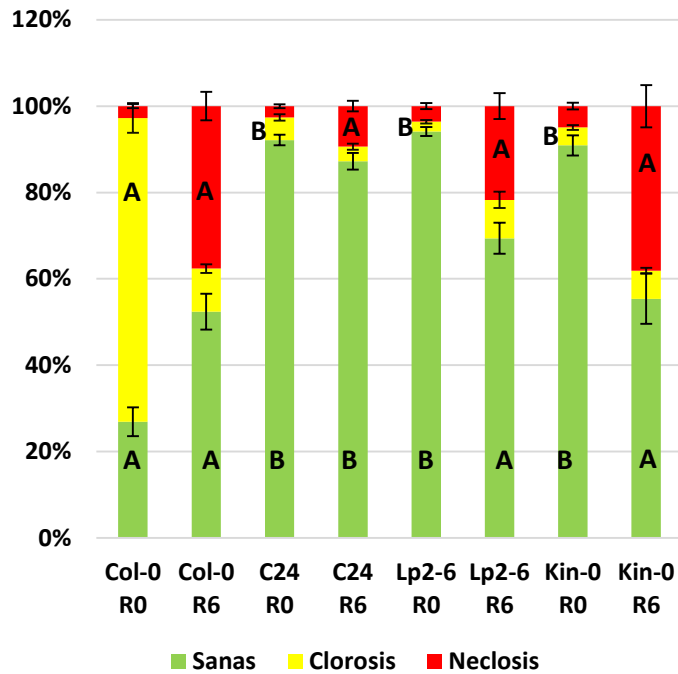
### B Tiempo de estrés: 2 días



Ecotipo		Hojas sanas	Clorosis	Necrosis
Col-0	R 0	A	A	A
C24		A	A	A
Lp2-6		A	A	A
Kin-0		A	A	A
Col-0	R 6	A	A	A
C24		A	A	A
Lp2-6		A	A	A
Kin-0		A	A	A

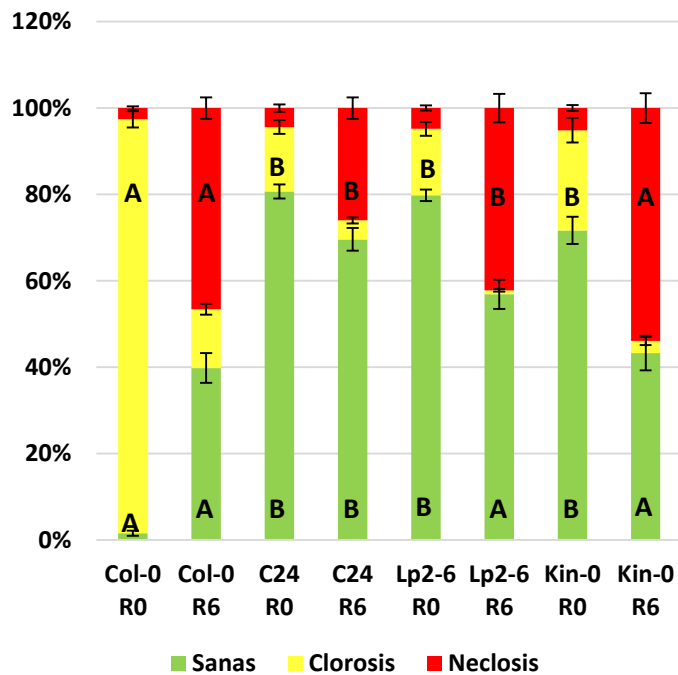
**Figura 10.** Índice de daño en los ecotipos de *A. thaliana* Col-0, C24, Lp2-6 y Kin-0. El daño se midió en las hojas a los 0 y 6 días de recuperación posteriores al estrés por inundación. Datos promedio de 2 experimentos independientes,  $\pm$  E.E. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre ecotipos (Col-0 vs C24, Lp2-6 o Kin-0), prueba t de Student  $p < 0.05$ .

### C Tiempo de estrés: 3 días



Ecotipo		Hojas sanas	Clorosis	Necrosis
Col-0	R 0	A	A	A
C24		B	B	A
Lp2-6		B	B	A
Kin-0		B	B	A
Col-0	R 6	A	A	A
C24		B	A	A
Lp2-6		A	A	A
Kin-0		A	A	A

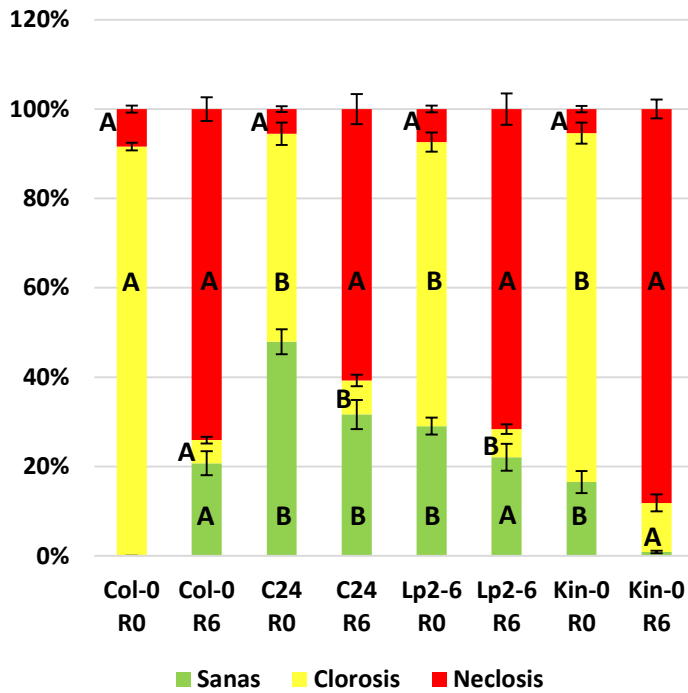
### D Tiempo de estrés: 4 días



Ecotipo		Hojas sanas	Clorosis	Necrosis
Col-0	R 0	A	A	A
C24		B	B	A
Lp2-6		B	B	A
Kin-0		B	B	A
Col-0	R 6	A	A	A
C24		B	A	B
Lp2-6		A	A	B
Kin-0		A	A	A

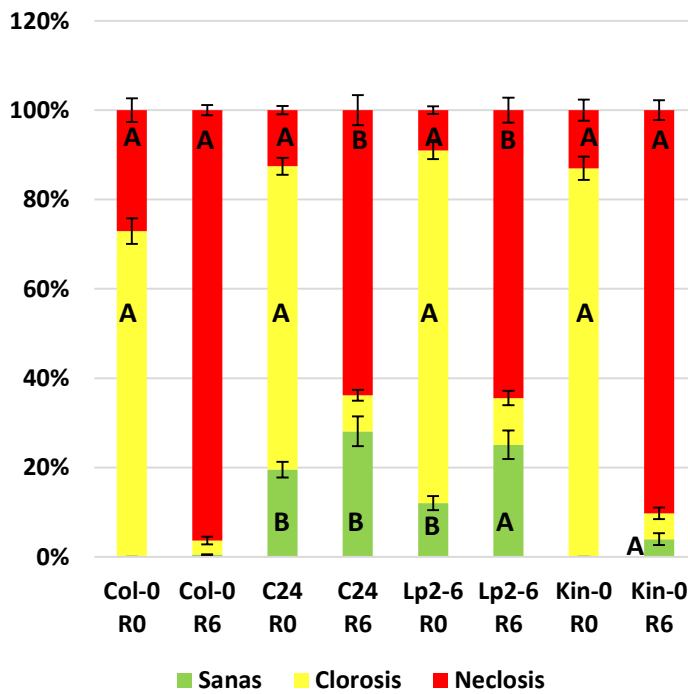
Continuación Figura 10. Índice de daño en los ecotipos de *A. thaliana* Col-0, C24, Lp2-6 y Kin-0.

### E Tiempo de estrés: 5 días



Ecotipo		Hojas sanas	Clorosis	Necrosis
Col-0	R 0	A	A	A
C24		B	B	A
Lp2-6		B	B	A
Kin-0		B	B	A
Col-0	R 6	A	A	A
C24		B	B	A
Lp2-6		A	B	A
Kin-0		A	A	A

### F Tiempo de estrés: 6 días



Ecotipo		Hojas sanas	Clorosis	Necrosis
Col-0	R 0	A	A	A
C24		B	A	A
Lp2-6		B	A	A
Kin-0		B	A	A
Col-0	R 6	A	A	A
C24		B	A	B
Lp2-6		B	A	B
Kin-0		A	A	A

Continuación Figura 10. Índice de daño en los ecotipos de *A. thaliana* Col-0, C24, Lp2-6 y Kin-0.

En un estudio publicado (Yeung, *et al.*, 2018) se reportó que las diferencias en la tolerancia a la inmersión de los ecotipos Lp2-6 y Bay-0 clasificados como tolerante y sensible a la inundación, respectivamente (Vashisht, *et al.*, 2011) se debieron principalmente a diferencias durante la recuperación posterior a la inmersión. La reoxigenación condujo a una mayor producción de ROS en ambos ecotipos, pero el sensible Bay-0 no pudo controlar la producción prolongada y excesiva de ROS durante la recuperación. En Lp2-6, una mayor tolerancia al estrés oxidativo se relacionó con la acumulación restringida de ROS dentro de 1 h de oxigenación y un aumento significativo en el estado antioxidante. Además, las plantas que se recuperan de la inmersión a menudo experimentan sequías fisiológicas debido a la pérdida de agua de las hojas. Las rosetas de Lp2-6 regularon la pérdida de agua después de la inmersión más eficazmente que Bay-0. La mayor pérdida de agua en Bay-0 se correlaciona con la reapertura estomática más temprana 3 h después de la inundación, mientras que 6 h después de la inundación las aberturas estomáticas más pequeñas de Lp2-6 probablemente contrarrestaron la deshidratación durante la recuperación. En la investigación los autores también revelaron que la producción elevada de etileno provocó reapertura estomática prematura.

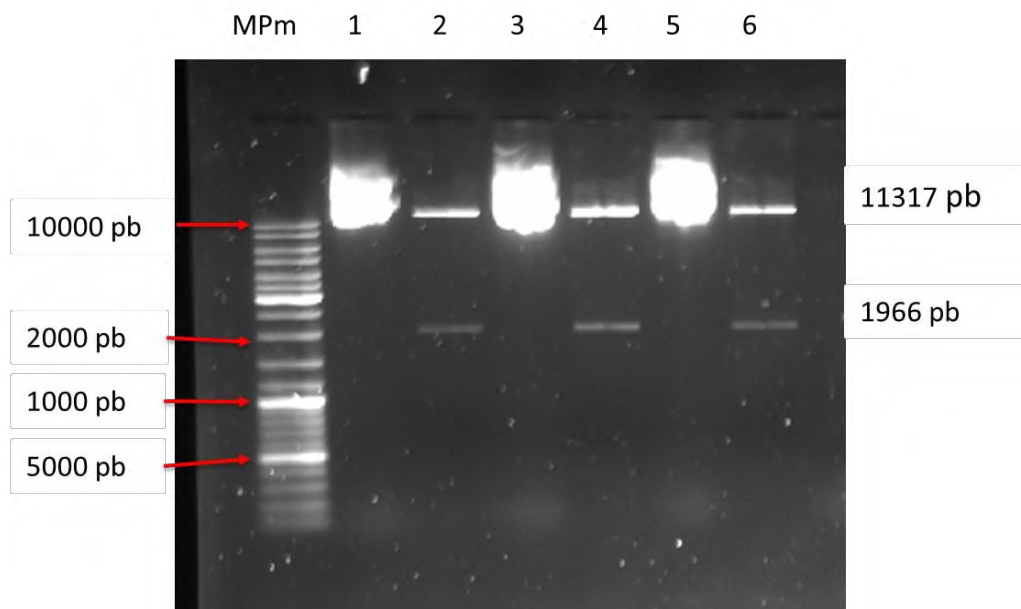
Aunque no se han reportado estudios similares para el ecotipo C24, con base en los hallazgos previamente mencionados, es probable que la razón por la cual C24 resistió mejor el estrés por inundación aplicado en este estudio sea un mejor sistema de defensa antioxidante que le permite atenuar los efectos dañinos de las ROS, así como una baja producción de etileno que se refleja en una menor deshidratación y poder soportar el estrés producido durante la reoxigenación (Fig. 10 F).

De esta forma, a partir del análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, el ecotipo C24 es un ecotipo con buen nivel de tolerancia a la inundación que resultaría útil para la caracterización funcional de genes de respuesta al estrés. Aunque C24 resultó el más recalcitrante a la transformación con las tres líneas de *Agrobacterium* analizadas en el presente estudio, si es transformable aunque necesitará mayor volumen de semillas a escrutar. Por su tolerancia superior, C24 puede ser útil para analizar la funcionalidad de genes candidatos, principalmente empleando mutantes de pérdida de función para investigar la disminución de la tolerancia a la inundación. Por otra parte, el ecotipo Lp2-6, que mostró buena susceptibilidad para la transformación, se sitúa cercano a C24 en la escala de tolerancia en tratamientos de inundación

mayores de 4 días (Fig. 20), y por estas razones es un modelo tolerante a la inundación que será útil para abordar la caracterización funcional de genes candidatos, principalmente en estudios donde la estrategia experimental incluya transformación genética.

## 7.2. Confirmación de la presencia del plásmido pCAMBIA1105.1 de *E. coli*.

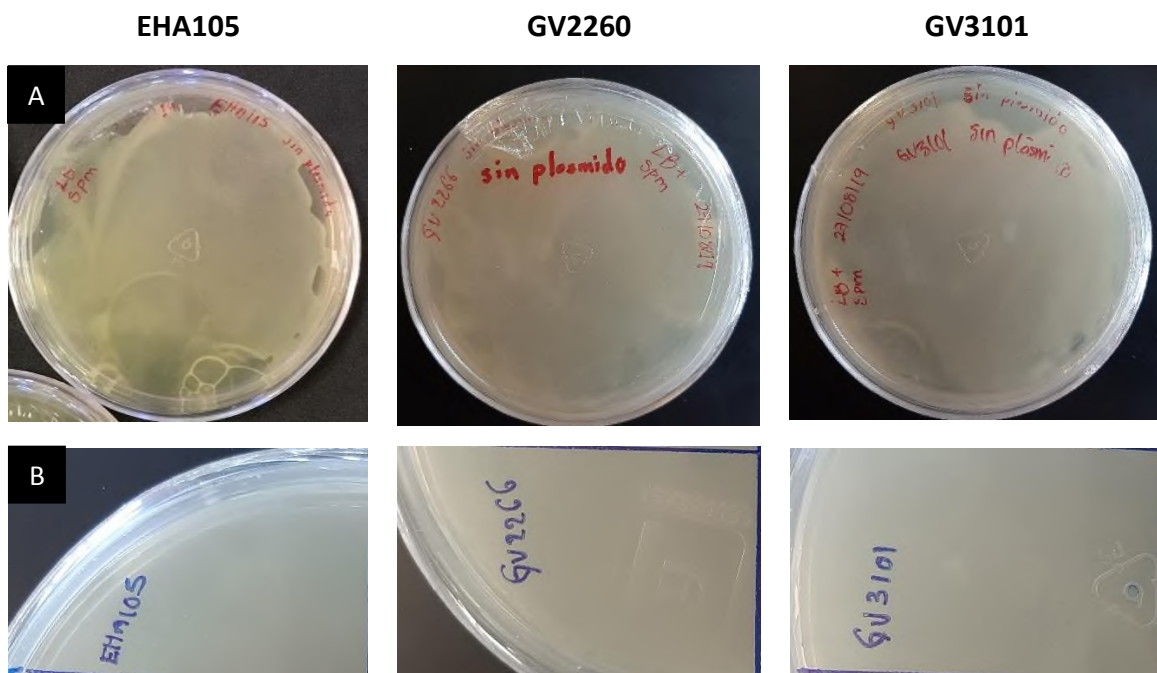
Con el objetivo de lograr una mayor cantidad del plásmido, pCAMBIA1105.1, se clonó en células de *Escherichia coli* One Shot Top 10. Para confirmar la transformación se extrajo el plásmido por lisis alcalina y se sometió a una doble digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BglII que flanquean un fragmento con peso molecular de 1996 pb. En la Fig. 11 se observa la banda esperada. El fragmento restante del vector es de 11,317 pb, mismo que también se puede observar. Esto nos indica que se alcanzó la transformación de las células *Escherichia coli* One Shot Top 10 químicamente competentes con el vector binario pCAMBIA1105.1.



**Figura 11.** Electroforesis de la doble digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 clonado y extraído de *E. coli*. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. **MPm:** Marcador de peso molecular. **1,3,5:** ADN plasmídico sin digestión extraído de clonas independientes. **2,4,6:** digerido con las enzimas EcoRI y BglII.

### 7.3. Análisis de la susceptibilidad natural de *Agrobacterium tumefaciens* a antibióticos de selección.

El plásmido pCAMBIA1105.1 confiere tolerancia a dos antibióticos, espectinomicina y estreptomicina. Para confirmar que las cepas de *A. tumefaciens* GV3101, EHA105 y GV2260 no fueran naturalmente resistentes a los antibióticos de selección, las tres cepas se sembraron por separado en cajas Petri con medio LB adicionadas con el antibiótico respectivo, a una concentración de 50 µg/ml. Con los datos obtenidos de este ensayo se determinó que las tres cepas son naturalmente resistentes a estreptomicina, ya que las bacterias crecieron sin dificultad en el medio con dicho antibiótico; sin embargo, las bacterias que se sembraron en medio LB con espectinomicina no registraron crecimiento (Figura 12), por lo tanto, espectinomicina inhibirá el crecimiento de las bacterias que no posean el plásmido pCAMBIA 1105.1.

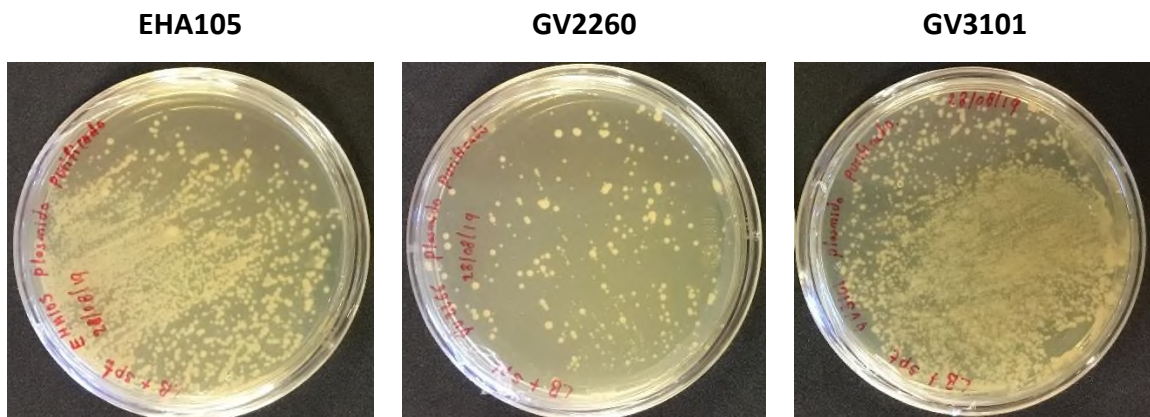


**Figura 12.** Cepas de *A. tumefaciens* sin plásmidos pCAMBIA1105.1. A) crecidas en cajas Petri con medio LB más estreptomicina 50 µg/ml. B) Medio LB más espectinomicina 50 µg/ml.

#### 7.4. Confirmación de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Una vez obtenido el plásmido pCAMBIA1105.1 purificado a partir de *E. coli*, se procedió a transformar por electroporación las tres cepas GV3101, EHA105 y GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* fueron transformadas de manera independiente utilizando el plásmido extraído y purificado (clonado en *E. coli*. Kit de extracción: QIAprep Spin Miniprep kit 50, QUIAGEM, cat.27104), y sin plásmido. Esta última muestra con la finalidad de comprobar que las células eran viables y no fueran afectadas por el voltaje proporcionado por el electroporador.

Después de la electroporación las bacterias se sembraron en medio LB más espectinomicina, observándose un buen crecimiento de colonias en las tres cepas transformadas con el plásmido extraído y purificado de *E. coli* (Fig. 13).

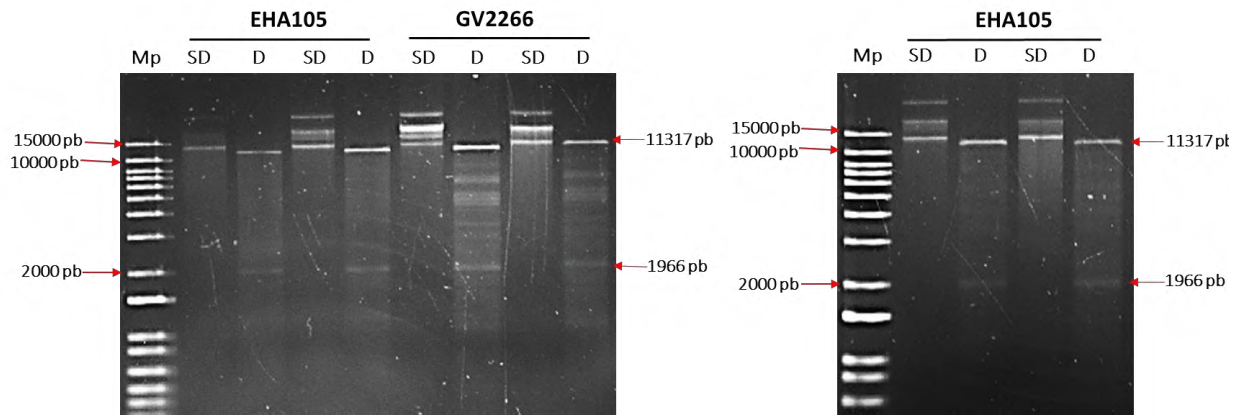


**Figura 13.** Selección de *A. tumefaciens* transformada con el plásmido pCAMBIA1105.1 extraído y purificado de *E. coli*. Cepas crecidas en medio LB más espectinomicina (50 µg/ml).

#### 7.5. Análisis de pCAMBIA1105.1 a partir de transformantes de *A. tumefaciens*.

Se extrajo ADN plasmídico por lisis alcalina y se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BglIII.

Las enzimas de restricción liberaron un fragmento esperado de 11,317pb (Fig. 14). Para las tres cepas, dichos fragmentos se observan por arriba de 10000pb del marcador de peso molecular y el fragmento restante del vector corresponde a 1996pb. Esto nos indica que las tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens* fueron transformadas con el plásmido pCAMBIA1105.1.



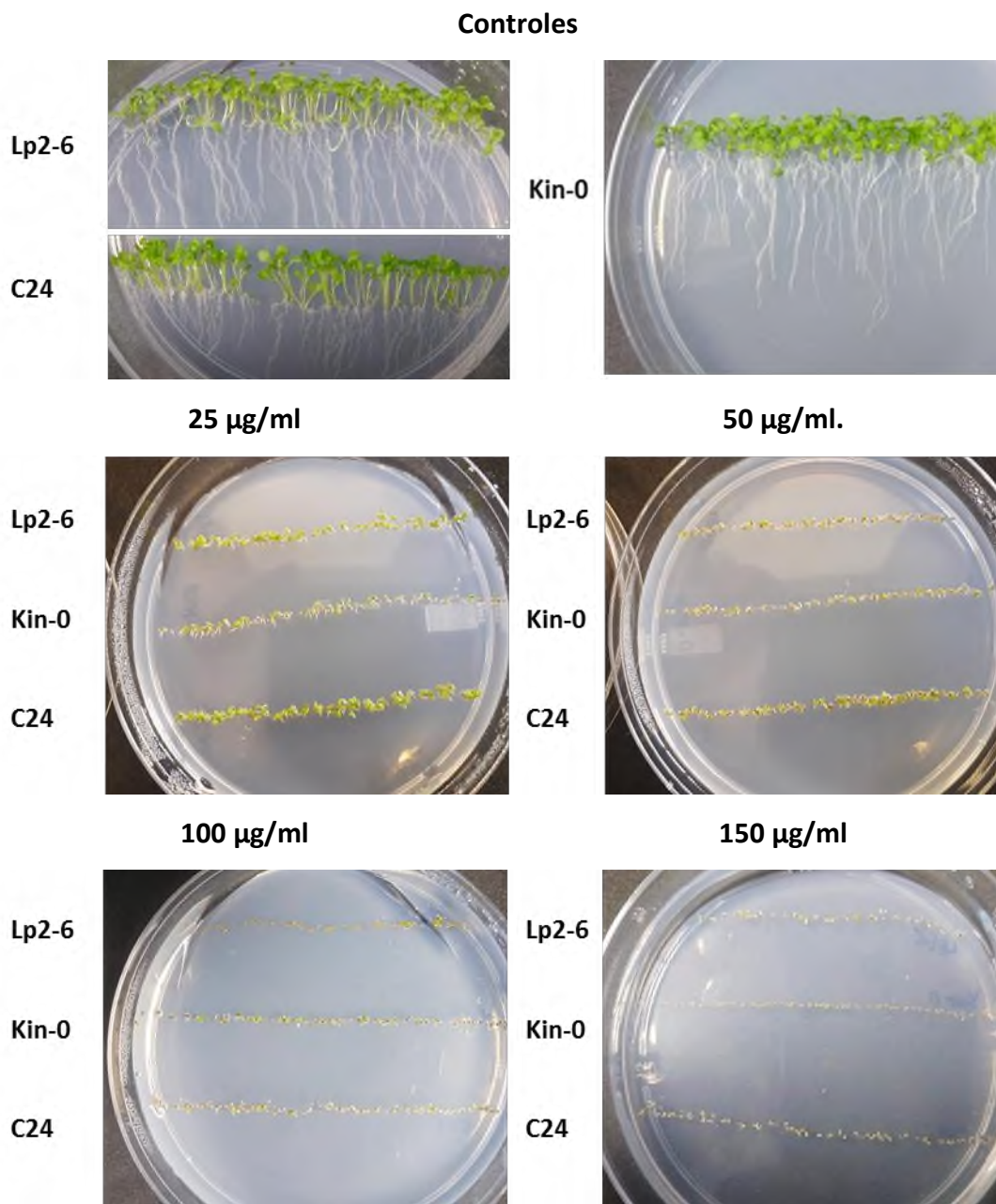
**Figura 14.** Doble digestión del plásmido pCAMBIA1105.1 extraído de las cepas EHA105, GV2260 Y GV3101. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. **Mp:** Marcador de peso molecular. **SD:** ADN plasmídico sin digestión. **D:** Plásmido con doble digestión enzimática EcoRI y BgIII.

### 7.6. Ensayo de tolerancia natural a antibióticos en los ecotipos Lp2-6, Kin-0, C24 y Col-0

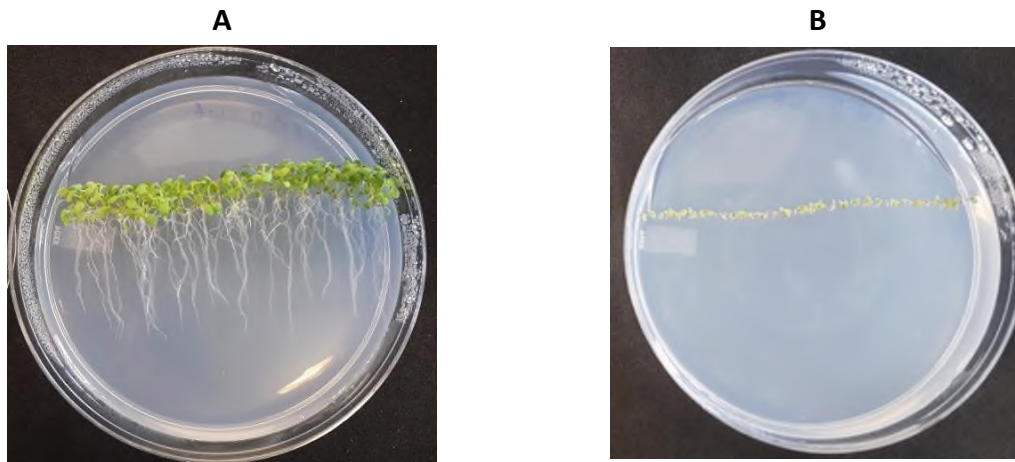
La higromicina fue utilizada como antibiótico de selección de las semillas transformantes; la cefotaxima se utilizó para eliminar las bacterias de *A. tumefaciens* que pudieran sobrevivir al proceso de desinfección de las semillas colectadas de las plantas transformadas. En las cajas Petri con diferentes concentraciones de higromicina (25, 50, 100 y 150  $\mu\text{g/ml}$ ) se observó la germinación de semillas de los ecotipos expuestos al antibiótico, sin embargo, las raíces no se desarrollaron y las plántulas no se elongaron, lo que demuestra que ningún ecotipo es naturalmente resistente y el antibiótico higromicina ejerce su efecto inhibitorio sobre los ecotipos silvestres Lp2-6, Kin-0 y C24 (Fig. 15). Con base en lo anterior, para la selección de transformantes se decidió utilizar la menor concentración probada de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

El ecotipo silvestre Col-0 se expuso a 50  $\mu\text{g/ml}$  de higromicina (Figura 16 B), y tras comparar su crecimiento en medio MS sin antibiótico (Figura 16 A) se apreció claramente que las raíces y las plántulas no se desarrollaron, lo que demostró que tampoco es naturalmente resistente a dicha concentración de Higromicina. En el caso de la cefotaxima a una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 17 B), se observó que el principal efecto sobre Lp2-6, Kin-0 y C24 son raíces más cortas comparadas con los ecotipos silvestres sembrados en medio MS sin antibiótico. Por lo tanto, el antibiótico a esta concentración empieza a afectar el desarrollo de las plantas. En cambio, a 100  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 17 A) las plantas no mostraron una inhibición significativa en su desarrollo

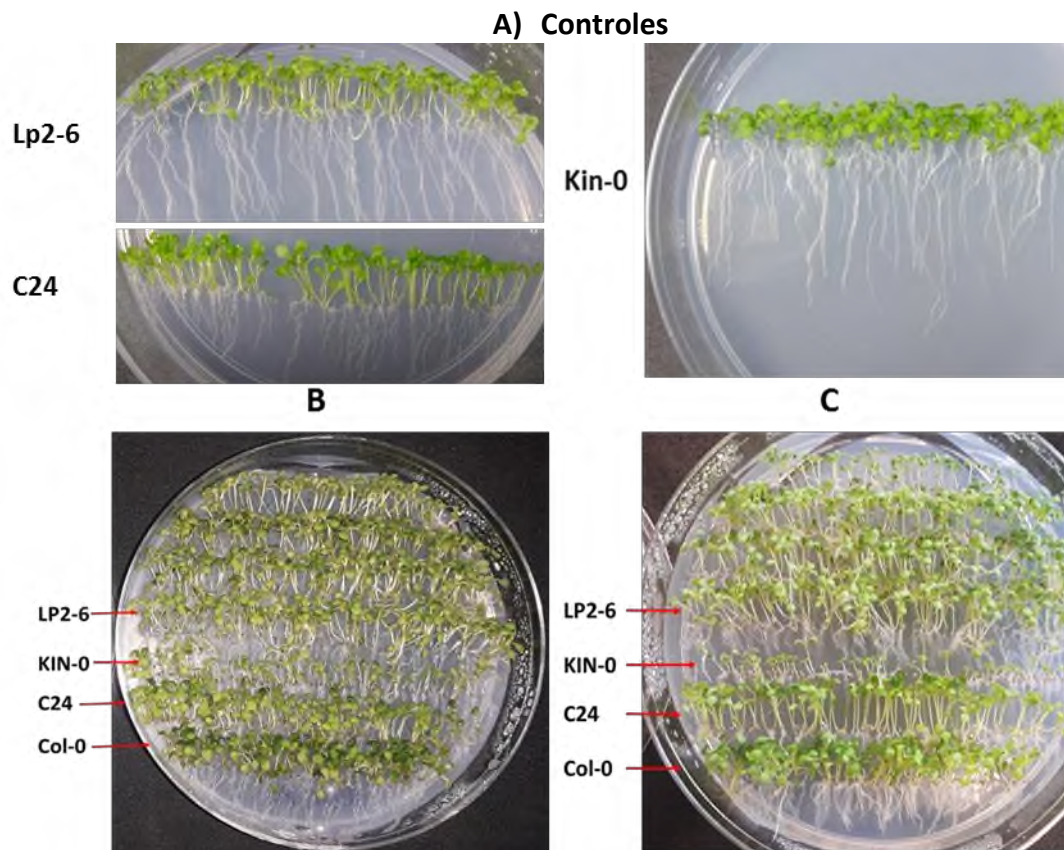
comparadas con el control. Con base en estas observaciones se decidió utilizar una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de cefotaxima. Y a 100  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 18 B) la cefotaxima no mostró una inhibición significativa sobre las plantas de ningún ecotipo.



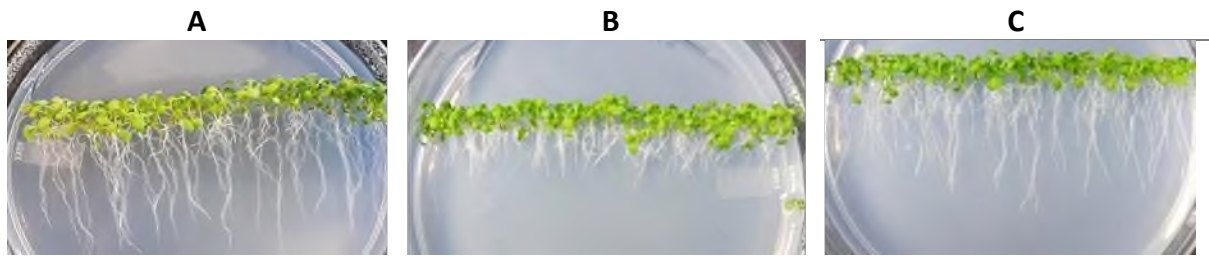
**Figura 15.** Ensayo de tolerancia natural a higromicina de ecotipos silvestres Lp2-6, Kin-0 y C24 en medio MS. Los controles son ecotipos silvestres germinados en medio MS sin antibiótico. Plántulas con 8 días de edad.



**Figura 16.** Ensayo de tolerancia a higromicina en el ecotipo silvestre Col-0. **A)** Col-0 silvestre en medio MS sin antibiótico. **B)** Col-0 silvestre en medio MS con 50 µg/ml de higromicina. Ambas cajas a los 8 días después de la siembra.



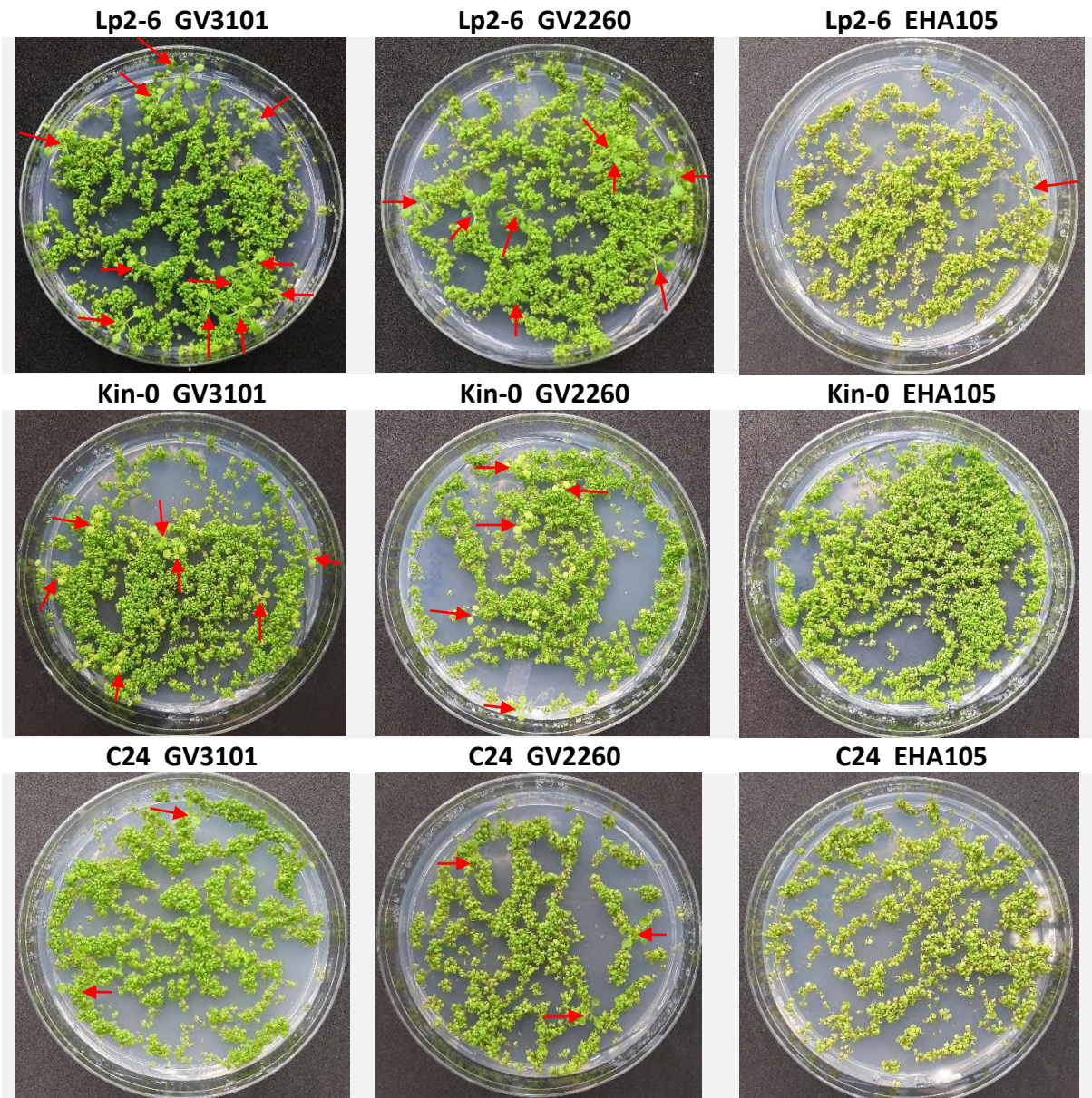
**Figura 17.** Ensayo de tolerancia a cefotaxima en ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24. **A)** Ecotipos silvestres germinados en medio MS sin antibiótico. **B)** Ecotipos silvestres en medio MS adicionado con 100 µg/ml. **C)** Ecotipos silvestres en medio MS con 400 µg/ml. Ambas cajas con plantas de 8 días de edad.



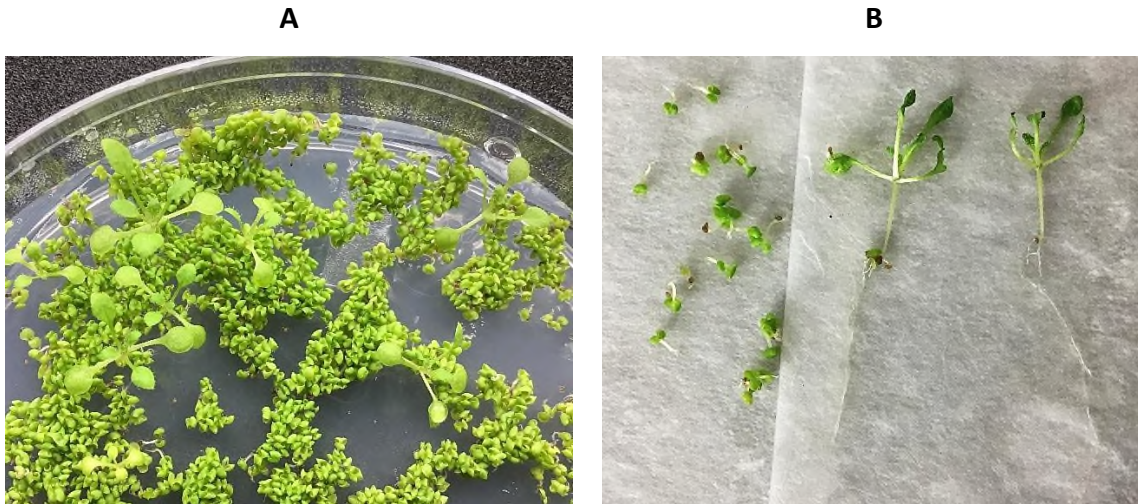
**Figura 18.** Ensayo de tolerancia a cefotaxima en el ecotipo silvestre Col-0. **A)** ecotipo silvestre en medio MS sin antibiótico. **B)** Col-0 silvestre en medio MS con 400 µg/ml de cefotaxima. **C)** Col-0 silvestre en medio MS con 100 µg/ml de cefotaxima. Plántulas con 8 días de edad.

### 7.7. Análisis de resultados de la transformación de *Arabidopsis thaliana*.

Una vez que se realizó la transformación de los ecotipos de *A. thaliana* por el método de inmersión floral, se colectaron después de 2 semanas y a lo largo de un mes las semillas maduras potencialmente transformadas. De estas semillas, se sembraron en promedio 3,000 (50 mg = 2,000 semillas ( Ghedira, et al., 2013)) por ecotipo por cada experimento de transformación en cajas Petri con medio MS solido estéril con higromicina (25 µg/ml) y cefotaxima (50 µg/ml) (Figura 19). A los 10 días, se pudo distinguir las plantas transformadas que expresan el gen de resistencia a higromicina, ya que sus hojas, tallos y raíces crecieron sin dificultad (Figura 20A), mientras que los cotiledones y raíces de las plantas no transformadas no se desarrollaron (Figura 20B). Las cajas Petri se mantuvieron en el cuarto de cultivo durante 6 días más, hasta observar que las plantas transformadas desarrollaron hojas sanas, mientras que las no transformadas se tornaron de un color amarillo y perecieron.



**Figura 19.** Selección de plantas candidatas transformantes de *A. thaliana*. Ecotipos transformados con cepas de *A. tumefaciens*. Se colocaron 3000 semillas por ecotipo en cajas Petri con medio MS adicionado con higromicina (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y cefotaxima (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Ecotipo Lp2-6 con 10 días de edad, C24 y Kin-0 con 8 días de edad. (Se muestran los resultados de un solo experimento).



**Figura 20.** Comparación de plantas de *A. thaliana* ecotipo Lp2-6 posibles transformantes y no transformantes con el plásmido pCAMBIA1105.1. **A)** selección de transformantes en medio MS adicionado con higromicina 25  $\mu\text{g}/\text{mg}$  y cefotaxima (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). **B)** plantas con 10 días de edad que expresan el gen de resistencia a higromicina (derecha), y plantas no transformadas (izquierda) crecidas en medio MS con higromicina 25  $\mu\text{g}/\text{mg}$ .

Todos los experimentos de inmersión floral se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura, concentración de Silwet L-77 y sacarosa; las únicas variables fueron los ecotipos y cepas. Además de estos factores, se ha reportado que la densidad de *Agrobacterium*, el plásmido binario, la fisiología y la etapa de desarrollo de la planta también influyen en la eficiencia de transformación ( Ghedira, et al., 2013; Ziemienowicz, 2014; Hau-Hsuan, et al., 2017).

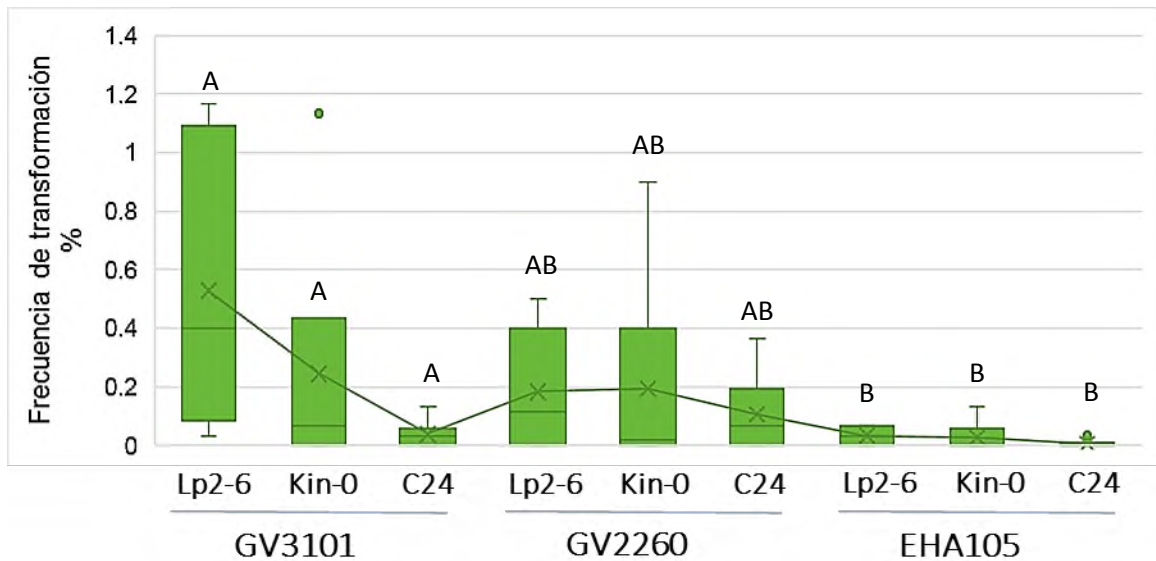
De acuerdo con los resultados obtenidos, de todas las combinaciones, la cepa GV3101 con el ecotipo Lp2-6 produjo el mayor número de plantas transformantes (Fig. 21), por consiguiente, la mayor frecuencia de transformación fue de 1.16 %. El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) muestra que solo hay diferencia entre las cepas GV3101 con EHA105, y no entre los ecotipos.

De las tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, EHA105 fue la que presentó las menores frecuencias de transformación con los tres ecotipos. Entre estos ecotipos transformados con EHA105. Kin-0 fue la que presentó la frecuencia más alta (0.13 %), mientras que en Lp2-6 y C24 se obtuvieron frecuencias de transformación de 0.06 % y 0.03 % respectivamente.

**Tabla 8.** Número de transformantes obtenidas después de la transformación por inmersión floral

	E1	E2	E3	E4	E5	E6
<b>GV3101</b>						
Lp2-6	1	3	7	32	35	17
Kin-0	1	0	0	3	6	34
C24	1	1	0	1	4	0
<b>GV2260</b>						
Lp2-6	0	0	0	15	11	7
Kin-0	0	0	0	1	7	27
C24	0	1	0	3	4	11
<b>EHA105</b>						
Lp2-6	0	2	0	0	2	2
Kin-0	0	0	0	0	1	4
C24	0	0	0	0	0	1

Número de presuntas transformantes obtenidas para los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 en 3000 semillas por cada experimento independiente. E1, E2, E3, E4, E5, E6 indican montajes experimentales independientes.



**Figura 21.** Frecuencia de transformación. Los datos corresponden a seis experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas, ANOVA de dos vías con la prueba de comparación múltiple Tukey  $\alpha=0.05$ .

Los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 transformados con las cepas GV3101 y GV22260 presentaron frecuencias de transformación similares. Por lo tanto, para transformar los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 se pueden utilizar indistintamente las cepas GV3101 o GV2260, ya que no existe evidencia estadística significativa para determinar que la cepa GV3101 es mejor que GV2260.

La transformación por inmersión floral del ecotipo C24 con las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 resultó ser la de menor frecuencia pues ninguna de las cepas transformó el ecotipo C24 con una frecuencia mayor del 0.36 % obtenida con la cepa GV2260. Es especialmente notable que las cepas que dieron una alta frecuencia de transformación en los ecotipos Lp2-6 y Kin-0 proporcionaron muy pocas transformantes en el ecotipo C24 (Tabla 8, Fig. 21). Esto indica que el ecotipo C24 de *Arabidopsis thaliana* es hasta cierto punto recalcitrante a la transformación por inmersión floral, mientras que el ecotipo Lp2-6 es el más susceptible. Ghedira, *et al.*, (2013) haciendo uso del método de inmersión floral y utilizando las cepas GV3101, LMG201 y LBA4404, reportó resultados similares para el ecotipo C24, obteniendo frecuencias de transformación menores a 0.1 % concordando con los resultados del presente trabajo.

En relación a todo lo antes expuesto, se puede argumentar que, utilizando el método de inmersión floral se obtienen frecuencias de transformación que están influenciadas por la cepa de *Agrobacterium* utilizada y no por el ecotipo de *Arabidopsis thaliana*.

Las frecuencias de transformación obtenidas en el presente trabajo son similares a las reportadas por múltiples autores ya que utilizando el método de inmersión floral se obtienen normalmente frecuencias de transformación de entre el 0.1 % y el 3.0 % (Hau-Hsuan, *et al.*, 2017; Clough & Bent, 1998). En un trabajo reportado por Ghedira, *et al.*, (2013), utilizando el ecotipo estándar Col-0, el fondo cromosómico C58C1 Rifr (GV3101) y la cepa LMG201 Rifr de *A. tumefaciens*, se obtuvieron frecuencias de transformación de 0.76-1.57 % y 1.22-2.28 % respectivamente, mientras que la cepa LBA4404 mostró las frecuencias de transformación más bajas (<0.2 %). Además, reportaron que ninguna de las cepas transformó el ecotipo C24 con una frecuencia mayor del 0.1 %. Clough & Bent, (1998) empleando la cepa GV3101 reportaron frecuencias de transformación de 0.36% para el ecotipo Col-0 y frecuencias similares con los ecotipos Ws-0, Nd-0, No-0. Por el contrario, los ecotipos Ler-0, Dijon-GG y Bla-2 se transformaron a tasas de 10 a 100 veces más bajas. En otro estudio, utilizando el método de infiltración al vacío y el ecotipo Col-0

(Dehestani, et al., 2010), se obtuvo una frecuencia de transformación de 1.54 % empleando la cepa de *Agrobacterium* GV3850, mientras que las cepas GV3101 y LBA4404 dieron como resultado frecuencias de transformación de 1.42 % y 1.18 %, respectivamente.

## 8. CONCLUSIONES

Los datos fisiológicos recolectados en el ensayo de inundación (clorosis, necrosis, hojas sanas y  $LT_{50}$ ) indican que los ecotipos C24 y Lp2-6 son más tolerantes al estrés por inundación respecto a Col-0.

Las frecuencias de transformación genética de los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 presentan variabilidad entre los diferentes experimentos independientes. No obstante, se observa una tendencia consistente en la susceptibilidad mayor de los ecotipos Lp2-6 y Kin-0 para la transformación con las cepas GV3101 y GV2260. Conforme a los resultados obtenidos se determinó que las frecuencias de transformación están influenciadas solo por las cepas de *A. tumefaciens* utilizadas, y no por los ecotipos. El ecotipo C24 presentó las menores frecuencias de transformación por inmersión floral. Por otra parte, la cepa EHA105 mostró las frecuencias de transformación más bajas con los tres ecotipos. Sin embargo, el análisis estadístico indica que para transformar los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 se pueden utilizar indistintamente las cepas GV3101 o GV2260.

A pesar de que se obtuvieron frecuencias de transformación distintas dependiendo de la cepa y ecotipo utilizado, se demuestra que los ecotipos Lp2-6, Kin-0 y C24 de *Arabidopsis thaliana* con diversidad genética natural en su capacidad para tolerar la inundación, se pueden transformar mediante el método de inmersión floral haciendo uso de las cepas GV3101, GV2260 y EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los resultados de este trabajo abren las posibilidades de utilizar estos ecotipos como modelos en el área de la biotecnología vegetal para el estudio de genes con función desconocida, así como probar estrategias para aumentar la tolerancia a la inundación en plantas con importancia agrícola.

## 9. PERSPECTIVAS

Las frecuencias de transformación obtenidas con las combinaciones cepa-ecotipo utilizadas en el presente trabajo, son similares a las reportadas por múltiples autores. Aunque las frecuencias obtenidas en los ecotipos Lp2-6 y Kin-0 son elevadas, no se obtuvieron resultados favorables con el ecotipo C24, por lo tanto, para elevar las frecuencias de transformación en los tres ecotipos, especialmente C24, se podrían implementar las siguientes modificaciones al método de inmersión floral (Floral Dip):

- Explorar la utilización de otro plásmido binario, así como otras cepas de *Agrobacterium tumefaciens*
- Realizar más de una inmersión floral en la misma planta en los días 4 y 8 después de la primera transformación.
- Aplicación de vacío en conjunto con el Floral Dip.
- Transformar un ecotipo con más de una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* en la misma solución (ejemplo GV3101 + GV2260).
- Analizar diversas concentraciones de silwet L-77 y sacarosa.

En futuras investigaciones se sugiere realizar la confirmación de las plántulas candidatas transformantes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando primers específicos para el ADN-T de pCAMBIA1105.1 y no solo por tolerancia al antibiótico de selección.

## 10. REFERENCIAS

- Andréa Delatorre, C. & Alves da Silva, A., 2008. Arabidopsis thaliana: uma pequena planta um grande papel. *Revista de Ciências Agrárias*, 31(2), pp. 58-67.
- Bui, L.T., Shukla, V., Giorgi, F.M., Trivellini, A., Perata, P., Licausi, F. and Giuntoli, B. (2020), Differential submergence tolerance between juvenile and adult Arabidopsis plants involves the ANAC017 transcription factor. *Plant J.*, 104: 979-994.
- Caballero, M., Lozano, S. & Ortega, B., 2007. Efecto invernadero, calentamiento global y cambio climático: una perspectiva desde las ciencias de la tierra. *Revista Digital Universitaria*, 10 octubre. 8(10).
- Clough, S. J. & Bent, A. F., 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, Volumen 16, p. 735–743.
- CONAGUA, 2017. Estadísticas del agua en México, México, D. F: s.n.
- Dehestani, Ali & Ahmadian, Gholamreza & Salmanian, Ali & Jelodar, Nadali & Kazemitabar, Kamal. (2010). Transformation efficiency enhancement of arabidopsis vacuum infiltration by surfactant application and apical inflorescence removal. *Trakia Journal of Science*. 8. 19-26.
- Díaz Granados, C. & Chaparro-Giraldo, A., 2012. Métodos de transformación genética de plantas. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, pp. 49-2012.
- Enikeev, A. G., 2018. Transgenic Plants: New Biological System or New Properties of Plant-Agrobacterium Symbiosis?. *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(5), p. 621–627.
- FAO, 2014. ANUARIO ESTADÍSTICO DE LA FAO 2014 La Alimentación y la Agricultura en América Latina y el Caribe, Santiago: s.n.
- FAO, 2017. LA ESTRATEGIA DE LA FAO SOBRE EL CAMBIO CLIMÁTICO, ROMA: s.n.
- Fletcher. W. D, Craig B. Smith, Chapter 5 - How do we know global warming is real? Editor(s): William D. Fletcher, Craig B. Smith, *Reaching Net Zero*, Elsevier, 2020, Pages 39-60, ISBN 9780128233665.
- Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2004). Plant responses to hypoxia--is survival a balancing act?. *Trends in plant science*, 9(9), 449–456.
- Fukao, T., Kenong, X., C. Ronald. P. & 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*, Volumen 18, p. 2021–2034.
- Gelvin, S. B., 2017. Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, p. 195–217.
- Ghedira, R., De Buck, S., Nolf, J. & Depicker, A., 2013. 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. *MPMI*, 26(7), p. 823–832.
- Ghedira, R., De Buck, S., Van Ex, F., Angenon, G., & Depicker, A. (2013). T-DNA transfer and T-DNA integration efficiencies upon Arabidopsis thaliana root explant cocultivation and floral dip transformation. *Planta*, 238(6), 1025–1037.

- Gill, M. B., Zeng, F., Shabala, L., Zhang, G., Yu, M., Demidchik, V., Shabala, S., & Zhou, M. (2019). Identification of QTL Related to ROS Formation under Hypoxia and Their Association with Waterlogging and Salt Tolerance in Barley. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 699.
- Giuntoli B, Perata P, Group VII Ethylene Response Factors in Arabidopsis: Regulation and Physiological Roles, *Plant Physiology*, Volume 176, Issue 2, February 2018, Pages 1143–1155.
- Gordon, J. E., & Christie, P. J. (2014). The Agrobacterium Ti Plasmids. *Microbiology spectrum*, 2(6), 10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013.
- Guo, M., Ye, J., Gao, D., Xu, N., & Yang, J. (2019). Agrobacterium-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. *Biotechnology advances*, 37(1), 259–270.
- Hau-Hsuan, H., Manda, Y. & Erh-Min, L., 2017. Transformation of plants mediated by Agrobacterium: biology and applications. *The Arabidopsis Book*. 15.
- Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES, Sauter M, Dolferus R, Arabidopsis RAP2.2: An Ethylene Response Transcription Factor That Is Important for Hypoxia Survival, *Plant Physiology*, Volume 153, Issue 2, June 2010, Pages 757–772.
- IPCC, 2014. Cambio climático 2014: Informe de síntesis, Ginebra: s.n.
- Jung H, Ali S, Kim JY, Kim W. Transgenic Arabidopsis Expressing *acdS* Gene of *Pseudomonas veronii*KJ Alleviate the Adverse Effects of Salt and Water-Logging Stress. *Plant Breed. Biotech.* 2018; 6:221-232.
- Koornneef, M. & Meinke, D., 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal*, 61(6).
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by Agrobacterium tumefaciens: Principles, methods and applications. *Biotechnology advances*, 33(6 Pt 2), 1024–1042.
- Lee, L. Y., & Gelvin, S. B. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant physiology*, 146(2), 325–332.
- Leonor Rivera, A., Gómez-Lim, M., Fernández, F. & M. Loske, A., 2012. Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of life reviews*, pp. 308-345.
- Lorca, M. A. A., 2018. Chilean Guava—Myrtus ugni. *Exotic Fruits*, pp. 129-139.
- Loreti, E.; Perata, P. The Many Facets of Hypoxia in Plants. *Plants* 2020, 9, 745.
- Mehrotra, S. & Goyal, V., 2012. Gene transfer mediated by Agrobacterium in plants and biosecurity considerations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168 (7), p. 1953–1975.
- Meinke, D. W. Michael Cherry, Caroline Dean, Steven D. Rounsley, Maarten Koornneef, 1998. Arabidopsis thaliana: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, Volumen 282, pp. 662-682.
- Mustroph, A., 2018. Improving Flooding Tolerance of Crop Plants. *Agronomy*, 8 (9).
- Naciones Unidas, 2018. [En línea] Available at: <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/climate-change/index.html> [Último acceso: 10 octubre 2018].

- NCBI, 2018. *Arabidopsis thaliana* (berro thale). [En línea] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/4> [Último acceso: 28 febrero 2019].
- Nester, E. W., 2015. *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front. Plant Sci.*, 5(730).
- 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), pp. 325-337.
- 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: for cell and molecular biology*, 67(3), 434–446.
- Raineri, J., Ribichich, K.F. & Chan, R.L. The sunflower transcription factor HaWRKY76 confers drought and flood tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants without yield penalty. *Plant Cell Rep* 34, 2065–2080 (2015).
- Ramadoss N, Gupta D, Vaidya BN, Joshee N, Basu C. Functional characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase gene in *Arabidopsis thaliana* and its potential in providing flood tolerance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 3;503(1):365-370.
- Rivera-Contreras, I., Zamora-Hernández, T., Huerta-Heredia, A. et al. Transcriptomic analysis of submergence-tolerant and sensitive *Brachypodium distachyon* ecotypes reveals oxidative stress as a major tolerance factor. *Sci Rep* 6, 27686 (2016).
- Sasidharan R, Hartman S, Liu Z, Martopawiro S, Sajeev N, van Veen H, Yeung E, Voesenek LACJ, Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress, *Plant Physiology*, Volume 176, Issue 2, February 2018, Pages 1106–1117.
- Sasidharan R, Voesenek LACJ (2015) Ethylene-mediated acclimations to flooding stress. *Plant Physiol* 169: 3–12
- Schmidt RR, Weits DA, Feulner C, van Dongen J, Oxygen Sensing and Integrative Stress Signaling in Plants, *Plant Physiology*, Volume 176, Issue 2, February 2018, Pages 1131–1142.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2017. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. [En línea] Available at: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> [Último acceso: 6 marzo 2019].
- Shikov, A. E., Chirkova, T. V. & Yemelyanov, V. V., 2020. Post-Anoxia in Plants: Reasons, Consequences, and Possible Mechanisms. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67(1), p. 45–59.
- Subramoni, S., Nathoo, N., Klimov, E. & Yuan, Z.-C., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in plant science*, Volumen 5.
- Tamang, B. & Fukao, T., 2015. Plant Adaptation to Multiple Stresses during Submergence and Following Desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), p. 30164–30180.
- Tzfira, T. & Citovsky, V., 2003. The *Agrobacterium*-Plant Cell Interaction. Taking Biology Lessons from a Bug. *Plant Physiology*, pp. 943-947.
- Tzfira, T. & Citovsky, V., 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Plant biotechnology*, p. 147–154.

Van Dongen, J. T., & Licausi, F. (2015). Oxygen sensing and signaling. *Annual review of plant biology*, 66, 345–367.

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., Voeselek, L. A., & Sasidharan, R. (2011). Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *The New phytologist*, 190(2), 299–310.

Voeselek, L. A. C. & Bailey-Serres, J., 2015. Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, 206(1), pp. 57-73.

Voeselek, L. A., Sasidharan, R., Visser, E. J., & Bailey-Serres, J. (2016). Flooding stress signaling through perturbations in oxygen, ethylene, nitric oxide and light. *New Phytologist*, 209(1), pp. 39-43.

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.

Yamauchi T, Colmer TD, Pedersen O, Nakazono M, Regulation of Root Traits for Internal Aeration and Tolerance to Soil Waterlogging-Flooding Stress, *Plant Physiology*, Volume 176, Issue 2, February 2018, Pages 1118–1130.

Yamauchi, T.; Tanaka, A.; Tsutsumi, N.; Inukai, Y.; Nakazono, M. A Role for Auxin in Ethylene-Dependent Inducible Aerenchyma Formation in Rice Roots. *Plants* 2020, 9, 610.

Yeung, E., Bailey-Serres, J. & Sasidharan, R., 2019. After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. *Trends in Plant Science*, 24(5), pp. 443-454.

Yeung, E., van Veen, H., Vashisht, D., Sobral Paiva, A. L., Hummel, M., Rankenberg, T., Steffens, B., Steffen-Heins, A., Sauter, M., de Vries, M., Schuurink, R. C., Bazin, J., Bailey-Serres, J., Voeselek, L., & Sasidharan, R. (2018). A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(26), E6085–E6094.

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.

Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc*. 2006;1(2):641-6.

Zhang, B., 2019. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Cotton. *Methods in Molecular Biology*, Volumen 1902, pp. 19-33.

Ziemienowicz, A., 2014. Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), pp. 95-102.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1

#### Preparación de medio MS (Murashige & Skoog)

El Medio Murashige & Skoog (MS), fue desarrollado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal, y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo in vitro de tejidos vegetales.

Para preparar 1000ml de medio MS:

MS	2.165g
Sacarosa	10g
Agar para plantas	10g

1. Pesar 2.165g de MS (Murashige & Skoog Basal Medium with Vitamins), 10g de sacarosa y 10g de agar para plantas (Agar, Plant TC Micropropagation Grade-Gelidium. Gel Strength: 910g/cm<sup>2</sup>).
2. En 1000ml de agua destilada agregar el MS y posteriormente la sacarosa, disolver y ajustar el pH a 5.7.
3. Añadir el agar, calentar en el microondas y agitar hasta que el agar se disuelva completamente.
4. Posteriormente esterilizar el medio durante 15 minutos a 120°C.
5. Dejar enfriar a 45-50°C y vaciar en cajas Petri estériles, en una campana de flujo laminar.

**Nota:** Si se necesita agregar antibióticos al medio MS, después de esterilizar, enfriar el medio teniendo cuidado de que no solidifique (45-50°C), agregar el antibiótico y mezclar, posteriormente vaciar en las cajas Petri estériles.

## Anexo 2

### Preparación de sustrato para plantas

El sustrato que se utiliza para sembrar las plantas modelo utilizadas en las investigaciones, es una mezcla de sustrato de esfagno grado horticultura con nombre comercial COSMOPEAT mezclado con perlita, la cual es un sustrato mineral de origen volcánico con textura porosa y una coloración blanquecina. La mezcla del sustrato y la perlita se realiza de la siguiente manera:

1. Añadir 1.5 litros de perlita por cada 4 litros de sustrato Cosmopeat y mezclar completamente
2. Esterilizar en autoclave durante una hora a 120°C
3. Dejar enfriar completamente
4. Agregar 16.4g de fertilizante Nitrofoska 12-12-17 (N, P y K) por cada 4 litros de la mezcla sustrato Cosmopeat y perlita.
5. Humedecer el sustrato con agua potable y sembrar las plantas

### Anexo 3

#### Preparación de medio de cultivo LB sólido (Luria-Bertani)

El agar Luria es un medio nutricionalmente rico que se utiliza principalmente para el cultivo de bacterias. Contiene peptona de caseína y extracto de levadura que proporcionan al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de la mayoría de los microorganismos. El cloruro de sodio suministra electrolitos esenciales para el transporte y el equilibrio osmótico.

Para 500ml de medio LB sólido:

<b>Peptona de caseína</b>	<b>5g</b>
<b>NaCl</b>	<b>5g</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>2.5g</b>
<b>Agar bacteriológico</b>	<b>7.5g</b>

1. En 400ml de agua destilada agregar y mezclar hasta disolver la peptona de caseína, NaCl y el extracto de levadura.
2. Aforar a 500ml
3. Ajustar el pH a 7.0
4. Añadir el agar y mezclar
5. Posteriormente esterilizar el medio durante 15 minutos a 120°C
6. Dejar enfriar a 45-50°C y vaciar el medio en cajas Petri estériles, en una campana de flujo laminar.

**Nota:** Si se necesita agregar antibióticos al medio LB, después de esterilizar, enfriar el medio teniendo cuidado de que no solidifique (45-50°C), agregar el antibiótico y mezclar, posteriormente vaciar en las cajas Petri estériles.

#### Preparación de medio LB líquido

1. En 400ml de agua destilada agregar y mezclar hasta disolver la peptona de caseína, el NaCl y el extracto de levadura. Aforar a 500ml
2. Ajustar el pH a 7.0
3. Posteriormente esterilizar el medio durante 15 minutos a 120°C.

**Nota:** Al medio LB líquido no se le adiciona agar bacteriológico.

## Anexo 4

### Extracción del plásmido por lisis alcalina

Se inocularon 5 ml de medio LB con antibiótico espectinomicina (50 µg/ml) con una de las colonias aisladas (células One Shot Top 10 transformadas con el plásmido pCAMBIA 1105.1) y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación. Para recuperar las bacterias, el cultivo se centrifugó en tubos eppendorf por dos minutos a 12 rpm (revoluciones por minuto) a 4 °C, hasta agotar el contenido de tubo. Una vez finalizado se decantó para eliminar el sobrenadante residual y se procedió a la extracción del plásmido empleando las soluciones indicadas en la Tabla 9. El pellet bacteriano se resuspendió en 100 µl de la solución de lisis alcalina I (enfriada en hielo) y se agitó en vortex hasta homogenizar. A continuación, se agregó 200 µl de la solución de lisis alcalina II y se mezcló el contenido invirtiendo los tubos 10 veces. Enseguida se agregó 150 µl de la solución de lisis alcalina III, se mezcló la solución mediante inversión varias veces, y se colocó por 5 minutos en hielo.

**Tabla 9.** Soluciones para el aislamiento del plásmido pCAMBIA 1105.1

Solución I		Solución II		Solución III	
Componente	Volumen	Componente	Volumen	Componente	Volumen
Tris HCl 25mM	125 µL	NaOH 0.2N	140 µL	Acetato de potasio 5M	3 mL
EDTA 0.5 M	100 µL	SDS 1%	1400 µL	Acido glacial acético	575 µL
H <sub>2</sub> O desionizada	4775 µL	H <sub>2</sub> O desionizada	5460 µL	H <sub>2</sub> O desionizada	1425 µL
<b>Volumen total</b>	<b>5 mL</b>	<b>Volumen total</b>	<b>7 mL</b>	<b>Volumen total</b>	<b>5 mL</b>

Posteriormente el lisado bacteriano se centrifugo a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C (centrifuga universal Hettich 320) y el sobrenadante se transfirió a tubos nuevos. En la campana de extracción se agregó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se mezcló mediante agitación con vortex, para enseguida centrifugar a 12000 rpm durante 2 minutos a 4 °C. La fase acuosa (sobrenadante) se transfirió a tubos nuevos, y para precipitar los ácidos nucleicos se agregó 1 ml de etanol grado molecular a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para precipitar los ácidos nucleicos y se retiró el sobrenadante por

decantación, teniendo cuidado de no desechar el pellet. A la pastilla obtenida se le agregó 1 ml de etanol grado molecular al 70 % y se mezcló varias veces, se recuperó el ADN por centrifugación a 1200 rpm por 2 minutos a 4 °C, y se eliminó el sobrenadante por decantación. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente por 10-15 minutos. Pasado el tiempo a cada tubo se le agregó 30 µl de agua libre de nucleasas (DEPC) y 1 µl de RNAsa (10 mg/ml), y se mezcló suavemente por inversión para posteriormente incubar a 37 °C por 30 minutos y a 64 °C por 10 minutos. Se cuantificó la concentración del ADN plasmídico en el equipo nanodrop y los tubos se almacenaron en el congelador a -20 °C.

## Anexo 5

### ANOVA de dos vías

#### Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
Cepa <i>A. tumefaciens</i>	1.00	GV3101	18
	2.00	GV2260	18
	3.00	EHA105	18
Ecotipo	1.00	C24	18
	2.00	Kin-0	18
	3.00	Lp2-6	18

#### Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Frecuencia de transformación

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1.311 <sup>a</sup>	8	.164	2.306	.036
Intersección	1.235	1	1.235	17.381	.000
Cepa	.557	2	.278	3.918	.027
Ecotipo	.354	2	.177	2.490	.094
Cepa * Ecotipo	.400	4	.100	1.407	.247
Error	3.198	45	.071		
Total	5.743	54			
Total corregido	4.508	53			

a. R al cuadrado = .291 (R al cuadrado ajustada = .165)

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Frecuencia de transformación

HSD Tukey

(I) Cepa <i>A. tumefaciens</i>	(J) Cepa <i>A. tumefaciens</i>	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GV3101	GV2260	.109259	.0888554	.442	-.106092	.324611
	EHA105	.248148*	.0888554	.020	.032797	.463499
GV2260	GV3101	-.109259	.0888554	.442	-.324611	.106092
	EHA105	.138889	.0888554	.272	-.076462	.354240
EHA105	GV3101	-.248148*	.0888554	.020	-.463499	-.032797
	GV2260	-.138889	.0888554	.272	-.354240	.076462

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .071.

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

### Frecuencia transformación

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Cepa <i>A. tumefaciens</i>	N	Subconjunto	
		1	2
EHA105	18	.022222	
GV2260	18	.161111	.161111
GV3101	18		.270370
Sig.		.272	.442

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Alfa = .05.

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Frecuencia de transformación

HSD Tukey

(I) Ecotipo	(J) Ecotipo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
C24	Kin-0	-.105556	.0888554	.466	-.320907	.109796
	Lp2-6	-.198148	.0888554	.077	-.413499	.017203
Kin-0	C24	.105556	.0888554	.466	-.109796	.320907
	Lp2-6	-.092593	.0888554	.555	-.307944	.122759
Lp2-6	C24	.198148	.0888554	.077	-.017203	.413499
	Kin-0	.092593	.0888554	.555	-.122759	.307944

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .071.

### Frecuencia transformación

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

Ecotipo	N	Subconjunto
		1
C24	18	.050000
Kin-0	18	.155556
Lp2-6	18	.248148
Sig.		.077

Se visualizan las medias para los grupos

en los subconjuntos homogéneos.

Alfa = .05.