



EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL
ESTADO DE JALISCO

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

**Sobre-expresión transitoria en hojas separadas de *Persea americana* c.v
Hass mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Tesis para grado de maestría en innovación biotecnológica

Presentada por:

Ing. Manuela Castro Medina

Director:

Dr. Rafael Urrea López

Codirectores:

Dr. Nutan Prasad Rout

Dr. Jorge Alberto Salazar González

CIATEJ

Jalisco, México

Febrero 2023



Guadalajara, Jalisco a 17 de Enero de 2023

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial de la estudiante **Manuela Castro Medina**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**Sobre-expresión transitoria en hojas separadas de *Persea americana* c.v Hass mediada por *Agrobacterium tumefaciens*”** aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica, con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria (Biotecnología Vegetal) durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 17 del mes de Enero del año dos mil veintitrés.



Dr. Rafael Urrea López
Director de tesis/tutor académico



Dr. Nutan Prasad Rout
Co-director de tesis/tutor en planta



Dr. Jorge Alberto Salazar González
Co-director de tesis

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 13 de febrero de 2023
Ref. CP/425/2023

MANUELA CASTRO MEDINA
ESTUDIANTE DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA
NÚMERO DE MATRÍCULA 2103MB6557
PRESENTE

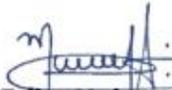
Por este medio le informo que el trabajo de tesis **“Sobre-expresión transitoria en hojas separadas de Persea americana c.v Hass mediada por Agrobacterium tumefaciens”** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Rafael Urrea López. Director de tesis
Dr. Nutan Prasad Rout. Co-director de tesis
Dr. Jorge Alberto Salazar González. Co-director de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención de grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE



Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo
Directora Adjunta de Investigación y Posgrado



Coordinación de Posgrados

I.	Índice de contenido	
II.	Índice de Figuras	VI
	Resumen.....	9
1.	Introducción	10
2.	Marco teórico y antecedentes	11
	Transformación genética.....	11
	Diferentes métodos de transformación genética de plantas:	13
	Mecanismo de transformación genética de plantas por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> :	15
	Transformación estable:	16
	Transformación transitoria:	17
	Algunos vectores de expresión de interés:	19
	<i>Persea americana</i> :	23
	Antecedentes de transformación estable en aguacate.....	24
	Antecedentes de transformación transitoria en aguacate.....	25
	Factores importantes para tener en cuenta en la transformación transitoria de aguacate:.....	27
	Edad de la hoja:	27
	Microheridas:	27
	Métodos mecánicos de infiltración	28
	Compuestos fenólicos:	29
	Ácido Jasmónico (AJ).	30
	Supresores de silenciamiento:	31
	Surfactantes:	32
	Temperatura de incubación post infiltración.....	32
3.	Planteamiento del problema	32
4.	Justificación.....	34
5.	Hipótesis.....	34
6.	Objetivo general	35
	Objetivos específicos.....	35

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

7. Metodología	35
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y preparación para infiltración:	35
Metodología general de infiltración activa de hojas:	38
Transformación de aguacate por <i>Agrobacterium</i>	40
Detección de <i>RUBY</i>	47
Análisis estadístico de resultados	48
9. Resultados	49
Observación de presencia de betalaínas en hojas de aguacate ante varios tratamientos.	49
Efecto de la cepa	49
Efecto del estadio de la hoja, AJ y micro-heridas:	50
Efecto de la concentración de <i>Agrobacterium</i> :	51
Efecto de diferentes presiones de vacío y número de repeticiones:	52
Efecto de surfactantes.....	53
Efecto de infiltración sin vacío e incubación prolongada:	53
Efecto de infiltración con dos cepas:.....	54
Comparación de dos medios de infiltración diferentes:	55
Resumen de resultados de Agroinfiltración de hojas sueltas de aguacate con diferentes tratamientos:	56
Confirmación de la transformación con vector pJL-TRBO-G	57
Detección de <i>RUBY</i>	59
Análisis estadístico.....	61
10. Discusión de resultados	64
11. Conclusiones	68
Agroinfiltración de hojas sueltas de aguacate con diferentes tratamientos	68
Vector de sobreexpresión	68
Efecto de la cepa, estadio de la hoja, AJ y micro-heridas	68
Efecto de surfactantes.....	69
Efecto de infiltración sin vacío e incubación prolongada	69
Efecto de co-infiltración con AGL1- pBBRacdSgabT.....	69

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Efecto de la concentración de <i>Agrobacterium</i> en el medio de infiltración:	70
Efecto de diferentes presiones de vacío y número de repeticiones	70
Comparación de medios de infiltración.....	70
12. Prospección:	70
ANEXOS Metodología	72
1. Detección de Ruby	72
Determinación de área transformada por Photoshop.....	72
2. Detección de GFP.....	73
2.1. Extracción de proteína GFP	73
2.2. ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas):	74
2.3. Western blot.	74
ANEXOS Resultados	76
3. Detección de GFP en hojas de aguacate por inmunoensayos:	77
4. Western Blot.....	78
5. Detección de señal de fluorescencia de GFP en lector de microplacas.....	79
5.1. Comparativa entre diferentes buffers de extracción de proteína para detectar señal de fluorescencia	79
Bibliografía	81

II. Índice de Figuras

Fig. 1 Métodos para transformación de plantas. Tomado de (Saifi, Passricha, Tuteja, Kharb, & Tuteja, 2020).....	13
Fig. 2 Proceso de infección de <i>Agrobacterium</i> visto en 5 pasos generales. Extraído de (Hwang et al., 2017).....	16
Fig. 3 Comparación en cuanto a tiempo entre transformación estable y transitoria.	18
Fig. 4 Cassette 35S:RUBY. Tomado de (He et al., 2020)	19
Fig. 5 Región T-DNA del plásmido pJL- TRBO (Oa & Lindbo, 2007).....	20

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Fig. 6 Expresión de <i>acdS</i> y <i>gabT</i> inactivan rutas de defensa y estrés en la planta.....	21
Fig. 7 Top 10 de productos de exportación de México en el 2020	24
Fig. 8 Top 10 de productores de aguacate a nivel mundial entre 2010 y 2020.....	24
Fig. 9 Diferentes estudios de transformación genética en aguacate y logros alcanzados en cada caso. Tomado de (Tamayo-Ramos et al., 2022).....	26
Fig. 10 Estrategia de aumentar eficiencia de transformación por generación de micro-heridas en hojas a través del rodillo de micro agujas	28
Fig. 11 Esquema que relaciona el AJ con las rutas SAR e ISR y cómo esta interacción puede favorecer la transformación por <i>Agrobacterium</i>	30
Fig. 12 Efecto del ácido jasmónico sobre la eficiencia de transformación en hojas de girasol (S. Jung & McDonald, 2016).....	31
Fig. 13 Diagrama de flujo del proceso general de la preparación de <i>Agrobacterium</i> pre-infiltración.....	38
Fig. 14 Proceso general de la infiltración de hojas de aguacate.....	39
Fig. 15 Infiltración de los 3 tratamientos para determinación de cepa más virulenta.....	41
Fig. 16 Diferentes etapas de desarrollo de las hojas de aguacate evaluados en los experimentos	42
Fig. 17 Proceso a seguir en el experimento de diferentes estadios de hoja, con o sin micro-heridas y con o sin AJ	43
Fig. 18 Proceso llevado en el experimento donde se probó 3 diferentes presiones de vacío (0.02, 0.04, y 0.07 MPa), 3 diferentes concentraciones de <i>Agrobacterium</i> (OD600 0.3, 0.6, 1.0) y con 1, 2 o 3 aplicaciones de vacío	44
Fig. 19 Infiltración de los tratamientos con surfactantes y sin surfactante.	45
Fig. 20 Proceso llevado a cabo para realizar el experimento de co-cultivo con AGL-pBBR <i>acdS</i> <i>gabT</i> ...	46
Fig. 21 Hojas de aguacate infiltradas con cepas de <i>Agrobacterium</i> LBA4404, GV3101, y AGL1	49
Fig. 22 Hojas de estadio C, D, E ante tratamientos con micro heridas y ácido jasmónico	51
Fig. 23 Hojas de estadio D ante tratamientos con diferentes densidades ópticas de <i>Agrobacterium</i> en el medio de infiltración.....	52
Fig. 24 Hojas de estadio D, con aplicación de micro-herida, AJ ante diferentes tratamientos de vacío (1 a 3 vacíos y 0.02, 0.04, 0.07 MPa)	52
Fig. 25 Hojas de estadio D ante tratamientos con surfactantes Triton X-100 y Tween-20.....	53
Fig. 26 Hojas de estadio D ante diferentes tiempo de inmersión en medio de infiltración sin aplicación de vacío.....	54

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Fig. 27 Hojas estadio D co-infiltradas con AGL1-pBBRacdSgabT y LBA4404 o infiltradas sólo con LBA4404	55
Fig. 28 Hojas de estadio D infiltradas con dos tipos de medio de infiltración.....	56
Fig. 29 Observación den microscopio confocal de hojas de aguacate transformadas con pJL-TRBO-G vs Hojas sin transformar (-Ctrl). Cada columna corresponde a la observación ante: 1) longitudes de onda específicas para GFP, 2) Longitudes de onda específicas para clorofila	58
Fig. 30 Absorbancia a 535 nm de extractos de betalaína de hojas transformadas con tratamientos de Edad C y D con presencia de AJ y sin AJ en el medio de infiltración.....	59
Fig. 31 Área transformada extraída de una hoja del tratamiento +AJ estadio D por medio del software Adobe Photoshop.....	60
Fig. 32 gráfico de dispersión Absorbancia vs tratamientos	61
Fig. 33 Dispersión de area transformada vs tratamientos	63

Resumen

Este proyecto comprende, por primera vez, el proceso de transformación transitoria en hojas de aguacate c.v. Hass (*Persea americana* Mill.) permitiendo así futuras aplicaciones en caracterización funcional de genes y mejoramiento genético para obtención de nuevas variedades. Por su apetecido fruto, el cultivo de aguacate tiene alta importancia comercial en el mercado internacional, lo cual se confirma con un incremento sustancial de su consumo en los últimos años, especialmente en los principales importadores; Estados Unidos y la Unión Europea. Siendo México el principal productor y exportador a nivel mundial se recalca la importancia de buscar en este país soluciones para combatir potenciales desafíos ambientales como plagas y cambios climáticos inminentes de un cultivo de explotación univarietal como sucede con el aguacate. *Persea americana* es un árbol perene, recalcitrante, de larga fase juvenil y hasta el momento no se reporta transformación transitoria en hojas o ningún tejido adulto. Durante este estudio se desarrolló una metodología de transformación de hojas de aguacate mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Para superar la barrera de recalcitrancia en esta especie, se evaluó el efecto de diferentes parámetros tales como la cepa de *Agrobacterium*, edad de la hoja, pretratamiento de micro-heridas, la fitohormona ácido jasmónico (AJ) infiltración por vacío, surfactantes, densidad óptica (OD_{600}) de *Agrobacterium* y co-cultivo con AGL1- pBBRacdSgabT. Se encontró que la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 portando el vector *RUBY* logra transformar las hojas mientras las demás cepas no provocaron signos de transformación. La eficiencia de transformación incrementó ante edades intermedias de la hoja, con la aplicación de microheridas que facilitaron la infiltración de líquido a la hoja en sinergia con aplicación de AJ a 250 μ M, *Agrobacterium* con OD_{600} de 0.6, con aplicación de 3 vacíos de 0.07 MPa y con aplicación del surfactante Triton X-100 al 0.02%. Este trabajo reporta la primera transformación transitoria en hojas de aguacate, lo cual abre el camino para continuar con el proceso *in-planta* y explorar así en estudios de caracterización funcional de genes y rutas metabólicas en *Persea americana* c.v. Hass.

1. Introducción

Persea americana o aguacate es una especie de la familia *Laureaceae* con $2n=24$ cromosomas, es endémico de las zonas tropicales de Centroamérica y en los últimos años, por la importancia comercial de su fruto, es cultivado en varios países como México, República Dominicana, Perú, Colombia, Indonesia, Brasil, Kenia y entre otros, siendo el cultivar Hass el más producido por la calidad de su fruto (Pliego-Alfaro et al., 2020). Los niveles de producción mundial de aguacate se han triplicado en los últimos 10 años, alcanzando en el 2020 una producción de 8 millones de toneladas (Mt) y se calcula que para el 2030 alcance los 12 Mt (FAOSTAT, 2021; OECD/FAO, 2021). En México es de particular importancia el cultivo de aguacate, pues es el principal exportador mundial con más del 50% de su producto destinado a suplir el mercado de USA (FAOSTAT, 2021). Las ventajas de México radican en su cercanía a Norteamérica, en su capacidad de producir frutos en todas las temporadas del año y que la mayoría de las plantas cultivadas provienen de la variedad Hass, cuyos frutos son los más apetecidos por su alta calidad (FAO, 2022).

Existe una creciente necesidad de generar mejoras genéticas en plantas de interés comercial debido a eventuales desafíos que presentan estos cultivos, tales como sequías, plagas, optimización del consumo hídrico, mejoras en calidad, entre otras (Chapman, Chakraborty, Fernanda Dreccer B, & Howden, 2012). Ya que los árboles frutales como el aguacate requieren mucho tiempo (años) para obtener nuevos rasgos por medio del mejoramiento genético convencional, se ha buscado a través de técnicas moleculares el mejoramiento de cultivares, siendo una de las técnicas más populares la introducción de genes foráneos en la célula vegetal a través de transformación con *Agrobacterium tumefaciens*. De esta forma, ya se ha logrado transformación genética en varios cultivares de alta importancia comercial, como es el caso de citrus (Conti, Xoconostle-Cázares, Marcelino-Pérez, Hopp, & Reyes, 2021), manzana (Schröpfer, Lempe, Emeriewen, & Flachowsky, 2022), ciruela (Petri, Albuquerque, Faize, Scorza, & Dardick, 2018), kiwi (Uematsu, Murase, Ichikawa, & Imamura, 1991), pera (Mourgues, Chevreau, Lambert, & De Bondt, 1996), cerezo (Zong et al., 2018), uva (Zhang, Wu, Li, Song, & Wang, 2021), y arándano (G. Q. Song & Sink, 2006) y gracias a estos logros se ha podido avanzar en estudios de de caracterización funcional de genes y rutas metabólicas en estas plantas. Incluso en algunos cultivares se han adelantado estudios para incursión de programas

de mejoramiento genético acelerado (Rapid cycle breeding) (Callahan, Srinivasan, Dardick, & Scorza, 2016; Endo, Fujii, Omura, & Shimada, 2020).

Dentro de los tipos de transformación está la transformación transitoria en tejido adulto la cual es de particular utilidad para plantas recalcitrantes a la regeneración *in vitro* como lo son algunos árboles frutales o maderables, entre ellos el aguacate. La transformación transitoria tiene varias ventajas sobre la transformación estable; por ejemplo, la expresión génica puede ser medida al poco tiempo después de la transferencia del DNA, la expresión no está sesgada por efectos de posición, puede realizarse sin la necesidad de regeneración de tejidos, lo cual es conveniente para plantas recalcitrantes con baja tasa de regeneración (Kapila & Rycke, 1997; Krenek et al., 2015). Aunque en aguacate ya se ha desarrollado varios estudios de transformación estable y un estudio de transformación transitoria *in vitro* (Tamayo-Ramos, Salazar-González, Casson, & Urrea-López, 2022), aún no se ha logrado la transformación transitoria en tejido adulto o planta completa en *Persea americana*.

Este proyecto desarrolla por primera vez un protocolo de transformación transitoria en hojas de aguacate donde se evidencia la expresión de genes exógenos, del vector 35S:*RUBY*, para biosíntesis de betalainas que causan coloración roja las hojas. Se investigó el efecto de la cepa de *Agrobacterium*, edad de la hoja, pretratamiento de micro-heridas, la fitohormona ácido jasmónico (AJ) infiltración por vacío, surfactantes, densidad óptica (OD600) de *Agrobacterium* y co-cultivo con AGL1-pBBRacdSgabT, encontrando entre estos parámetros las condiciones óptimas para transformar transitoriamente las hojas de aguacate. Con estos resultados se facilita una futura transformación in planta de *Persea americana* y potenciales estudios de caracterización funcional de genes, rutas metabólicas y mejoramiento genético.

2. Marco teórico y antecedentes

Transformación genética

La transformación genética de plantas es un importante avance de las ciencias biológicas en el último siglo que ha permitido ahondar en el conocimiento de la biología vegetal y facilitar el mejoramiento de cultivos (Ramkumar, Lenka, Arya, & Bansal, 2020). Se trata de la introducción de material

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

genético exógeno en la célula vegetal que causa la expresión o inhibición de un gen de interés y así generando algún efecto metabólico. Este desarrollo ha sido empleado en la ciencia para generar plantas, conocidas como transgénicas, con atributos mejorados que le permiten, por ejemplo, aumentar la resistencia a plagas, a herbicidas y la tolerancia a estrés abióticos, entre otros (Chang et al., 2018; G. Song, Prieto, & Orbovic, 2019). Estos cambios genéticos pueden permanecer de forma estable en la planta, pasando a siguientes generaciones o ser eliminados después de un tiempo, Más adelante en este escrito se ahondará sobre las diferencias entre transformación estable o transitoria.

La transformación genética se logra con la inserción de un plásmido con un promotor constitutivo fuerte en célula vegetal a través de diferentes métodos como *Agrobacterium*, biobalística, partículas virales y entre otros. El promotor del virus mosaico de la coliflor (CaMV 35S) fue el primero empleado para sobreexpresar genes insertados artificialmente con éxito en plantas a principios de los 80's (Somssich, 2019). Este promotor es capaz de operar en un amplio rango de organismos y aunque en el presente se sigue siendo el promotor más empleado, ya se han desarrollado otros como el UBIQUITIN10 y otros promotores endógenos que han reemplazado al CaMV35S (Norris, Meyer, & Callis, 1993). La primera planta transformada de forma exitosa fue *Nicotiana tabacum* en 1983, confiriendo el gen exógeno ALCOHOL DESHIDROGENASA I perteneciente a levadura (Barton, Binns, Matzke, & Chilton, 1983). Desde ese momento, se han realizado numerosos estudios de transformación genética sobre diferentes plantas y entre ellas, una de las plantas más utilizadas para sobreexpresión de genes endógenos u exógenos es *Arabidopsis thaliana* por su característica de planta modelo, facilitando así la investigación de fenómenos biológicos relevantes para otras especies que aún no han sido estudiadas. La razón por la cual *A. thaliana* ha sido reconocida como principal planta modelo es por su pequeño genoma, rápido ciclo de vida, alta eficiencia de transformación, y su genoma ha sido totalmente secuenciado. Otras plantas también han sido empleadas como modelos, como *Arabis alpina* (Wötzel et al., 2022) o *Populus trichocarpa*, que han servido para estudiar más específicamente plantas perenes y especies arbóreas para las cuales *A. thaliana* ya no es un modelo apropiado. Por tanto, se ha buscado ampliar los estudios de transformación a otras especies obteniendo datos más certeros para cada planta en específico y no quedarse sólo con la información brindada por una planta modelo (G. Song et al., 2019).

El método de ingreso del material genético exógeno al interior de la planta es la primera barrera vencer para lograr una transformación exitosa ya que este es un proceso que suele causar dificultad debido a las propiedades del tejido de la planta. A continuación, se muestran los diferentes métodos para entregar el ADN exógeno, las cuales pueden ser más convenientes dependiendo de la especie o tipo de tejido a transformar y más adelante se ahondará en el método de transformación por *Agrobacterium tumefaciens*, el cual es de principal interés en este proyecto de investigación.

Diferentes métodos de transformación genética de plantas:

Existen múltiples métodos para transformar genéticamente el tejido vegetal, los cuales se pueden englobar en cuatro categorías; métodos físicos, químicos, por *Agrobacterium* o partículas virales. En la Fig. 1 y Tabla 1 se muestran los diferentes métodos existentes y sus ventajas. Sin embargo, a lo largo del manuscrito se profundizará en el proceso de transformación con *Agrobacterium*.

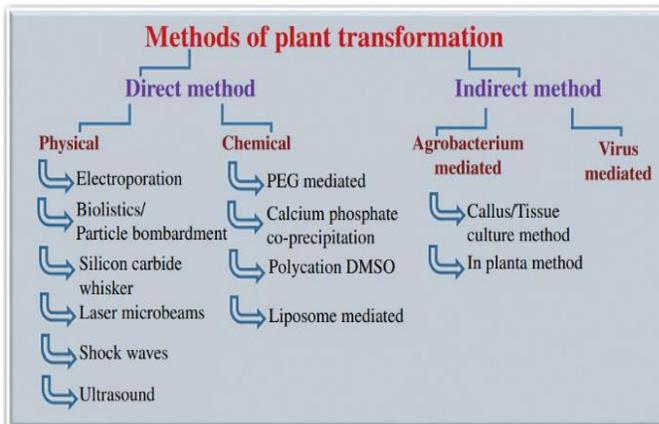


Fig. 1 Métodos para transformación de plantas. Tomado de (Saifi, Passricha, Tuteja, Kharb, & Tuteja, 2020)

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

	Method	Transformation efficiency	Tissue culture-based	Advantages	Drawbacks
A. Physical methods					
1.	Electroporation	Low to high	With and without tissue culture phase	Simple, fast, low cost	Low efficiency, requires laborious protocols, and transforms mainly protoplasts
2.	Biolistics/particle bombardment	High	With and without tissue culture phase	Simple, no need to remove cell wall, allows transformation of different cells, independent of the physiological properties of the cell, allows the use of multiple transgenes	High cost, low efficiency, transformation parameters must be optimized to each biological target employed, there is a risk of multiple copies of the introduced genes, DNA and cells can be damaged
3.	Silicon carbide whisker	Low to high	With tissue culture phase	Simple, fast, low cost, and can be used in different cell types	Very low efficiency, cells can be damaged affecting regeneration capabilities, could be hazardous to technicians due to fiber inhalation
4.	Laser microbeams	Low	With tissue culture phase	Allows precise and gentle treatment of cells, subcellular structures, and even individual DNA molecules	High cost (expensive equipment required), and laborious
5.	Shockwaves	High	With and without tissue culture phase	Fast, easy to perform, reproducible with high efficiency, no need of enzymatic cocktails, can be used to transform several cell types	Shockwave generators for this purpose are not on the market yet and experimental devices are relatively expensive
6.	Ultrasound	Low to high	Without tissue culture phase	Simple, inexpensive, and multifunctional equipment	
B. Chemical methods					
1.	PEG mediated	Low	With tissue culture phase	Applicable to large number of protoplasts simultaneously, can be applicable to wide range of species	Confined to protoplasts, reduced regeneration of fertile plant, DNA degradation, random integration of DNA causes undesirable traits
2.	Calcium phosphate coprecipitation	Low	With tissue culture phase	High efficiency with DMSO	High concentration of DNA required
3.	Polycation DMSO technique	High	With tissue culture phase	Less toxic	
4.	DEAE dextran method	Low to high	With tissue culture phase	Direct gene transfer method	Transient expression, reduction in plant regeneration, DNA damage, rearrangement or silencing of DNA
5.	Liposome-mediated transformation	Low to high	With tissue culture phase	DNA is protected from damage, applicable to wide range of plant species, good reproducibility	Regeneration of plant is difficult
S. no.	Method	Transformation efficiency	Tissue culture phase	Advantages	Drawbacks
1 Agrobacterium-mediated transformation					
a	Tissue culture-based transformation	High	Tissue culture phase	Stable integration, efficient	Costly, regeneration of plant, somaclonal variation, chromosomal aberration
b	In planta transformation	High	Without tissue culture phase	Stable integration, highly efficient	Cost effective, fast, useful for recalcitrant species
2	Virus-mediated gene transformation	High	With tissue culture phase	Rapid	Nonintegrative, transient

Tabla 1 Ventajas y desventajas de los métodos de transformación. Tomado de (Saifi et al., 2020)

Mecanismo de transformación genética de plantas por Agrobacterium tumefaciens:

A. tumefaciens tiene la capacidad natural de transferir fragmentos de DNA hacia el interior de las células vegetales, el cual puede ser insertado permanentemente (transformación estable) o no (transitoria) en el genoma de la planta. Esta bacteria es un fitopatógeno del suelo que naturalmente infecta los sitios de herida en plantas y causa unos tumores conocidos como “Corona de agallas” a través de la transferencia del T-DNA de *Agrobacterium* (Chilton et al., 1977). Este mecanismo comprende un complejo número de pasos y ha sido ampliamente estudiado y revisado (Hwang, Yu, & Lai, 2017; Lacroix & Citovsky, 2013). Resumidamente, para realizar la transformación *Agrobacterium* usa su plásmido Ti (tumor-inducing), el cual contiene dos componentes principales: 1) la región T-DNA que está delimitada por 25 pares de bases con secuencias repetidas al final de la región T, llamadas secuencias borde. Este T-DNA es el material genético que es transferido hacia la planta. 2) región de virulencia (*vir*) compuesta principalmente por siete loci codificantes de proteínas que procesan y transfieren el T-DNA. En la Fig. 2 se puede observar un esquema general del proceso de infección de *Agrobacterium*, donde se observa como primer paso la unión de *Agrobacterium* a la célula vegetal luego esta detecta compuestos (fenólicos, flavonoides, lignina) de la planta que indican presencia de herida que a su vez estimulan la expresión de genes de virulencia (Hwang et al., 2017). Luego ocurre el transporte de T-DNA y proteínas Vir por medio del sistema de secreción tipo 4 (T4SS) y finalmente ocurre el movimiento en el citoplasma e importe nuclear del T-DNA para lograr la integración y expresión del DNA exógeno.

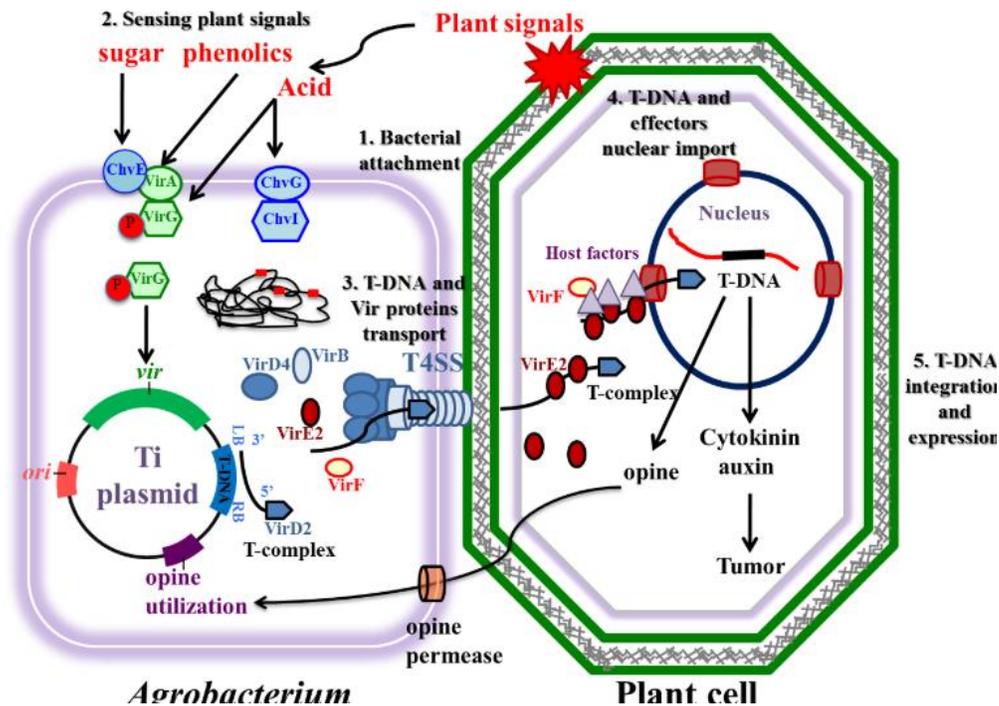


Fig. 2 Proceso de infección de *Agrobacterium* visto en 5 pasos generales. Extraído de (Hwang et al., 2017)

Para usos biotecnológicos se descubrió que los genes correspondientes a la inducción de tumor podían ser eliminados para lograr una transferencia de T-DNA sin la presencia de la enfermedad de corona de agallas (Greve et al., 1982). A estas variedades mutantes se les llamó cepas deconstruidas. Posteriormente se encontró la forma de insertar genes heterólogos en el T-DNA, permitiendo la expresión de genes de resistencia en plantas transgénicas (Greve et al., 1982), a partir de lo cual ha permitido múltiples desarrollos en cuanto a vectores que pueden ser usados para realizar transformación genética de plantas.

Transformación estable:

Es el proceso por el cual un fragmento exógeno de DNA se inserta en el cromosoma de una planta y ésta expresa permanentemente el transgén transfiriéndolo a la siguiente generación. Existen diferentes métodos para lograr la transformación estable, cómo la biobalística, transformación de protoplastos por electroporación, co-cultivo de raíces o flores (floral dipping) con *Agrobacterium* (Hwang et al.,

2017). La mayoría de estos métodos requieren de la regeneración *in vitro* de tejido transformado por selección con antibióticos para asegurar que la planta se desarrolle con la presencia del gen de resistencia. En la Fig. 3 se muestra una comparación entre el proceso general de transformación estable y transitoria, qué será explicada posteriormente.

Transformación transitoria:

Una forma de transformar plantas sin modificar el genoma de la planta es a través de la inserción de un vector de expresión en un tejido específico de la planta y por un tiempo limitado. Es decir, no hay una expresión constitutiva del gen de interés y no se transmite a las siguientes generaciones. Esto puede ser logrado a través de diversas estrategias, cómo el uso de vectores no constitutivos, transformación de tejido adulto, que ya no pueda replicar el vector constitutivo a tejidos meristemáticos o a otras células de la planta, y uso de vectores o partículas virales modificadas que contengan el gen de interés.

Para el caso de vectores virales, estos son inoculados en la planta y la sobreexpresión del gen es llevada a cabo mediante la propia capacidad replicativa del virus. Muchos virus no tienen la capacidad de ingresar a tejidos meristemáticos y al no insertarse en el genoma, no hay posibilidad de transmitirse a la progenie; por tanto, son aptos para procesos de transformación transitoria. Estos vectores virales cuentan con ciertas ventajas sobre los vectores binarios, pues al replicarse lenta o progresivamente, no genera un cambio brusco en los niveles de expresión del gen y así se evita potenciales fenotipos anormales causados por una repentina expresión abundante en todos los tejidos de la planta (Klocko et al., 2016; Zhang, Tang, Lin, Ding, & Tong, 2018). Además, después de cierto tiempo, si la partícula viral alcanza infección sistémica, se producen altos niveles de expresión. Por ejemplo, algunos autores han reportado la expresión de genes de floración por vectores virales en cítricos (Velázquez et al., 2016), manzana (Yamagishi et al., 2011), uva (K. Maeda et al., 2020), obteniendo transformaciones exitosas y sin aparición de fenotipos extraños.

En general, la transformación transitoria aporta varias ventajas sobre la transformación estable mencionada anteriormente para la incursión en programas de mejoramiento genético: 1) Es rápida, pues no habría necesidad de regenerar la planta *in vitro*, cuyo proceso es complejo llevar a cabo en algunas especies recalcitrantes cómo el aguacate (Fig. 3), 2) Es de bajo costo con respecto a otros

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

métodos como biobalística., 3) En procesos de mejoramiento genético se eliminaría el paso de retro-cruza para segregarse afuera en fenotipo anormal causado por la planta transgénica; por tanto, tomaría menos tiempo.

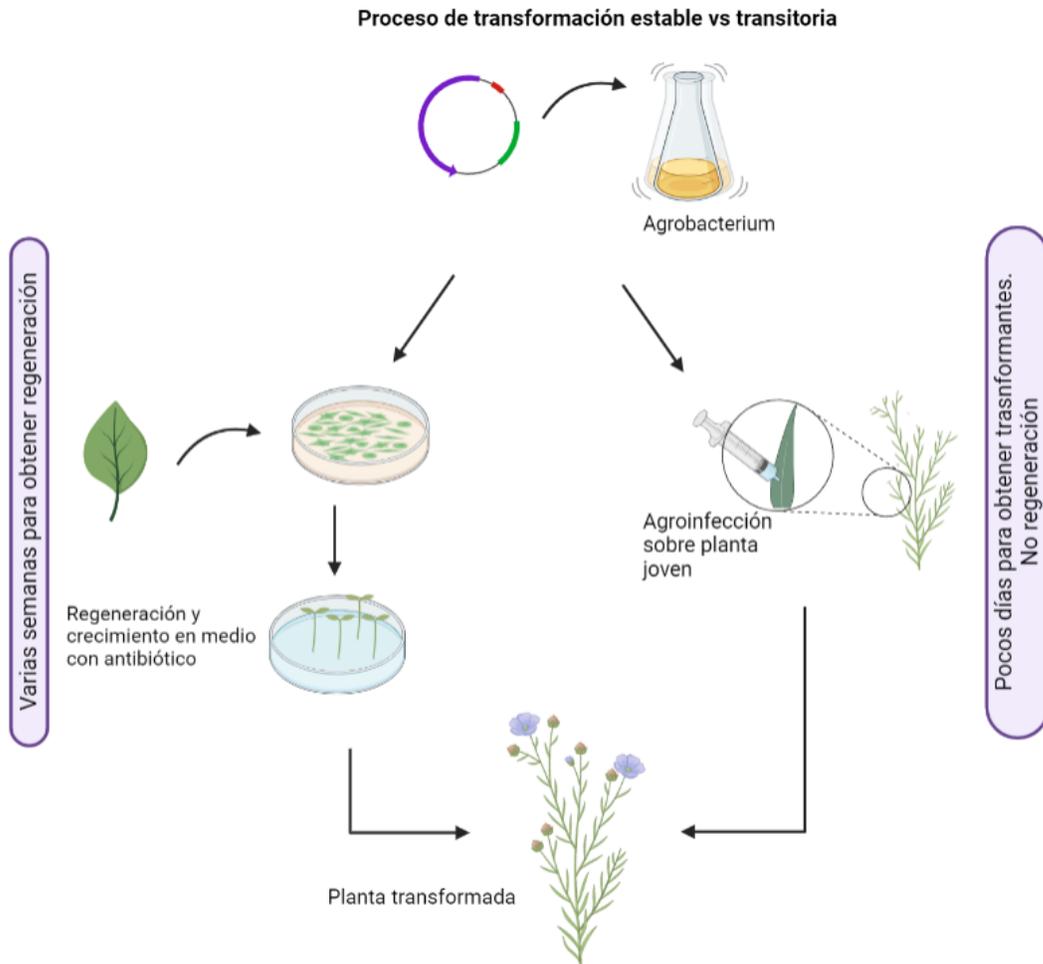


Fig. 3 Comparación en cuanto a tiempo entre transformación estable y transitoria.

Algunos vectores de expresión de interés:

Vector 35S:RUBY

Este constructo permite la expresión de tres enzimas bajo un mismo promotor, las cuales al expresarse sintetizan betalainas a partir de la tirosina que se encuentra en cualquier célula (He, Zhang, Sun, Zhan, & Zhao, 2020). El mecanismo para biosíntesis de betalainas consiste en tres reacciones enzimáticas, donde la tirosina primero es hidroxilada en su anillo de benceno por la enzima P450 oxigenasa CYP76AD1, resultando en L-3,4-dihydroxifenilalanina (L-DOPA) (Fig. 4). Luego L-DOPA es oxidada en ciclo-DOPA por CYP76AD1 o alternativamente es catalizada por L-DOPA 4,5-dioxigenasa (DODA) en ácido betalámico, el cual es luego condensado por reacción no enzimática con ciclo-DOPA para formar betanidina (Fig. 4). Luego, un residuo de azúcar se agrega a la betanidina por una glucosiltransferasa para generar la betalaina (Fig. 4).

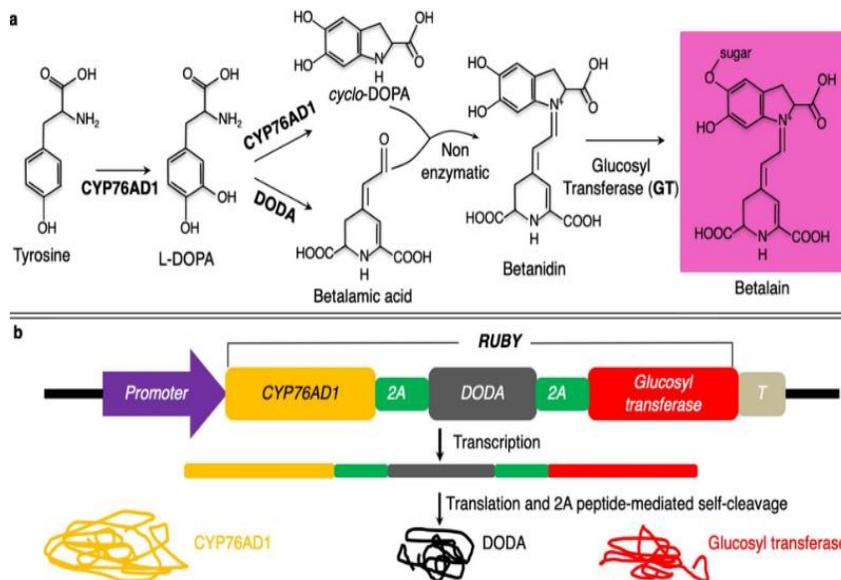


Fig. 4 Cassette 35S:RUBY. Tomado de (He et al., 2020)

El sistema reportero de 35S:RUBY tiene ciertas ventajas sobre otros sistemas como proteínas fluorescentes, β-glucuronidasa (GUS) o Luciferasa (LUC), pues no necesita ningún reactivo o equipo sofisticado para ser visualizado. Simplemente bajo luz natural se observa la coloración roja rubí en el tejido transformado sin necesidad de sacrificar el tejido. Como desventaja frente a las proteínas fluorescentes, es que estas pueden fusionarse con otras proteínas para marcaje, mientras que con el

sistema de *RUBY* no es posible marcar proteínas pues la coloración roja es el producto de la expresión de 3 proteínas diferentes y no de un dominio proteico.

Vector *pJL.TRBO*

Un vector viral que ha demostrado alta eficiencia en solanáceas es *pJL-TRBO* (TMV RNA-based overexpression), el cual está basado en el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), al que se le ha retirado su proteína de cápside (CP) (Fig. 5); por tanto, no puede moverse e infectar sistémicamente la planta como el TMV original, pero tiene una muy alta eficiencia de agroinfección y altos niveles de expresión transitoria de proteína foránea y tiene cierto movimiento de célula a célula que después de un tiempo puede llegar a cubrir tejido más allá de la zona de agroinfección (Oa & Lindbo, 2007). Este vector no ha sido utilizado para la sobreexpresión de genes de floración en plantas perenes; sin embargo, se tiene en cuenta como una opción por su alta efectividad en la agroinfección, teniendo en cuenta que el aguacate es una especie recalcitrante, difícil de transformar. Tiene una longitud total de 10608 pb y confiere resistencia a Kanamicina

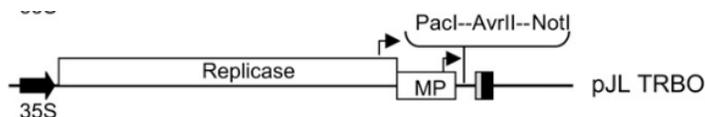


Fig. 5 Región T-DNA del plásmido *pJL-TRBO* (Oa & Lindbo, 2007)

Vector *pEff*

Vector viral basado en el *El virus X de la papa* (PVX) con una reducción de 7kb de secuencia no esencial y una adición de un cassette de expresión del supresor de silenciamiento P24. Este vector contiene una región 5'UTR modificada (inserción del RNA 4 del virus de mosaico de alfalfa (AMV)), la cual confiere una elevada producción de proteína, tiene una longitud total de 14502 pb y confiere resistencia Kanamicina (Mardanov et al., 2017). Este es un vector que no tiene capacidad de moverse sistémicamente a través de la planta, pero tiene capacidad de producir altas cantidades de proteína.

Vector *pBBRacdSgabT*

Es un vector desarrollado recientemente que proporciona mayor eficiencia de transformación por *Agrobacterium*, a través de la remoción de factores negativos de la interacción planta-*Agrobacterium* causados por la activación de la ruta del etileno (Nonaka, Someya, Kadota, Nakamura, & Ezura, 2019). Contiene los genes ACC desaminasa (*acdS*) y GABA transaminasa (*gabT*) los cuales se encargan de inactivar el precursor de etileno 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y el desencadenador del Quorum sensing (QS) ácido gamma aminobutírico (GABA). Al expresar estos *acdS* e inactivar ACC, se está evitando una respuesta oxidativa del tejido vegetal además de evitar la activación de genes de defensa en la planta. La expresión de *gabT* evita el desencadenamiento una ruta de señalización ante estrés en la planta al mismo tiempo que evita el QS en *Agrobacterium* (Fig. 6). En el estudio mencionado, se reporta evaluación de este vector en las plantas *Erianthus ravennae*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, y *S. torvum*, donde se obtuvieron superiores eficiencias de transformación en cada planta con respecto al control.

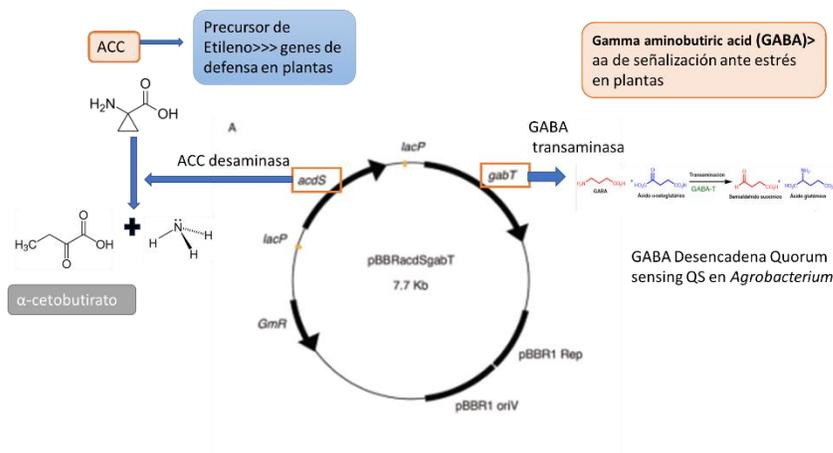


Fig. 6 Expresión de *acdS* y *gabT* inactivan rutas de defensa y estrés en la planta

Vector *CLBV*:

Es un vector viral basado en el *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) el cual logra altos niveles de expresión en Citrus y probablemente en otras especies arbóreas (Velázquez et al., 2016). En este trabajo se inoculó (por injerto o raspado) viriones de CLBV con una inserción del gen FT en su secuencia en

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

varias especies de Citrus, en todas las plantas se observó infección sistémica; por tanto, expresión del gen FT exógeno y floración temprana. Las plantas lograron tener el vector de forma estable por 5 años y con muy baja probabilidad de heredarlo a la progenie, pues no se encontró presencia del virus en el polen, y sólo 1 semilla de 156 tuvo presencia del vector. Cómo CLBV causa infección asintomática en citrus, no se presentó cambios fenotípicos debido a silenciamiento o expresión de genes. Este virus en específico no es transmitido por vectores, su reproducción es lenta y no se da en cada célula de la planta, lo que le permite desarrollarse con normalidad en sus primeras etapas antes de alcanzar el umbral mínimo de concentración viral o FT necesarios para realizar el cambio fisiológico para la reproducción, pues se ha encontrado que cuando gen es sobre-expresado desde los inicios de su desarrollo y en cada célula de la planta, hay mayor probabilidad de obtener fenotipos anormales (Endo et al., 2005; Zhang et al., 2018). En este estudio no se requirió regenerar la planta y por tanto, tampoco el uso de antibióticos de resistencia para seleccionar el transformante.

Vector ALSV

Vector basado en el Apple latent spherical virus (ALSV) (Kiyooki Maeda et al., 2020), el cual transforma al co-infiltrar 2 vectores que contienen los replicones RNA1 y RNA2 del virus, los cuales constan de 6813 pb y 3385 pb respectivamente. En el RNA 2 viene el sitio de multiclonación con *Xho* I, *Sma*I y *Bam*HI para insertar el GO. Este vector contiene gen de resistencia a ampicilina. Ha sido utilizado para transformar diversas especies perenes cómo manzana, pera, rosa, uva, entre otras. Por ejemplo, se logró acelerar la floración en *V. vinifera*, obteniendo brotes florales después de 20-30 días de la inoculación del vector proveniente del virus ALSV por biobalística, el cual también causa una infección asintomática en la vid. En inducción floral, la aplicación de vectores virales ha sido poca probablemente por ser una técnica relativamente nueva, pero también tiene un buen potencial por la posibilidad de transferir el gen de interés sin necesidad de regenerar la planta después de transformar

Vector pHREAC

Este vector está basado en pEAQ-HT que a su vez proviene del vector de expresión *CPMV*-HT que usa UTRs del RNA-2 de *Cowpea mosaic virus* (CPMV). Para pHREAC el extremo 5' tiene mutaciones hyper trans (HT), donde los codones AUG corriente arriba son removidos, mejorando así eficiencias traduccionales (Peyret, Brown, & Lomonosoff, 2019). Tiene una longitud total de 10494 pb y confiere resistencia a Kanamicina.

Persea americana:

El Aguacate (*Persea americana* Mill) es una especie de la familia Laureaceae con $2n=24$ cromosomas, es endémico de las zonas tropicales de Centroamérica. Existen ocho subespecies o ecotipos de *P. americana*, 3 de las cuales comprenden el aguacate común: 1. Subespecies Mexicanas, *P. americana* var. *drimifolia*, la cual se cree que es originario del centro-sur de México y está adaptado a tierras tropicales altas. 2. Subespecies Guatemaltecas, *P. americana* var. *guatemalensis*, adaptado a elevaciones medias en el trópico. 3. Subespecies Indias Occidentales, *P. americana* var. *americana* Mill, adaptado a tierras bajas húmedas tropicales.

Las flores pueden ser funcionalmente tanto hembra como macho (bisexuales), aunque una misma flor no puede auto fecundarse. Nacen de los terminales de las ramas como panículas con pedicelos cortos pubescentes. Tiene 12 estambres, el pistilo se compone de un ovario blanco pubescente que termina en un estilo corto de estigma globoso. No existen barreras genéticas entre las subespecies/razas de aguacate y muchos cultivares son híbridos entre dos o más subespecies; por ejemplo, “Hass” y “Fuerte” son híbridos entre variedades guatemaltecas y mexicanas y está adaptado a climas mediterráneos, ej. California (USA), Chile y Michoacán (México). El método preferido para propagación de variedades comerciales es el injerto, ya que, debido a la gran variabilidad genética, los árboles propagados sexualmente por semilla rara vez producen frutos de igual calidad a la de sus progenitores. Así, la propagación asexual por injerto es la forma más apropiada para generar árboles uniformes en cuanto a calidad, forma, y tamaño del fruto. Árboles injertados empiezan producción de flores después de 3-4 años. También el uso de injertos es una práctica realizada por los cultivadores en todo el mundo para obtener mejoras en cuanto a tolerancia a la salinidad, resistencia a patógenos y generación de árboles enanos.

El fruto del aguacate es una drupa globosa, con pulpa carnosa, una semilla y dependiendo de la variedad, los frutos difieren en tamaño, forma y color. Por la importancia comercial de su fruto, el aguacate es cultivado en varios países como México, República Dominicana, Perú, Colombia, Indonesia, siendo el cultivar Hass el más producido (FAOSTAT, 2021). La unión europea y norte américa son los más grandes importadores de aguacate. En las Fig. 7 y Fig. 8 se muestra el nivel de producción de aguacates en México con respecto a otros países y otros productos de exportación.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

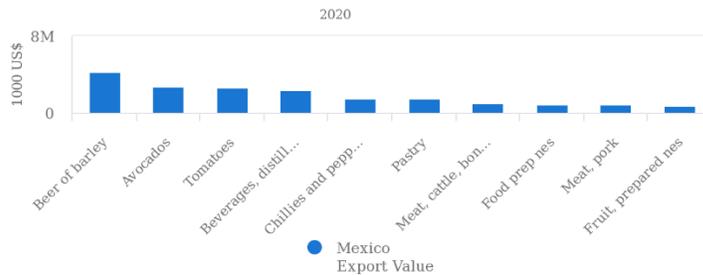
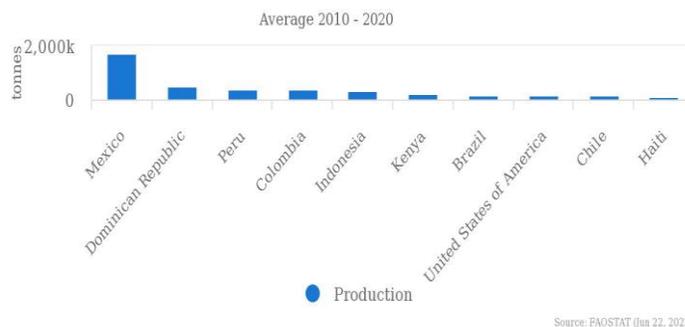


Fig. 7 Top 10 de productos de exportación de México en el 2020



Source: FAOSTAT (Jun 22, 2022)

Fig. 8 Top 10 de productores de aguacate a nivel mundial entre 2010 y 2020

Antecedentes de transformación estable en aguacate

La mayoría de trabajos de transformación en aguacate han sido a través de transformación estable sobre tejido *in vitro* y con bajas eficiencias de transformación según se reporta en la revisión de Tamayo-Ramos et al (2022). En este trabajo se encuentra que el método mayormente empleado de transformación es a través de *Agrobacterium tumefaciens* con las cepas 9749 ASE2, EHA101, EHA105, AGL1, GV3850 y LBA4404. Uno de los estudios realizó transformación *in planta* con *A. rhizogenes* en raíz de aguacate como alternativa para conferir resistencia al patógeno o *Phytophthora cinnamomic* (Prabhu et al., 2017). Sin embargo, este fue un estudio de prueba de concepto no optimizado y hasta ahora no se ha publicado posteriores estudios. En la Fig. 9 se presenta una tabla resumen de todos los trabajos de transformación en aguacate y los logros alcanzados.

Transformación estable no se tiene en cuenta para este trabajo pues, aunque los protocolos ya están bien definidos para varias especies vegetales, es un proceso que conlleva bastante tiempo para especies recalcitrantes como el aguacate y pueden surgir inconvenientes al momento de regenerar la planta cuando se está haciendo cultivo *in vitro*, conllevando a bajas tasas de regeneración. Por

ejemplo, el equipo de Prewitt et al., con 20 años de experiencia en el cultivo *in vitro* de cacao, recientemente realizó transformación estable sobre tejidos de cacao con los genes *AtFT* o *TcFT*, donde los explantes transformados con *TcFT* no pudieron ser regenerados pues no formaron raíces o tallos (Prewitt, Shalit-Kaneh, Maximova, & Gultinan, 2021). Aunque los explantes con *AtFT* si desarrollaron estructuras y florecieron en la etapa *in vitro*, murieron poco después de florecer. Tal vez, este inconveniente de no regeneración o muerte precoz pueda ser solucionado con el uso de promotores inducibles para permitir a la planta desarrollarse con normalidad durante sus primeras etapas antes de expresar el transgén.

Antecedentes de transformación transitoria en aguacate

Solo un estudio ha realizado transformación transitoria sobre tejido *in vitro* logrando 76 puntos teñidos con GUS por placa bombardeada de callo embriogénico (0,5 g) (Chaparro-Pulido, Montiel, Palomo-Ríos, Mercado, & Pliego-Alfaro, 2014); sin embargo, es baja la eficiencia de transformación comparada con trabajos de otras especies que pueden alcanzar más de 100 veces este número de puntos. En la Fig. 9 se presenta una tabla resumen de todos los trabajos de transformación en aguacate y los logros alcanzados. Hasta ahora no se ha publicado estudios de transformación transitoria *in planta* del aguacate.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

(a) Tissue Employed (b) Transformation method	(a) Remarks/contributions (b) Efficiency (c) Presence of gene tested/ gene functionally tested
(a) Proembryonic masses (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (9749 ASE2 strain): superficial damage and co-cultivation	(a) First successful experimental <i>Agrobacterium</i> -mediated transformation (b) Not reported (c) Scanned with GUS staining, confirmed with PCR and Southern Blot/Not within scope (Cruz-Hernández et al. 1998)
(a) Proembryonic masses (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (EHA101 strain): superficial damage and co-cultivation	(a) S-adenosyl-L-Methionine (SAM) hydrolase was inserted to potentially reduce ripening on avocado fruit. A protocol for cryopreserving transformed tissue was established (b) Not reported (c) PCR analysis/No functional characterisation (Efendi 2003)
(a) Proembryonic masses (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (EHA105 strain): superficial damage and co-cultivation	(a) Experiments were in progress to insert chitinase, β -1,6-glucanase, and antifungal protein genes to enhance resistance to root and foliar diseases (b) Not reported (c) Not explicit due to the nature of the article (congress memories) but most likely PCR/ Not functionally tested (Raharjo et al. 2003)
(a) Proembryonic masses (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (EHA101 and EHA105 strains): superficial damage and co-cultivation	(a) Proposed improving shelf-life by inserting ACC deaminase and <i>samK</i> genes; and antifungal protein, chalcone synthase, chitinase and glucanase genes for controlling <i>Phytophthora</i> root rot (b) Not reported (c) PCR aside from GUS staining / Not functionally tested (Litz et al. 2005, 2007)
(a) Proembryonic masses (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (EHA105 strain): Superficial damage and co-cultivation	Transformation with antifungal plant defensin <i>pdf1.2</i> gene and <i>bar</i> as a selection gene. First full regeneration of transformed embryos into plants via micrografting shoots. Herbicide resistance on regenerated plants was confirmed (b) Not reported (c) PCR, GUS staining, Southern Blot / PDF not functionally tested (Raharjo et al. 2008)
(a) Globular stage somatic embryos (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (AGL1 strain): Immersion of the tissue in bacterial suspension	(a) Transformation advancements on inserting <i>AtNPR1</i> gene as a potential way to induce tolerance against <i>Rosellinia necatrix</i> (b) 3.3% measured as the number of calli actively growing in selective media, divided by the number of SE inoculated groups (c) PCR / No functional characterisation in grown plants (Palomo-Ríos et al. 2011)
(a) Globular stage somatic embryos (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (AGL1, EHA105 and LBA4404 strains): Immersion of the tissue in bacterial suspension	(a) Evaluated bacterial strains, washing antibiotics (best was timentin) and optimised antibiotic selection of this type of tissue, which was more sensitive to kanamycin, thus reducing risk of false positives (b) 6%–1.2% measured as the number of calli actively growing in selective media, divided by the number of SE inoculated groups (c) PCR, GUS staining / Non-applicable with the scope (Palomo-Ríos et al. 2012)
(a) Embryonic shoot axes (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (AGL1, GV3850 and LBA4404 strains): immersion of tissue in bacterial suspension	(a) Evaluated different strains, acetosyringone concentrations, and pH of co-cultivation media. Best results were obtained with 200 μ M of acetosyringone, GV3850 strain plus pB1121, and a pH of 5.2 (b) Large areas of blue during GUS staining to few (c) PCR / Non-applicable with the scope (Ahmed et al. 2012)
(a) Globular stage somatic embryos (juvenile) (b) In vitro, biolistics	(a) First report and optimisation of biolistic transformation in avocado. Best physical parameters found were a He-pressure of 900 psi and 6 cm target distance. Evaluated fluorescent markers green fluorescent protein (GFP) and fluorescent red protein DsRed for the process (b) 76 spots per bombarded plate of embryogenic callus (0.5 g) (c) GUS, fluorescence, evaluated fluorescence due to the scope of the paper (Chaparro-Pulido et al. 2014)
(a) Shoot bases of 8–20-week-old seedlings, (mature roots/bases) (b) In planta, wounding, exposure to <i>A. rhizogenes</i> (Arqua1 and K599) and brush application of a chemical treatment	(a) Non-optimised proof-of-concept of a method to transform without in vitro techniques. Originally a proposal to grant resistance to <i>Phytophthora cinnamomica</i> root rot (b) 17–25% composite plants generated (with at least one transformed root) and average number of transgenic roots in all plants < 1 (c) PCR, Southern Blot, fluorescence, GUS staining/After seven days, no difference in pathogen load between transgenic and control roots but no other characterisation was performed (Prabhu et al. 2017)
(a) Globular stage somatic embryos (juvenile) (b) In vitro approach, <i>A. tumefaciens</i> -mediated (AGL1 strain) Immersion of the tissue in bacterial suspension	(a) Proved useful early selection of transgenic tissue with fluorescent proteins, regeneration procedures were improved with thidiazuron (b) 10% of inoculated explants actively growing on selection medium (c) PCR, fluorescence / Focused on testing fluorescence (Palomo-Ríos et al. 2017)

Fig. 9 Diferentes estudios de transformación genética en aguacate y logros alcanzados en cada caso. Tomado de (Tamayo-Ramos et al., 2022)

Factores importantes para tener en cuenta en la transformación transitoria de aguacate:

Aunque aún no se encuentren estudios de transformación transitoria en aguacate, se puede tener en cuenta las estrategias que se hayan usado en estudios de expresión transitoria con otras especies vegetales y acoplarlo al estudio del aguacate. En otros trabajos donde se transforman transitoriamente plantas diferentes al aguacate, han podido lograrlo a través del uso de diversas técnicas optimizadas que se pueden tener en cuenta para el presente proyecto.

Edad de la hoja:

Algunos estudios han encontrado relación entre la edad de la hoja y la eficiencia de transformación por agroinfiltración. Se ha observado por microscopía electrónica de transmisión el espacio intersticial de la hoja después de realizar agrotransformación y encuentran que en hojas jóvenes hay más concentración de *Agrobacterium*, mientras que, con hojas de 90 días escasamente se observó presencia de bacterias (Han, Ma, Kong, Takano, & Liu, 2013). Al igual, (Verma, 2008) observa que hojas jóvenes tenían espacios mayores en las uniones entre células y las bacterias se acomodaron en esos espacios, mientras en las hojas viejas se observó sustancialmente menos superficies de unión y por tanto menos eficiencia de transformación. Aun así, el uso de hojas demasiado jóvenes no es conveniente y suele presentar bajas eficiencias de transformación ya que el tejido puede ser muy débil para soportar la infiltración con *Agrobacterium*. Por ejemplo, un estudio de transformación estable con explantes de *Boehmeria nivea* (Xia An, 2014), se encontró que partir de hojas viejas (60 días) o muy jóvenes (20 días) genera baja eficiencia de transformación, mientras las hojas de edad media (40 días) se transforman con alta eficiencia.

Microheridas:

Se ha encontrado que los genes de virulencia (*Vir*) de *Agrobacterium tumefaciens* son activados específicamente por moléculas como acetosiringona (AS) y α -hidroxiacetosiringona (OH-AS), las cuales están presente en exudados de plantas heridas y metabólicamente activas (S. E. Stachel, Nester, & Zambryski, 1986; Scott E. Stachel, Messens, Van Montagu, & Zambryski, 1985) Estas moléculas inducen el regulón entero de *vir* así como la formación de intermediarios de moléculas T-DNA (Fig.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

10). Aparte de AS y OH-AS, posteriores estudios han probado la activación de los genes *vir* a partir de otros compuestos activos como cloroxinil (Kimura, Cutler, & Isobe, 2015).

Algunas de las barreras que impiden la transformación de hoja de aguacate pueden ser debidas a varias características cruciales al momento de infiltrar, como la alta pubescencia de hojas jóvenes (Yasir, Das, & Kharya, 2010), gruesa cutícula cerosa, estomas cerrados en edad adulta (Carr, 2013) o apretados espacios intersticiales (Gonzalez-Calderon et al., 2011). Estas barreras podrían ser superadas a través de la aplicación de micro heridas en las hojas para hacer más accesible el medio de infiltración al interior de la hoja; por ejemplo (Acanda, Welker, Orbović, & Levy, 2021; Andrieu et al., 2012) usaron esta estrategia en citrus y arroz para lograr o aumentar la eficiencia de transformación. En la Fig. 10 se muestra cómo sería la generación de micro-heridas en una hoja empleando un rodillo de micro agujas y un cuadro explicativo de cómo las heridas pueden aumentar la eficiencia de transformación.

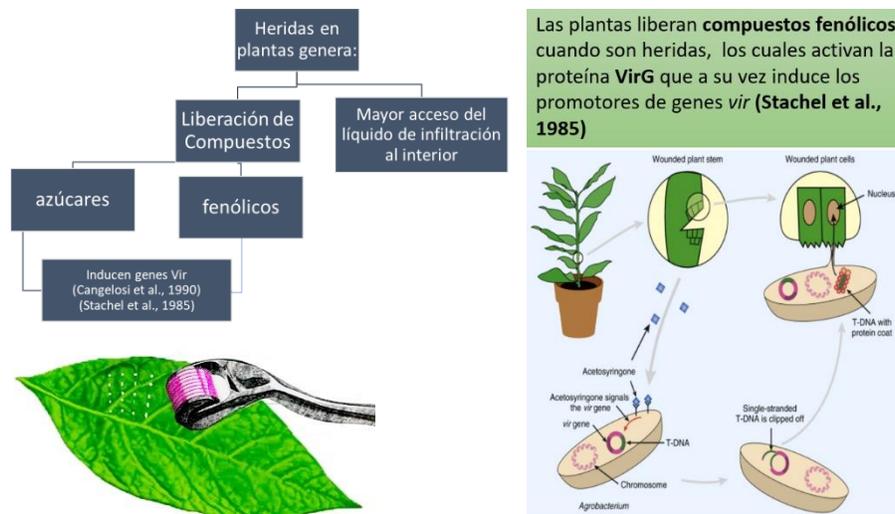


Fig. 10 Estrategia de aumentar eficiencia de transformación por generación de micro-heridas en hojas a través del rodillo de micro agujas

Métodos mecánicos de infiltración

Los métodos físicos más utilizados para realizar transformación por *Agrobacterium* son: co-cultivo, infiltración por jeringa e infiltración por vacío, Por ejemplo, en un estudio con hojas de espinaca se

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

probó 2 métodos de infiltración (vacío y jeringa), junto con diversas cepas de *Agrobacterium*, presencia o no del supresor de silenciamiento p19, y varios valores de densidad óptica de suspensión bacteriana para optimizar cada uno de estos valores con respecto a la eficiencia de transformación (Viet, Reniel, Jiwon, Young, & Oh, 2017).

Compuestos fenólicos:

También, para mejorar la transformación transitoria se han empleado compuestos fenólicos similares a los exudados por las plantas cuando están heridas, siendo la acetosiringona (AS) uno de los más empleados. Como se ha mencionado anteriormente en la sesión de micro-heridas, estos compuestos pueden incentivar la activación de los genes *vir* de *Agrobacterium*; y por tanto, aumentar la eficiencia de transformación. La mayoría de estudios reporta concentraciones de acetosiringona de 100 a 250 μM (Degtyarenko, Gorpenchenko, Grigorchuk, Bulgakov, & Shkryl, 2021; Hosein, Lennon, & Umaharan, 2012), ya que a mayores concentraciones suele ser tóxica e inhibe la transformación bacteria. Aunque hay algunos estudios que usan concentraciones mayores a 1000 μM (Zheng et al., 2021). En un estudio sobre Lotus, además del uso de AS, también se probó la concentración óptima de un nuevo compuesto llamado Cloroxinil, el cual generó un aumento significativo en la eficiencia de transformación (Kimura et al., 2015). Son varios los diversos tipos de compuestos que también se ha probado que pueden activar los genes *vir* (Dyé, Berthelot, Griffon, Delay, & Delmotte, 1997; Gelvin, 2006; Scott E. Stachel et al., 1985); sin embargo, AS se ha convertido en la principal molécula empleada en la inducción de la virulencia en *Agrobacterium*.

Ácido Jasmónico (AJ).

Los jasmonatos son un grupo de moléculas señalizadoras derivadas de ácidos grasos que están envueltas en muchos procesos de desarrollo en la planta; como crecimiento de raíz, tuberización, desarrollo de polen, germinación y tienen un importante rol para inducir señales de defensa ante ataque de insectos, estrés ambiental, déficit hídrico, infección de patógenos y heridas (Cheng et al., 2011; Penninckx et al., 1996). Ante el ataque de insectos en la planta activa la resistencia sistémica inducida (ISR) mientras inactiva la ruta de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Li et al., 2021), la cual es activada por ácido salicílico y ocurre en respuesta a ataque de microorganismos (Fig. 11). Se ha encontrado que al exponer plantas a metil-jasmonato (MeJA), se induce la respuesta inmune

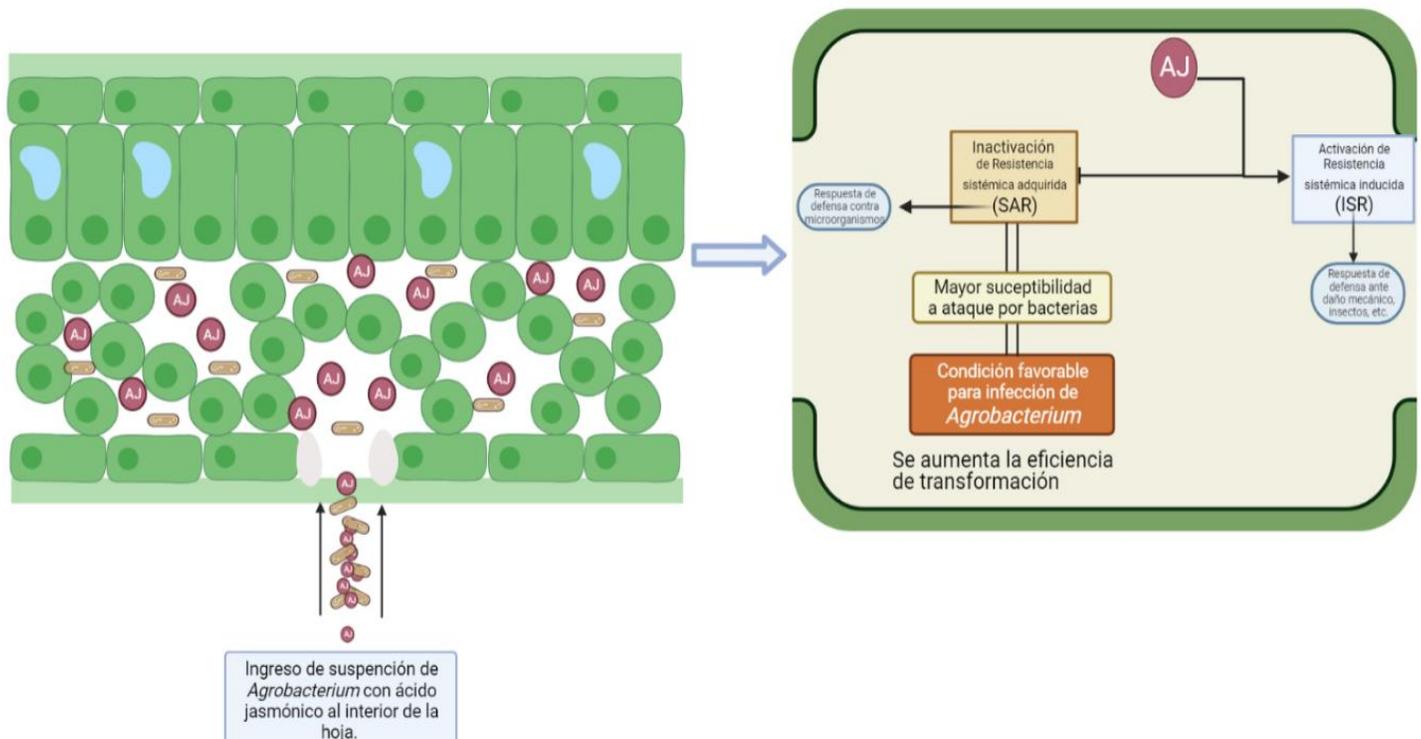


Fig. 11 Esquema que relaciona el AJ con las rutas SAR e ISR y cómo esta interacción puede favorecer la transformación por *Agrobacterium*

asociada a insectos, donde hay acumulación de proteasas tal cómo sucedería ante el ataque con insectos (Li et al., 2021). Así que se podría deducir que, ante altas concentraciones de AJ, la planta está empleando más energía en activar y producir la respuesta a ataque por insectos, en comparación

con la producción de respuestas a bacterias. Por tanto, puede haber debilitamiento de la ruta SAR y las plantas pueden ser más susceptibles a la infección de *Agrobacterium*.

Se ha reportado que el uso de AJ al momento de realizar agroinfiltración puede tener un efecto positivo sobre la eficiencia de transformación (S. Jung & Mcdonald, 2016). En la Fig. 12 se puede observar cómo estos autores probaron diferentes hormonas en la transformación de hojas de girasol y obtuvieron mayor acumulación de la enzima recombinante tanto en el cuarto día post infiltración (DPI) como en el 6 DPI al usar AJ con respecto al control.

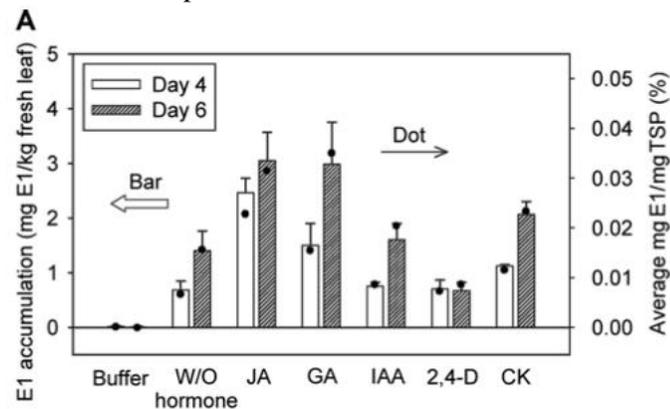


Fig. 12 Efecto del ácido jasmónico sobre la eficiencia de transformación en hojas de girasol (S. Jung & Mcdonald, 2016).

Supresores de silenciamiento:

Otro factor clave en la transformación de plantas es el mecanismo de silenciamiento de RNA que usa la planta para defenderse de infecciones bacterianas o virales, este mecanismo ocasiona que los constructos agro-inoculados se inhiban después de unos días. Para combatir este silenciamiento se han usado supresores del silenciamiento, los cuales son de origen viral; por ejemplo, p19, V2, HcPro y entre otros. Por ejemplo, en cotiledones de *Catharantus* se encontró que la eficiencia de transformación puede ser mejorada con la presencia de plásmidos que contienen Hcpro o p19 (Mortensen et al., 2019).

Surfactantes:

El flujo de las suspensiones bacterianas a través de los estomas y epidermis de la planta se ve impedido por la alta tensión superficial de las soluciones acuosas, para poder superar este inconveniente, generalmente se usa aplicación de presión externa (por vacío o jeringa sin aguja) para causar la introducción de las bacterias. También, para mejorar este proceso se han usado surfactantes para disminuir la tensión superficial del medio de co-cultivo, entre los más usados están Triton X-100 y Silwett L-77; por ejemplo, en otro estudio con *Catharantus* se encontró que Silwett L-77 incrementa significativamente la eficiencia de transformación a una concentración óptima de 0.03% (Lizamore & Winefield, 2015).

Temperatura de incubación post infiltración.

Entre otros factores para tener en cuenta en la transformación, se ha encontrado que la T° de incubación de la hoja o planta después de ser agroinfiltrada es crítica, pues para que *Agrobacterium* active sus genes de virulencia se necesita una T° de aproximadamente 20°C pero luego para que la planta exprese las proteínas de los genes transferidos por *Agrobacterium*, dependiendo de la planta se requiere una mayor temperatura para activar su metabolismo. Por ejemplo, para hojas de girasol se ha encontrado que el mejor tratamiento es 20°C para agroinfiltración y realizar choque de 30°C después del cuarto día de incubación (S. K. Jung, McDonald, & Dandekar, 2015).

3. Planteamiento del problema

Persea americana o aguacate es un árbol frutal de interés comercial, cuya producción radica principalmente en el cultivar Hass (80% producción total). La explotación univarietal del aguacate Hass; es decir, prácticamente el único cultivar de aguacate producido en varias regiones del mundo, puede causar la pérdida de biodiversidad y convertirse en una amenaza para la agroindustria ante la aparición de problemas fitosanitarios o condiciones climáticas adversas; por ejemplo repetirse el caso del Tizón foliar por maydis, que en los años 70's causó graves daños a las variedades de maíz en USA, forzando una disminución del 40% en la producción nacional (Osei, Asante, Agyeman, Adebayo, & Adu-Dapaah, 2014) . Uno de los factores que impulsó el desastre fue la falta de genes de resistencia en los antecedentes genéticos de las variedades híbridas de maíz que los agricultores estaban sembrando en ese momento. Una forma de generar nuevos cultivares podría ser a través de

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

programas de mejoramiento genético a través de cruzas controladas, pero plantas como el aguacate tienen largo periodo juvenil; donde la producción frutal empieza mínimo desde el tercer o cuarto año desde germinación o injertado (Alcaraz & Hormazaa, 2019). Además, que estos programas también pueden requerir plantas transgénicas para realizar las cruzas y hasta ahora no se tiene transformación genética del cultivar Hass.

Aún no se ha desarrollado ningún estudio de transformación transitoria en esta planta. Para iniciar este estudio se debe tener en cuenta que es una especie compleja para cultivar *in vitro* con baja supervivencia, por tanto, sería pertinente usar el método de infiltración de tejido adulto (hojas) para evitar el paso de regeneración. Este método biotecnológico implica la transferencia de un vector de expresión o silenciamiento hacia el tejido adulto de la planta sin dañar significativamente este tejido. El método más empleado para transferir vectores de expresión a plantas es la inserción del ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, donde parte del ADN es transferido al genoma de las células de la planta y posteriormente esta empieza a expresar el nuevo gen en sus células.

Aunque la transformación transitoria ahorra el paso de regeneración, las plantas como *P. Americana* siguen siendo recalcitrantes a esta transformación probablemente por los complejos mecanismos de defensa y por la estructura del tejido adulto del aguacate que no permite ser penetrada por los métodos convencionales de infiltración. Por ejemplo, las hojas de aguacate tienen una gruesa cutícula cerosa, alta rigidez y pocos espacios intersticiales entre las células, lo cual dificulta el ingreso del líquido agroinfiltración al interior de la hoja. Así que se debe crear una estrategia para romper tanto una barrera estructural, como una barrera bioquímica y molecular para llegar a generar la expresión de un gen exógeno aguacate.

Incluso, el grupo de investigación “Mecanismos moleculares que controlan la floración” del CIATEJ, ya ha hecho experimentos preliminares y ha encontrado que no es una transformación tan asequible como si lo es para otras plantas como *Nicotiana benthamiana* o *Nicotiana tabacum*, encontrando principalmente bajas o nulas eficiencias de transformación y baja reproducibilidad de resultados. Por tanto, el primer paso para obtener plantas de aguacate genéticamente modificadas es estandarizar y optimizar un método de transformación en donde se pueda evidenciar altas concentraciones de la proteína recombinante y se pueda identificar cuáles son los parámetros clave.

4. Justificación

El aguacate es una especie de alta importancia comercial, cuyo fruto tuvo hasta el 2019 producción mundial de 7.18 millones de toneladas, siendo México el principal productor seguido de República Dominicana, Perú y Colombia con producción total en más de 60 países. Debido a esta importancia, enormes intentos se han realizado para su domesticación por medio de selección artificial o cruza controladas para generación de individuos con diversos fenotipos que combinan elementos de tres principales razas. Dado que el aguacate es una especie de polinización abierta, contiene una alta variabilidad genética y diversidad de germoplasma disponible para ser usado en la generación de nuevos cultivares. Para cualquier cultivo se hace necesario mantener una diversidad genética, pues esto permite reaccionar ante desafíos emergentes, como cambio climático o plagas. A pesar de la amplia variabilidad de *Persea americana*, los cultivares comerciales se reduce principalmente al aguacate Hass (80% de producción total), pues sólo estos cumplen con los criterios de calidad para importación (tamaño, grosor de la cascara, peso, etc). La explotación univarietal del aguacate Hass, puede causar la pérdida de biodiversidad y convertirse en una amenaza para la agroindustria ante la aparición de problemas fitosanitarios o condiciones climáticas adversas. La principal razón por la cual se han desarrollado tan pocos cultivares comerciales es debido a que la obtención de estos requiere más de una década para realizar las cruza, pues el aguacate tarda 3-4 años en generar su primera progenie.

5. Hipótesis

Es posible transformar transitoriamente hojas de *Persea americana* cultivar Hass a través de la agroinfiltración de *Agrobacterium tumefaciens* portando el vector binario de expresión génica 35S:*RUBY* y vector viral pJL-TRBO-GFP y esta transformación induzca cambios fisiológicos observables o cuantificables.

6. Objetivo general

Definir y optimizar una técnica de transformación transitoria en hojas de *Persea americana* c.v Hass a través de la transferencia de un vector de expresión (*35S:RUBY*) por agroinfiltración para permitir potenciales estudios de caracterización funcional y mejoramiento genético.

Objetivos específicos

- Encontrar la cepa de *Agrobacterium* entre LBA4404, AGL1 y GV3101 portando el vector binario *35S:RUBY* que logre la mayor eficiencia de transformación.
- Definir la edad de la hoja óptima que permita mayor eficiencia de transformación.
- Evaluar el efecto de la aplicación de micro-heridas en las hojas en la eficiencia de transformación.
- Evaluar el efecto sobre la eficiencia de transformación al adicionar ácido jasmónico en el medio de infiltración.
- Comprobar la transformación usando el vector viral pJL-TRBO-GFP con los parámetros anteriormente optimizados.
- Definir cuantitativamente a través de espectrofotometría y medición de área coloreada o fluorescente en hojas el mejor tratamiento para transformar hojas de aguacate.

7. Metodología

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* y preparación para infiltración:

En el grupo de investigación “Mecanismos moleculares que controlan la floración” se cuenta con las cepas de *A. tumefaciens*: AGL1, EHA105, LBA4404 o GV3101, de las cuales se escogerá por medio de ensayos (se muestra abajo) la más compatible para transformar aguacate. Los vectores *35S:RUBY* y pJL-TRBO-GFP que ya se encuentran construidos en el laboratorio del grupo de investigación “Mecanismos moleculares que controlan la floración” serán transformados en *Agrobacterium*.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

- Preparación de células electro-competentes de *Agrobacterium*: Incubación en medio líquido MG/L o YEB con antibiótico según el plásmido a 25-28°C durante una noche con agitación. Llevar la concentración de *Agrobacterium* a OD₆₀₀ entre 0.5 y 1.5. Enfriar células en hielo, transferir a tubos de centrifugación a 3000g por 10 min a 4°C y verter sobrenadante. Adicionar a las células glicerol al 10% helado estéril con un volumen equivalente a 1/3 del volumen, del cultivo llevar al vortex para resuspender. Centrifugar de nuevo, verter el sobre nadante y repetir de nuevo el lavado. Resuspender en un volumen de glicerol de 1/100 del volumen de lavado. Empaquetar de nuevo las células y resuspender en 1/10 del último volumen. Almacenar alícuotas de 30 μ L de las células electro-competentes en tubos individuales a -80°C.
- Transformación por electroporación: Ajuste del electroporador a 2.5 kV, 25 μ F capacitancia, 400 Ω resistencia. Ubicar una cubeta de electroporación, un tubo con plásmidos y un tubo con las células electrocompetentes en hielo. Agregar una alícuota de los plásmidos en las bacterias y transferir esta mezcla la cubeta helada de electroporación. Llevar al soporte de cubeta, accionar el pulso eléctrico siguiendo instrucciones del fabricante. Adicionar inmediatamente medio de cultivo, incubar a 25-28°C por 2-4 h con agitación. Luego, seleccionar transformantes en medio sólido durante 48 h en oscuridad y con antibióticos según la cepa; rifampicina (10 μ g/ml) para todas las cepas, carbenicilina (100 μ g/ml) para AGL1, estreptomycin (50 μ g/ml) para LBA4404, gentamicina (30 μ g/ml) para GV3101; y para selección de plásmido, kanamicina (50 μ g/mL) para pJL-TRBO-G, y espectinomicina (50 μ g/mL) para 35S:*RUBY*).
- Tamizaje de la colonia con mejor eficiencia de transformación *in planta*: Se ha encontrado que, aunque todas las colonias que crecen en el medio de selección mencionado anteriormente deben contener el vector de expresión, algunas presentan mayor eficiencia de transformación del tejido vegetal. Por tanto, se realiza un screening inoculando 10 colonias transformadas en tubos de 15 ml con 4 ml de medio

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

líquido siguiendo los pasos de “crecimiento de *Agrobacterium*” mencionados a continuación. Luego de obtener los 10 cultivos con medio de agroinfiltración se procede a infiltrar con jeringa 10 plantas de *Nicotiana benthamiana* como se menciona en la metodología de “Infiltración de hojas” a continuación

- Reserva de células transformadas en glicerol: Se inocula una colonia de las células transformadas en 3 ml de medio LB o YM para LBA4404 suplementado con 20 μM de acetosiringona (AS) y los correspondientes antibióticos, con incubación durante una noche en 250 rpm a 28°C. Luego se toman 900 μL de este cultivo, se mezclan con otros 900 μL del mismo medio fresco en un tubo criogénico de 2ml estéril, luego se congelan con nitrógeno líquido y finalmente se almacenan a -80°C. Las células pueden durar a estas condiciones aproximadamente 6 meses.
- Reactivación de células de stock de glicerol: 3 días antes del evento de transformación del tejido vegetal se debe estriar células provenientes del stock de glicerol en una caja de Petri con medio LB y antibióticos correspondientes. Se debe tomar el inóculo con un asa lo más rápido posible para evitar derretimiento del stock de glicerol sobrante y almacenarlo de nuevo a -80°. Luego incubar a 28°C por 48-72 horas.
- Crecimiento de *Agrobacterium* para transformación: Se toma una asada generosa de *Agrobacterium* reactivada (reactivación del stock de glicerol) y se inocula en 3 ml de medio LB o YM para LBA4404 suplementado con 20 μM de acetosiringona (AS) y los correspondientes antibióticos, con incubación durante una noche en 250 rpm a 28°C, luego se escala a un volumen de 500 ml con las mismas condiciones anteriores. Posteriormente se centrifuga a 5000 rpm y los pellets se resuspenden en medio de agroinfiltración (4 g/l Murashige y Tucker Medium (sales y vitaminas), 4 g/l sacarosa, 20 mM MES, 5 mM MgCl_2 , 150 μM AS, 0.1% v/v Plant Preservative Mixture (PPM), pH 5.3, 150 μM AS) y se incuba por 4h a 28°C a 150 rpm. Terminada esta incubación se ajusta una densidad celular (OD_{600}) de 0.6 con igual medio de infiltración.

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

En la Fig. 13 se muestra un diagrama de proceso con los principales pasos mencionados anteriormente.

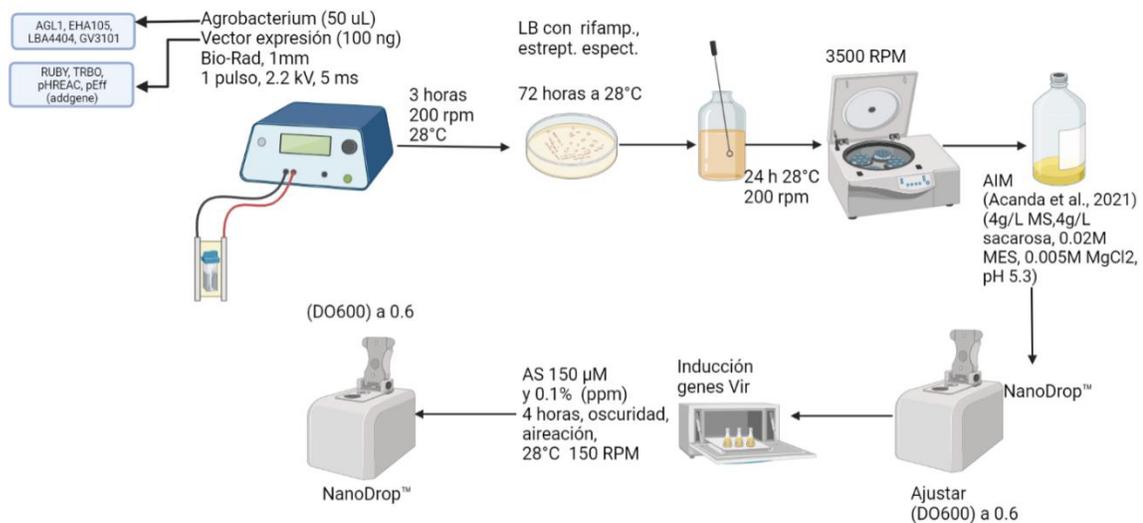


Fig. 13 Diagrama de flujo del proceso general de la preparación de *Agrobacterium* pre-infiltración

Metodología general de infiltración activa de hojas:

- ***N. benthamiana* y *N. tabacum*:** Estas plantas se usan como control y se infiltran con jeringa sin aguja. En cuanto se tenga el medio de agroinfiltración se toma con la jeringa este medio y se presiona suave pero firmemente sobre la hoja por el envés a la cual se le ha hecho un pequeño agujero con aguja, después de 1-2 segundos se debe empezar a notar como el medio se propaga a través de la hoja. Dependiendo de la edad, grosor o rigidez de la hoja el área cubierta puede ser mayor o menor.
- **Aguacate:** Se cortan hojas desde la mitad del peciolo justo cuando ya se tenga listo el medio de infiltración para evitar deterioro de las hojas. Luego se ponen en el recipiente donde está el medio, dependiendo del volumen y cantidad de hojas puede ser un tubo de 50ml o frasco de 200 ml. Posteriormente se llevan a un desecador conectado a una bomba de vacío para realizar la infiltración a través de la succión del

BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

aire de los espacios intersticiales de la hoja y el posterior ingreso de líquido de infiltración cuando se reestablece la presión. Cada frasco con hojas de aguacate siempre debe ir acompañado de al menos una hoja de *N. benthamiana* y *N. tabacum* cómo control positivo. En la Fig. 14 se muestra un diagrama de proceso de los pasos para infiltrar hojas de aguacate.



Fig. 14 Proceso general de la infiltración de hojas de aguacate

Posterior a la infiltración se almacenan las hojas o plantas en condiciones de humedad y oscuridad en charolas selladas y cubiertas con una bolsa negra. Al 3 DPI se retira la bolsa negra y para las plantas se retira la tapa de la charola. Las hojas separadas deben seguir en condiciones de humedad para evitar que se sequen y deterioren pues al estar separadas son más sensibles a la falta de humedad, incluso se debe monitorear todos los días la presencia de humedad y si es necesario agregar agua con un atomizador sobre la cama donde están reposadas las hojas.

En las plantas control de *Nicotiana* se empieza a observar la expresión a partir de 3-4 DPI. Mientras que en aguacate puede variar entre 5-10 DPI, lo cual puede depender de varios

factores como edad de la hoja, densidad óptica, cantidad de líquido infiltrado o recalcitrancia de la hoja.

Transformación de aguacate por *Agrobacterium*

Para transformar el aguacate con *Agrobacterium*, primero se deben optimizar los parámetros de co-cultivo ya que esta es la primera vez que se desarrolla una metodología para transformar transitoriamente hojas de aguacate. Por tanto, se propone la optimización de estos parámetros sobre hojas individuales de aguacate y permitir posteriormente la transformación de la planta:

Optimización de parámetros de co-cultivo para transformación de aguacate:

1. Determinación de cepa de *Agrobacterium* más virulenta en aguacate:

Se realizan agro-infiltraciones de hojas jóvenes de aguacate c.v. Hass con las 3 cepas (AGL1, LBA4404 o GV3101) portando el vector *35S:RUBY*, usando 5 hojas por cada cepa. Estas hojas se sumergen en el medio de cultivo con las cepas correspondientes (Fig. 15), luego se llevan a cámara de vacío para aplicación de 3 vacíos (0.07 MPa) por 5 minutos cada uno con intervalo de 1 min de descanso (a presión atmosférica). En cada descanso se debe liberar la presión lentamente para volver a aplicar el siguiente vacío. A la mitad de estas hojas se les causa adicionalmente micro-heridas con un rodillo de micro-agujas (microneedle roller). Luego se incuban bajo condiciones de humedad, 25°C y oscuridad en los primeros dos días. La evaluación de *RUBY* se realiza después del 7 DPI cuando la acumulación de betalaínas se hace visualmente evidente.

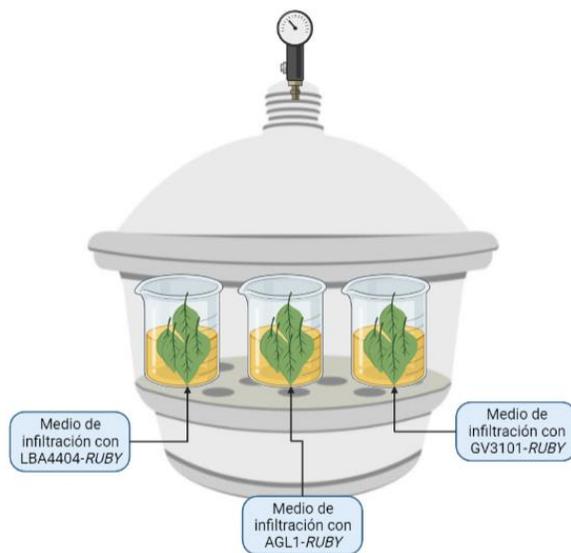


Fig. 15 Infiltración de los 3 tratamientos para determinación de cepa más virulenta

2. Evaluación del efecto de la edad de la hoja, pretratamiento con micro-heridas y AJ:

Para encontrar si la edad de la hoja es un factor importante en la transformación, se realizaron agroinfiltraciones con la cepa más virulenta usando 5 hojas para 5 estadios diferentes de hoja. Estos estadios se definieron con los parámetros de tamaño, grosor, textura y coloración. El estadio A corresponde a las hojas pequeñas recién emergidas, de coloración roja-café, delgadas pero rígidas. El estadio B son un poco más grandes, un poco menos rígidas, misma coloración. El estadio C corresponde a hojas más grandes (>5cm) con una coloración de transición entre café y verde, totalmente expandidas, sin rigidez y delgadas. El estadio D corresponde a hojas totalmente verdes de igual o mayor tamaño que C, un poco más gruesas o resistentes que C y con enervaduras verde brillante. El estadio E, corresponde a hojas verde oscuro de mayor grosor que D, las enervaduras tienen una coloración verde-amarilla y más

opaca que en D. En la Fig. 16 se puede observar los distintos estadios descritos anteriormente.

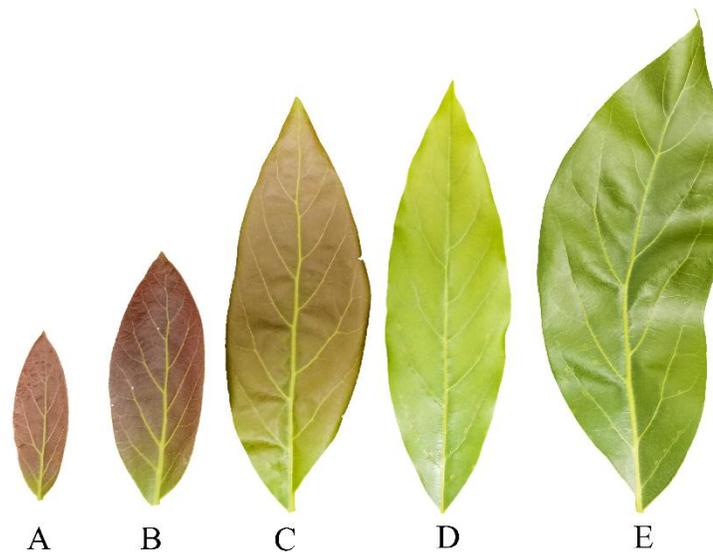


Fig. 16 Diferentes etapas de desarrollo de las hojas de aguacate evaluados en los experimentos

Para encontrar si la generación de micro-heridas permiten infiltrar mayor volumen de medio al interior de la hoja o incrementan eficiencia de transformación con *Agrobacterium* por producción de compuestos fenólicos, se realiza agroinfiltración a hojas con y sin micro-heridas. También para encontrar si la presencia de AJ como pretratamiento en el medio de infiltración incrementa la eficiencia de transformación, se adiciona este componente justo antes de iniciar la infiltración por vacío.

Con la cepa identificada anteriormente, se realizan infiltraciones donde se adiciona o no AJ al 250 μ M al medio de infiltración y con aplicación o no de micro heridas en las hojas. Se utilizan 5 hojas por cada tratamiento. En las Fig. 10 y Fig. 14 se muestran imágenes del proceso de pretratamiento con micro agujas. En la Fig. 20 se muestran

imágenes del proceso de pretratamiento con micro agujas y en la siguiente figura se ilustra el proceso general de este tratamiento en específico.

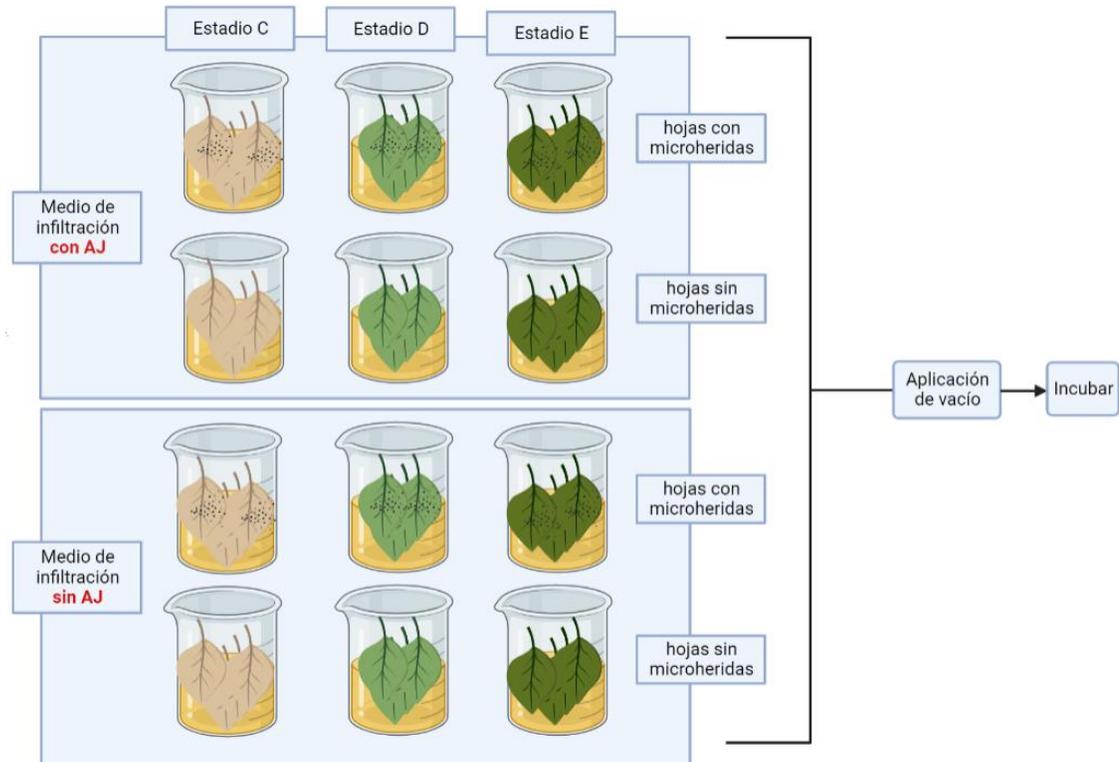


Fig. 17 Proceso a seguir en el experimento de diferentes estadios de hoja, con o sin micro-heridas y con o sin AJ

3. Optimización de condiciones de vacío y densidad óptica:

Para encontrar la condición de vacío y densidad óptica del medio de infiltración óptimas para la eficiencia de transformación, se realizaron agro-infiltraciones sobre hojas del estadio de aguacate identificado anteriormente (Fig. 16) y conservando los demás parámetros identificados (cepa, +AJ, -AJ, +heridas, -heridas). En este experimento se probaron tres intensidades de vacío diferentes (0.02, 0.04, and 0.07 Mpa), número de aplicaciones de vacío (1, 2, o 3 aplicaciones de 5 minutos cada una) y tres concentraciones de *Agrobacterium* OD₆₀₀ 0.3, 0.6, 1.0, usando 3 hojas para cada tratamiento. La evaluación de *RUBY* se realiza después del 7 DPI cuando la

acumulación de betalainas se hace visualmente evidente. En la siguiente Fig. 21 se muestra el proceso a seguir en este experimento.

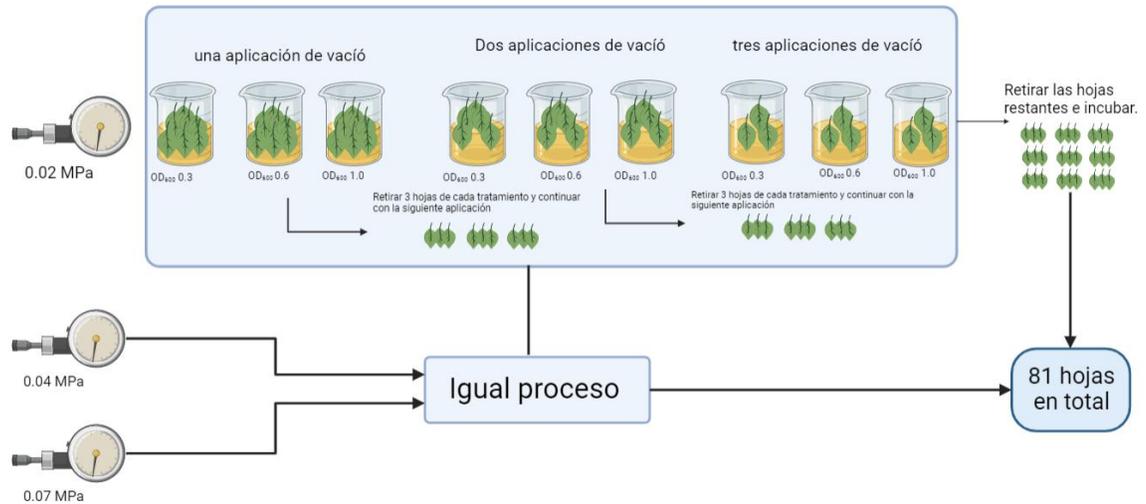


Fig. 18 Proceso llevado en el experimento donde se probó 3 diferentes presiones de vacío (0.02, 0.04, y 0.07 MPa), 3 diferentes concentraciones de *Agrobacterium* (OD600 0.3, 0.6, 1.0) y con 1, 2 o 3 aplicaciones de vacío

4. Evaluación del efecto de surfactantes en el medio de infiltración:

Para evaluar la posibilidad de aumentar el volumen infiltrado en la hoja a través del uso de surfactantes, se realizan agro-infiltraciones de hojas jóvenes de aguacate adicionando surfactantes (Triton X-100 y Tween-20) al 0.02% en medio de infiltración (Fig. 19). Según ensayos preliminares se encontró que a una concentración mayor de 0.02% las hojas mostraban daño, necrosis u oxidación y no resistían el tiempo necesario para expresar la ruta de betalainas. Se aplicó un tratamiento para cada surfactante y un tratamiento sin surfactantes, 5 hojas en cada tratamiento y conservando los parámetros anteriormente optimizados de cepa, estadio de hoja, AJ, micro heridas, # de vacíos, presión de vacío y densidad óptica.

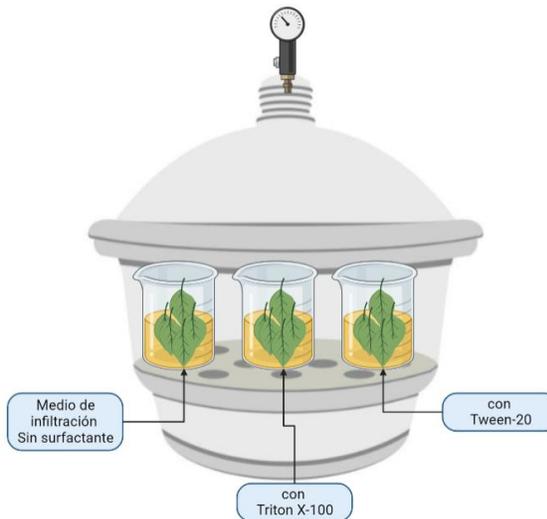


Fig. 19 Infiltración de los tratamientos con surfactantes y sin surfactante.

5. Efecto de co-cultivo prolongado (16h o 24 horas) sin vacío:

Para evaluar la eficiencia de transformación ante una infiltración pasiva (sin vacío) donde solo se inmergen las hojas por un periodo prolongado, se procedió a sumergir las hojas por un 30 min, 16 horas o 24 horas, usando 5 hojas por tratamiento. La infiltración se realizó conservando los demás parámetros optimizados anteriormente (cepa, estadio de hoja, AJ, micro-heridas, concentración de *Agrobacterium*). Pasado los tiempos de inmersión se continuó con los mismos pasos de incubación de hojas en oscuridad 2 días seguido fotoperiodo 16 h luz hasta el 7 DPI, cuando se observa expresión.

6. Evaluación de la infiltración con dos cepas en el medio:

Para encontrar si la expresión del vector pBBRacdSgabT evita la necrosis y ejerce algún efecto positivo sobre la transformación transitoria en hojas de aguacate, se realizan agro-infiltraciones en un medio de infiltración que contiene tanto cepa óptima-*RUBY* como AG1- pBBRacdSgabT y como control se usa un medio con solo la cepa óptima (Fig. 20). Se usaron 5 hojas para cada tratamiento y se conservan los parámetros de cepa, estadio de hoja, AJ y micro-heridas. Se buscó que cada cepa por separado cumpla con la OD óptima de *Agrobacterium* para la transformación, es decir, el tratamiento con dos cepas tuvo en total el doble de concentración de *Agrobacterium* pues tenía 2 tipos de cepa.

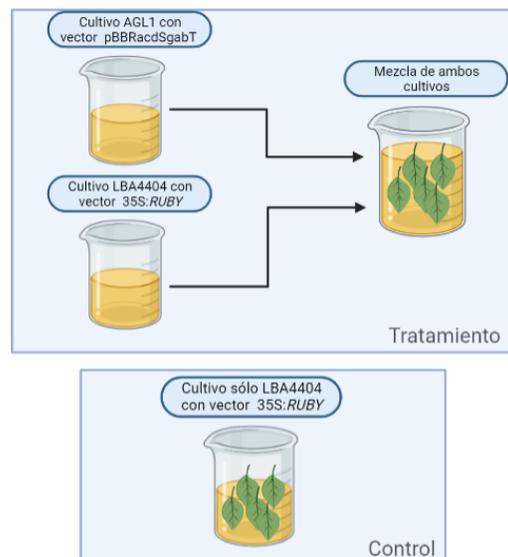


Fig. 20 Proceso llevado a cabo para realizar el experimento de co-cultivo con AGL-pBBRacdSgabT

7. Confirmación de la transformación con el constructo pJL-TRBO

Para confirmar que la transformación en hojas de aguacate es posible con otros sistemas reporteros, se realizó infiltración de 5 hojas de aguacate con el vector pJL-TRBO y conservando los parámetros anteriormente optimizados (cepa, estadio de

hoja D, AJ, micro-heridas, OD₆₀₀ *Agrobacterium*, vacío) y se usó como control negativo hojas sin infiltrar. Después de 7 DPI fragmentos de estas hojas (Aprox. 0.5 cm²) fueron observados a 10X en el microscopio confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL) usando un láser de excitación a 488 nm y filtro de emisión específico tanto para clorofila (675-725 nm) cómo para GFP (500-530 nm). Las fotos fueron tomadas y gestionadas con el software LAS X® (Leica Microsystems).

Detección de *RUBY*

1. *Espectrofotometría*

Las hojas agroinfiltradas al 7 DPI se congelaron en nitrógeno líquido y se maceraron con un mortero y pistilo. Se realizó extracción de betalaínas a partir de 100 mg de recuperó tejido molido y se resuspendió en 300 µl de metanol al 50%, 1mM ácido ascórbico, ácido fórmico al 0.5% (Grützner et al., 2021). Estas muestras se agitaron en vortex previo a incubación en hielo de 15 min, luego se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo. La detección de betalaínas se midió por absorbancia a 535 nm (Polturak & Aharoni, 2018), usando en lector de microplacas Infinite 200 PRO (TECAN).

2. *Determinación de área transformada por Photoshop*

Las hojas fueron fotografiadas al 7 DPI previo a la congelación para extracción y se determinó la eficiencia de la expresión de *RUBY* en términos de porcentaje de área coloreada comparado con el total del área de la hoja. Estos parámetros son medidos en el software Adobe Photoshop Adobe Inc. (2019) con las herramientas de “selección difusa” y “análisis de áreas”. En la sección de ANEXOS se describe a detalle el proceso realizado para obtener las áreas a través de Photoshop.

Análisis estadístico de resultados

Los datos obtenidos de la absorbancia de betalaína y de las áreas determinadas por Photoshop se analizaron realizando una prueba ANOVA unifactorial usando el Software Statgraphics. 5 tratamientos y 5 hojas por cada uno.

ANOVA Simple – Absorbancia de extractos de betalaínas por Tratamientos

Número de observaciones: 24

Número de niveles: 5

Se realizó un análisis de varianza de un factor para Absorbancia. Construyendo varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de Absorbancia para los 5 diferentes niveles de Tratamientos. La prueba-F en la tabla ANOVA determina si hay diferencias significativas entre las medias. Las Pruebas de Rangos Múltiples indicaron cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Las diferentes gráficas ayudaron a juzgar la significancia práctica de los resultados.

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0

ANOVA Simple - Área transformada por Tratamientos

Número de observaciones: 19

Número de niveles: 4

Se realizó un análisis de varianza de un factor para el área de hoja transformada. El procedimiento es el mismo descrito anteriormente para Absorbancia de betalaínas.

9. Resultados

Observación de presencia de betalaínas en hojas de aguacate ante varios tratamientos.

Efecto de la cepa

Como LBA4404, GV3101 y AGL1 corresponden a 3 de las cepas de *Agrobacterium* más comúnmente usadas en laboratorios y además han sido usadas previamente en tejido *in vitro* de aguacate, en este estudio se probaron para transformación de 5 hojas de aguacate por cada cepa. Bajo igual tratamiento con 250uM AJ, micro-heridas y 3 vacíos de 0.07 MPa. Luego de la incubación por 7 días en una charola semihúmeda con los primeros 2 días en oscuridad, se observó en algunas hojas la expresión del constructo 35S:*RUBY* como una coloración de tonalidad roja alrededor de los hoyos hechos por el rodillo de micro-agujas. En la Fig. 21 se puede apreciar una hoja representativa de cada tratamiento donde se observa una diferencia evidente de la cepa LBA4404 con GV3101 y AGL1. Se observó muy pocos puntos color rojo pálido en tratamiento con GV3101, con AGL1 no fue visible ningún punto, mientras con LBA4404 la presencia de betalaínas fue abundante y visiblemente superior a las otras dos cepas, aunque irregular en cada hoja ya que no todas las hojas tenían la misma característica de grosor, edad o textura. El laboratorio cuenta también con la cepa EHA105; sin embargo, no pudo ser ensayada ya que esta presenta resistencia al antibiótico espectinomicina, el cual es el marcador de resistencia del vector 35S:*RUBY*.

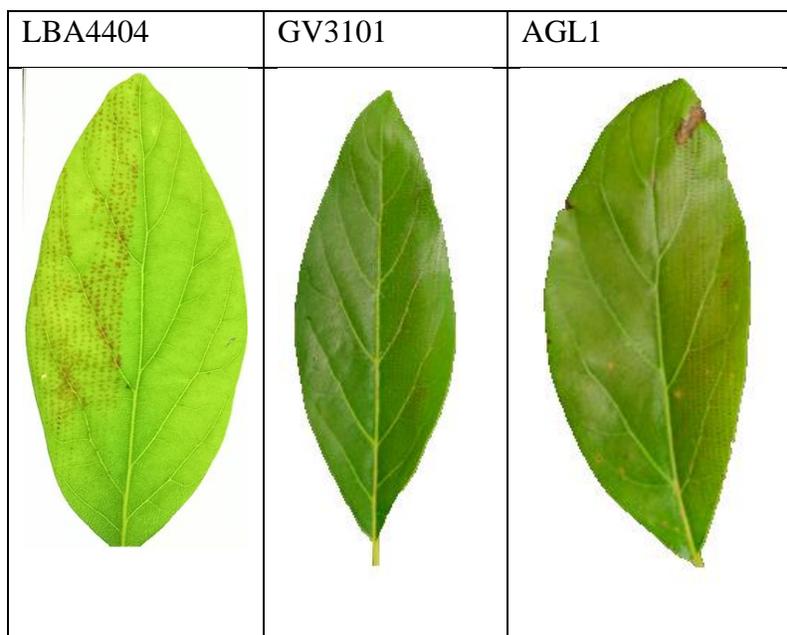


Fig. 21 Hojas de aguacate infiltradas con cepas de *Agrobacterium* LBA4404, GV3101, y AGL1

En este experimento y los siguientes, la observación de la coloración roja en las hojas por la presencia de betalaínas estuvo de forma constante hasta que la hoja se marchitó, más de 15 DPI dependiendo del estado de la hoja (datos no mostrados).

Efecto del estadio de la hoja, AJ y micro-heridas:

Usando la cepa LBA4404-*RUBY* anteriormente identificada, se realizó una infiltración con hojas de los estadios C, D y E (Fig. 16). Previamente se probó infiltrar hojas de estadio A y B pero estas no sobrevivieron más de 1DPI, así que se excluyeron de este experimento. También se probó el efecto de aplicación de 250uM AJ en el medio de infiltración y la generación de micro-heridas justo antes de la agroinfiltración, usando 5 hojas por cada tratamiento. En la (Fig. 22) se puede apreciar una hoja infiltrada representativa de cada tratamiento a los 7 DPI. Para esta transformación si se observó expresión contundente del vector 35S:*RUBYRUBY* en varios tratamientos, donde se observa que en la mayoría de las hojas del estadio E (adultas) no hubo presencia de puntos con betalaínas, solo 2 hojas tuvieron pocos puntos pálidos que no se pudieron capturar en las fotos. En tratamientos con estadios C y D se observó presencia de betalaínas en diferente medida según cada tratamiento, pues en todas las hojas de estadios C y D con micro-heridas hubo múltiples puntos con betalaínas mientras en las hojas sin micro-heridas con o sin AJ los puntos fueron escasos. Aunque en todas las hojas de estadios C y D con micro-heridas, hubo expresión de 35S:*RUBY*, se pudo observar diferencia en la expresión entre tratamientos +AJ y -AJ, pues en las hojas con AJ se evidenció mayor área y tono de coloración. La expresión en hojas de estadio C sufrieron más daño por ser más delgadas o débiles ya que son un poco más jóvenes que D, además la expresión fue levemente menor a las del D. Por tanto, se escoge las hojas de estadio D para continuar con siguientes experimentos.

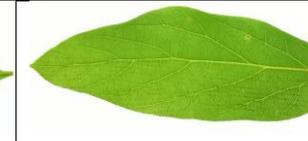
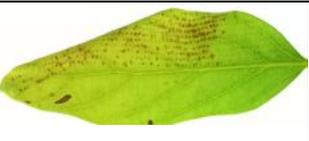
		Estadios de hoja		
		C	D	E
Sin micro- herida	+ AJ			
	- AJ			
Con micro- herida	+ AJ			
	- AJ			

Fig. 22 Hojas de estadio C, D, E ante tratamientos con micro heridas y ácido jasmónico

Efecto de la concentración de *Agrobacterium*:

Se ensayó las concentraciones de *Agrobacterium* OD₆₀₀ a 0.3, 0.6 y 1.0 en el medio de infiltración con cultivo de LBA4404, 250µM de AJ y pretratamiento de micro-heridas sobre 3 hojas de estadio D por cada tratamiento. Se evaluó la presencia de betalainas a los 7 DPI en todos los tratamientos y se encontró que a las tres densidades ópticas hubo expresión del constructo 35S:*RUBY*. Sin embargo, el tratamiento con DO de 1.0 presentó pocas áreas con manchas claras, mientras DO de 0.3 y 0.6 obtuvieron una presencia más evidente de betalainas. En las hojas del tratamiento 0.6 se observó una tonalidad más oscura y con mayor cantidad de puntos transformados en comparación con la concentración de *Agrobacterium* a OD 0.3 que presenta una tonalidad roja más clara. En la Fig. 23 se puede apreciar una hoja representativa de cada tratamiento.

OD ₆₀₀ = 0.3	OD ₆₀₀ = 0.6	OD ₆₀₀ = 1.0
		

Fig. 23 Hojas de estadio D ante tratamientos con diferentes densidades ópticas de *Agrobacterium* en el medio de infiltración

Efecto de diferentes presiones de vacío y número de repeticiones:

Para encontrar cual es la presión de vacío adecuada para infiltrar hojas de aguacate sin que haya daño mecánico, se probó tres diferentes presiones de vacío (0.02, 0.04 y 0.06 MPa) y se ensayó una, dos o tres aplicaciones de vacío consecutivas con descanso de 1 min. En total se usó 3 hojas por cada tratamiento empleando los parámetros anteriormente identificados; estadio de hoja D, cepa LBA4404, aplicación de micro-agujas, *Agrobacterium* a OD₆₀₀ 0.6 y 250µM AJ en medio de infiltración. En la Fig. 24 se aprecia una hoja representativa de los 9 tratamientos. Para tratamientos con presión de vacío de 0.02MPa se observó muy poca o nula expresión, solo con la tercera repetición de vacío hubo más puntos de coloración. Para presión de vacío de 0.04 MPa se observó expresión en los 3 tratamientos (1 a 3 aplicaciones de vacío); sin embargo, con dos y tres aplicaciones de vacío fue más contundente que con 1 aplicación. Para tratamientos con presión de 0.06 MPa se observó mayor expresión de 35S:*RUBY* con respecto al tratamiento de 0.04MPa; sin embargo, se evidenció que con 2 y 3 aplicaciones de vacío a 0.06 MPa resultaron con mayor expresión a comparación de una aplicación de vacío. En resumen, se observó se necesitan presiones de vacío de 0.04 MPa o más para que ocurra transformación en todas las hojas, siendo la presión de vacío óptima es 0.07 MPa y se necesitan 2 o más aplicaciones de vacío sin diferencia aparente entre estos números de aplicaciones. Para siguientes ensayos se usará el tratamiento de 0.07 MPa y 3 vacíos pues a estas condiciones no se observó mayor daño en las hojas comparado con los demás tratamientos.

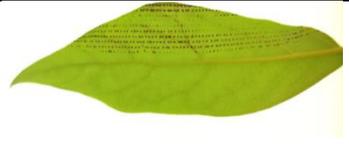
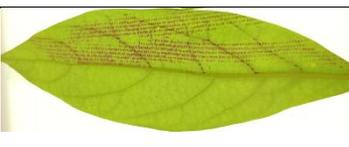
	1 vacío	2 vacíos	3 vacíos
0.02 MPa			
0.04 MPa			
0.06 MPa			

Fig. 24 Hojas de estadio D, con aplicación de micro-herida, AJ ante diferentes tratamientos de vacío (1 a 3 vacíos y 0.02, 0.04, 0.07 MPa)

Efecto de surfactantes

Para potencializar la capacidad de infiltración, se ensayó los surfactantes Triton X-100 y Tween-20 al 0.002% en el medio de infiltración conservando las demás condiciones fijas (cepa LBA4404, estadio de hoja D, 250uM AJ, micro-heridas, DO 0.6 y 3 vacíos de 0.07MPa,) usando 5 hojas por cada tratamiento en total. En este experimento escasearon las hojas D, sin embargo, se usó un tipo de hoja intermedia entre D y E, la cual se sigue viendo joven pero es un poco más gruesa que el estadio D. Por esta razón el control positivo (sin surfactante) resultó con baja expresión en comparación de los ensayos anteriores. En la Fig. 25 se apreciar una hoja representativa de cada tratamiento, donde se observa que el tratamiento con Tween – 20 no ejerció ninguna diferencia significativa con respecto a la expresión del control. El tratamiento con Triton X-100 evidenció una expresión significativamente mayor al control y al tratamiento con Tween-20. Sin embargo, en los tratamientos con surfactante hubo necrosis u oxidación en algunas de las hojas, lo cual no se observó en hojas del control.

	(sin surfactante)	0.002% Triton X-100	0.002% Tween-20
Con Vacío			

Fig. 25 Hojas de estadio D ante tratamientos con surfactantes Triton X-100 y Tween-20

Efecto de infiltración sin vacío e incubación prolongada:

Para ensayar si es posible la transformación sin aplicación de vacío y así evitar daños en la hoja y disminuir recursos, se ensayó tratamientos sin vacío con inmersión en el medio de cultivo por 30 min, 16 horas y 24

horas con agitación constante a 28°C, conservando los demás parámetros fijos (cepa LBA4404, estadio de hoja D, 250uM AJ, micro-heridas, DO 0.6 y 3 vacíos de 0.07MPa) usando 5 hojas por cada tratamiento. En la Fig. 26 se observa una foto representativa de cada tratamiento. Para el tratamiento de inmersión por 30 minutos no se observó expresión después de 7 DPI y no se observó ninguna clase de daño en la hoja. Para los tratamientos de 16 y 24 horas, las hojas presentaron total oxidación después de un DPI, es decir no sobrevivieron el tiempo mínimo para expresión de 35S:*RUBY*.

Diferentes tiempos de inmersión en medio de infiltración		
30 min	16 horas	24 horas
		
(7 DPI)	(1 DPI)	(1 DPI)

Fig. 26 Hojas de estadio D ante diferentes tiempo de inmersión en medio de infiltración sin aplicación de vacío.

Efecto de infiltración con dos cepas:

Se realizó co-infiltración de LBA4404-35S:*RUBY* y AGL1- pBBRacdSgabT , para encontrar si la expresión del vector pBBRacdSgabT evita la necrosis y ejerce algún efecto positivo sobre la transformación transitoria. Se ensayó dos tratamientos (+pBBRacdSgabT y - pBBRacdSgabT) usando 4 hojas por cada tratamiento conservando los parámetros optimizados anteriormente (cepa LBA4404, estadio de hoja D, 250uM AJ, micro-heridas, DO 0.6 y 3 vacíos de 0.07MPa) y usando 5 hojas por cada tratamiento. En la Fig. 27 se puede observar una foto representativa ambos tratamientos. Después de 7 DPI se evaluó presencia de

betalaínas y el daño en las hojas. En el tratamiento donde se infiltró AGL1- pBBRacdSgabT y LBA4404 se observó necrosis en algunas hojas, al igual que se observó en algunas del tratamiento con solo infiltración de LBA4404 portando el vector 35S:*RUBY*. Tampoco hubo diferencia significativa en cuanto al nivel de expresión entre ambos tratamientos.

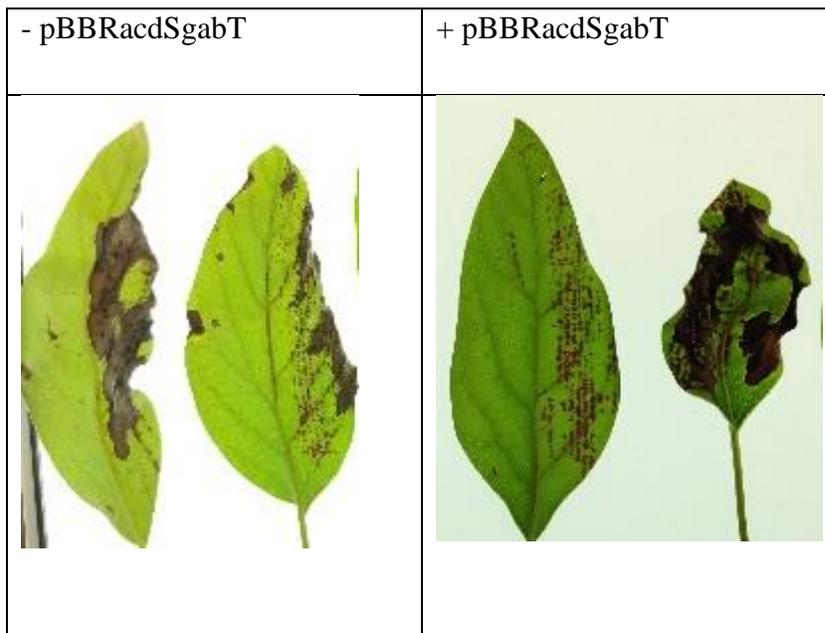


Fig. 27 Hojas estadio D co-infiltradas con AGL1-pBBRacdSgabT y LBA4404 o infiltradas sólo con LBA4404

Comparación de dos medios de infiltración diferentes:

Para evaluar si hay alguna diferencia en la expresión ante diferentes medios de infiltración y así encontrar el medio óptimo con menos consumo de recursos, se comparó el medio (medio #1) anteriormente utilizado en todos los experimentos (Acanda, Welker, Orbović, & Levy, 2021) con el medio (medio #2) empleado en por el autor (Oa & Lindbo, 2007). Para ambos tratamientos se usaron 3 hojas continuando con los parámetros anteriormente optimizados (cepa LBA4404, estadio de hoja D, 250uM AJ, micro-heridas, DO 0.6 y 3 vacíos de 0.07MPa). En la Fig. 28 se muestra una foto representativa de ambos tratamientos. Se observó después de 7 DPI la expresión del vector *RUBY* y tanto el tratamiento con medio #1 cómo con medio #2 tuvieron presencia de betalaínas y no se pudo determinar una diferencia en el nivel de expresión entre ambos tratamientos.

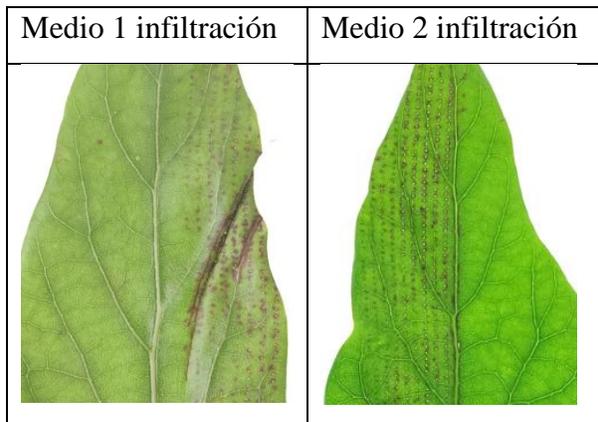


Fig. 28 Hojas de estadio D infiltradas con dos tipos de medio de infiltración

Resumen de resultados de Agroinfiltración de hojas sueltas de aguacate con diferentes tratamientos:

Se realizó infiltraciones con *Agrobacterium* (GV3101, LBA4404 y AGL1) portando el vector 35S:*RUBY*. La cepa EHA105 no fue posible usarla pues es resistente a espectinomicina, el marcador de resistencia del vector *RUBY*. En cada infiltración se probó diferentes tratamientos cómo presencia o no de AJ, heridas con micro agujas, varios estadios de la hoja, presencia de surfactantes (Triton X-100, Tween 20), aplicación de vacío, con sin pBBRacdSgabT, tiempo de infiltración (16h o 24 horas), diferentes presiones de vacío, número de repeticiones de vacío, diferentes densidades ópticas (OD). A continuación, en **Tabla 2** se muestra un resumen de cada uno de los resultados detallados anteriormente.

Tabla 2 Resultados resumidos del efecto de cada tratamiento en la transformación de hojas de aguacate

Cepa	LBA4404	Transformación contundente
	GV3101	No transformó
	AGL1	No transformó
Estadio (etapa de Desarrollo de hojas)	C	Poca transformación
	D	Transformación contundente
	E	No transformó
Ácido jasmónico	+ AJ	Transformación contundente
	-AJ	No transformó
Micro-heridas	+M.H	Transformación contundente
	-M.H	No transformó
Densidad óptica	0.3	Poca transformación
	0.6	Transformación contundente
	1	Poca transformación
Surfactantes	-Surfactante	Poca transformación
	Triton X-100	Transformación contundente
	Tween-20	Muy poca transformación
Incubación prolongada	30 min	No transformó
	16 horas	No transformó
	24 horas	No transformó
Co-infiltración con AGL1- pBBRacdSgabT	- pBBRacdSgabT + pBBRacdSgabT	No efecto significativo entre ambos tratamientos
Medio de infiltración	Lindbo Acanda	No diferencia significativo entre ambos tratamientos

Confirmación de la transformación con vector pJL-TRBO-G

Para confirmar que la transformación en hojas de aguacate es posible con otros sistemas reporteros, se realizó infiltración de 5 hojas de aguacate con el vector pJL-TRBO y conservando los parámetros anteriormente

optimizados (cepa LBA4404, estadio de hoja D, 250uM AJ, micro-heridas, concentración de *Agrobacterium* DO 0.6 y 3 vacíos de 0.07MPa) y se usó como control negativo hojas sin infiltrar. Después de 7 DPI fragmentos de estas hojas fueron observados en el microscopio confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL) usando un láser de excitación 488 nm y filtro de emisión específico tanto para clorofila (675-725 nm) cómo para GFP (500-530 nm) y luego ambas imágenes se superpusieron (Fig. 29). Se pudo observar que las hojas infiltradas emitieron fluorescencia en el espectro de emisión de GFP, superior a lo observado en hojas no infiltradas (-Ctrl) en este espectro. En ambas hojas se observó la auto-florescencia de la clorofila y al superponer esta imagen con la de emisión de GFP, se evidenció que la florescencia observada a 500-530 nm no es un efecto de la auto florescencia presente en las hojas por parte de la clorofila.

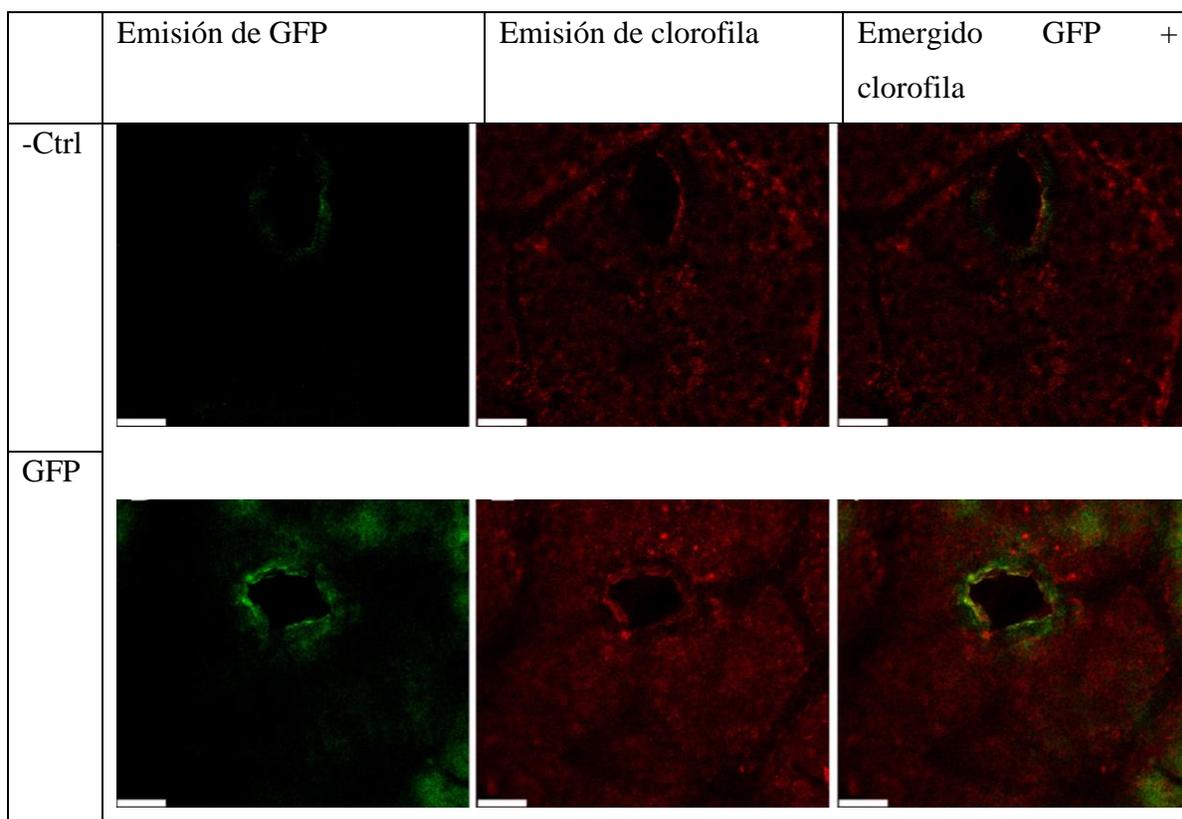


Fig. 29 Observación den microscopio confocal de hojas de aguacate transformadas con pJL-TRBO-G vs Hojas sin transformar (-Ctrl). Cada columna corresponde a la observación ante: 1) longitudes de onda específicas para GFP, 2) Longitudes de onda específicas para clorofila

Detección de *RUBY*

Detección de betalainas por espectrofotometría:

Para confirmar la presencia de betalainas en las hojas, se realizó una extracción de las hojas empleadas en el experimento #2 (Fig. 22). Después del 7DPI se procedió congelar las hojas seguido de la maceración del tejido congelado y extracción de betalainas. Luego estos extractos fueron analizados por espectrofotometría para medir absorbancia a la longitud de onda 535 nm, específica para betalainas (Fig. 30). Como se puede observar, los tratamientos -AJ Edad 3 y -AJ Edad 4 tuvieron valores de absorbancia de 1.15 muy cercanos al control negativo (1.12) que corresponde a hojas sin transformar, lo cual es bastante congruente con las fotos de la Fig. 22 que muestran que las hojas sin AJ tienen muy pocos puntos de expresión. Los tratamientos +AJ Edad 3 y +AJ Edad 4 tuvieron en promedio valores de absorbancia 0.34 y 0.47 respectivamente, los cuales superaron los valores de los tratamientos sin AJ en casi 4 veces.

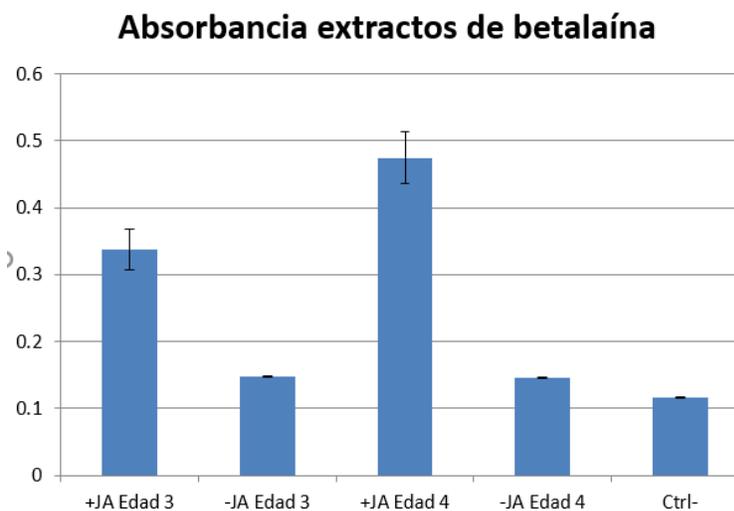


Fig. 30 Absorbancia a 535 nm de extractos de betalaina de hojas transformadas con tratamientos de Edad C y D con presencia de AJ y sin AJ en el medio de infiltración.

Determinación de área transformada por Photoshop:

Para confirmar los valores de absorbancia de extractos de betalainas, se midieron las áreas (en pixeles) transformadas de cada mitad de hoja del experimento #2 (Fig. 31), a través del programa Photoshop como se indica en ANEXOS y se obtuvo un porcentaje de transformación con respecto a el área de esa mitad de hoja. En la Tabla 4 se muestran las áreas obtenidas de cada hoja y el promedio de área de cada tratamiento, donde se puede observar que los tratamientos con AJ y micro-heridas de estadio C y D tuvieron valores de 18% y

27% significativamente mayores los tratamientos sin AJ, con micro-heridas de ambos estadios (7%). Se puede observar que el tratamiento con hojas de estadio D, +AJ obtiene el mayor porcentaje de áreas transformadas.

Tabla 3 Porcentajes de área transformada con respecto al área comprendido por la mitad de la hoja (todos con micro-heridas) en tratamientos +AJ-Estadio C y -AJ Estadio-C, +AJ-Estadio D y -AJ Estadio-D.

	+AJ Edad C	-AJ Edad C	+AJ Edad D	-AJ Edad D
	% Transform	% Transform	% Transform	% Transform
h1	11.204	9.822	26.996	10.057
h2	15.423	1.354	30.120	4.510
h3	14.390	10.567	21.662	0.401
h4	21.700	2.875	30.180	6.522
h5	27.837	9.320	N/A	13.578
promedio %	18.111	6.788	27.239	7.014

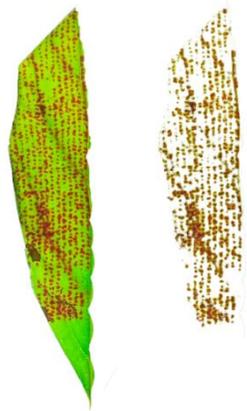


Fig. 31 Área transformada extraída de una hoja del tratamiento +AJ estadio D por medio del software Adobe Photoshop

Análisis estadístico

ANOVA Simple – Absorbancia de extractos de betalaínas por Tratamientos

La tabla ANOVA descompone la varianza de Absorbancia de betalaínas en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 8.09254, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos (Tabla 3 y Fig. 33). Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Absorbancia entre un nivel de Tratamientos y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. A continuación, se determinan cuáles medias son

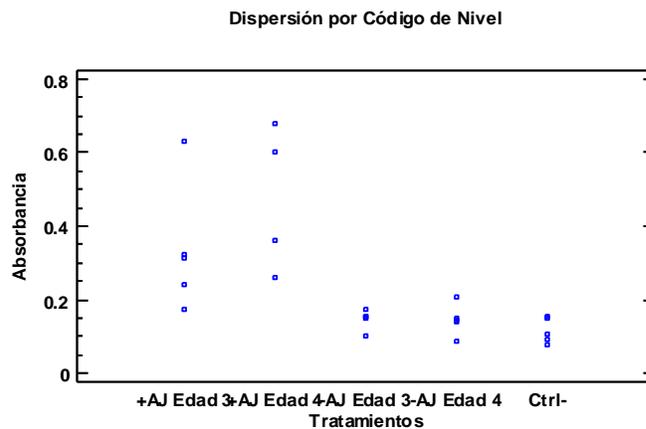


Fig. 32 gráfico de dispersión Absorbancia vs tratamientos

significativamente diferentes de otras a través de la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 4 Tabla ANOVA para Absorbancia por Tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.429494	4	0.107373	8.09	0.0006
Intra grupos	0.252096	19	0.0132682		
Total (Corr.)	0.681589	23			

Pruebas de Múltiple Rangos para Absorbancia de betalaínas por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

El asterisco que se encuentra al lado de los 6 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. Se han identificado 2 grupos

homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. Por tanto, se encuentra que el tratamiento con AJ y edades 3 y 4 presentan presencia de betaínas significativamente mayor a los demás tratamientos.

Tabla 5 Tratamientos con diferencias estadísticas

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
+AJ Edad 3 - +AJ Edad 4		-0.13744	0.161729
+AJ Edad 3 - -AJ Edad 3	*	0.18962	0.152479
+AJ Edad 3 - -AJ Edad 4	*	0.19126	0.152479
+AJ Edad 3 - Ctrl-	*	0.22026	0.152479
+AJ Edad 4 - -AJ Edad 3	*	0.32706	0.161729
+AJ Edad 4 - -AJ Edad 4	*	0.3287	0.161729
+AJ Edad 4 - Ctrl-	*	0.3577	0.161729
-AJ Edad 3 - -AJ Edad 4		0.00164	0.152479
-AJ Edad 3 - Ctrl-		0.03064	0.152479
-AJ Edad 4 - Ctrl-		0.029	0.152479

Tabla 6 grupos homogéneos de tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ctrl-	5	0.117	X
-AJ Edad 4	5	0.146	X
-AJ Edad 3	5	0.14764	X
+AJ Edad 3	5	0.33726	X
+AJ Edad 4	4	0.4747	X

*indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple - Área transformada por Tratamientos

La razón-F, que en este caso es igual a 16.0501, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05 (Tabla 4 y Fig. 33), existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Área transformada entre un nivel de Tratamientos y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

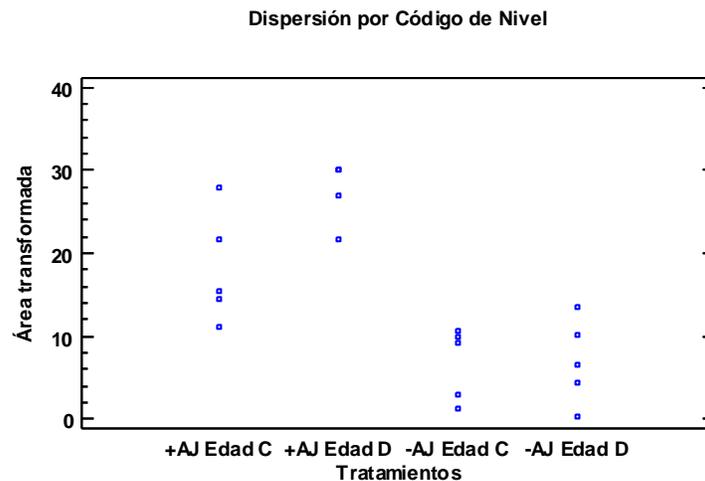


Fig. 33 Dispersión de area transformada vs tratamientos

Tabla 7 Tabla ANOVA para Área transformada por Tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1289.44	3	429.813	16.05	0.0001
Intra grupos	401.692	15	26.7795		
Total (Corr.)	1691.13	18			

Pruebas de Múltiple Rangos para Área transformada por Tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. Se han identificado 3 grupos

homogéneos según la alineación de las X's en columnas. Por tanto, se confirma que los tratamientos con edades C y D con aplicación de AJ son estadísticamente diferentes a los demás tratamientos.

Tabla 8 grupos homogéneos en áreas transformadas según tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
-AJ Edad C	5	6.7876	X
-AJ Edad D	5	7.0136	X
+AJ Edad C	5	18.1108	X
+AJ Edad D	4	27.2395	X

Tabla 9 Tratamientos con diferencias estadísticas según área transformada

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
+AJ Edad C - +AJ Edad D	*	-9.1287	7.39918
+AJ Edad C - -AJ Edad C	*	11.3232	6.97601
+AJ Edad C - -AJ Edad D	*	11.0972	6.97601
+AJ Edad D - -AJ Edad C	*	20.4519	7.39918
+AJ Edad D - -AJ Edad D	*	20.2259	7.39918
-AJ Edad C - -AJ Edad D		-0.226	6.97601

* indica una diferencia significativa.

10. Discusión de resultados

El constructo *RUBY* es un sistema reportero desarrollado recientemente para expresión de tres enzimas involucradas en la vía de conversión de tirosina a betalainas, la cual genera manchas de color rojo brillante en el tejido transformado después de 3 DPI (He, Zhang, Sun, Zhan, & Zhao, 2020). Este sistema ha demostrado ser de bastante utilidad en la optimización del proceso de transformación de aguacate, ya que permitió una rápida y fácil observación de la expresión sin la necesidad de posteriores tratamientos o equipo especializado. Mientras que el sistema reportero GFP insertado en los vectores pJL-TRBO-G, pEff, pHREAC no pudo ser utilizado para realizar un filtro de los tratamientos pues la fluorescencia no fue observada en hojas de aguacate bajo luz UV. Aunque si hubo transformación con pJL-TRBO-GFP y pHREAC-GFP confirmada por Western blot (ANEXOS), era necesario tener un sistema de rápida identificación y de bajo costo teniendo en cuenta cantidad de hojas procesadas, por lo que se optó por realizar la optimización de los diferentes parámetros con el constructo *RUBY*. Sin embargo, este sistema tiene la desventaja de que no permite

ser usado en estudios de detección subcelular como sí lo haría GFP, pues la coloración de *RUBY* es causada por las moléculas betalaínas y no por una proteína. De igual forma, para este proyecto el sistema reportero *RUBY* fue bastante apropiado pues sólo se estaba buscando desarrollar y optimizar un método de transformación. Es probable que la poca capacidad de observar GFP en hojas de aguacate sea debido a la interferencia causada por la clorofila en la hoja que ha demostrado entorpecer la detección de GFP en carretón, arroz y *Arabidopsis* (Zhou, Carranco, Vitha, & Hall, 2005). La observación de la coloración roja en las hojas de aguacate fue permanente hasta que la hoja se marchitó (más de 15 DPI) y no se notó alguna disminución en la coloración como sí se observó disminución de la observación de GFP después de llegar a un punto máximo de fluorescencia (5-7 DPI), cuya foto-estabilidad se pierde con el tiempo y exposición a luz UV (Adhikari et al., 2021). No es claro si esta presencia permanente en la coloración es debido a que hay una constante expresión del vector *RUBY* o simplemente es porque la molécula de betalaína es más estable que la proteína GFP.

La infiltración de hojas de aguacate por jeringa sin aguja no fue posible en estudios preliminares, por tanto, la aplicación de vacío se convirtió en una opción adecuada para superar las barreras de gruesa cutícula, pequeños espacios intersticiales y rigidez de las hojas de aguacate pues se puede regular la cantidad de presión y su duración. La transformación por vacío tiene ciertas ventajas sobre otros tipos de transformación; consume menos tiempo que transformar protoplastos, menos costosa que biobalística y asegura un mayor ingreso del medio de infiltración al interior de la hoja en comparación a la jeringa. A pesar de lograr la infiltración, por medio de vacío, este método presenta cierta desventaja pues requiere el equipo especializado de bomba de succión conectado a la cámara de vacío. En nuestro caso la presión de vacío que permitió mayor transformación fue 0.07 MPa con 3 periodos de 5 minutos y descanso de un minuto entre cada periodo de vacío, lo cual concuerda con anteriores estudios donde también incrementaron la eficiencia de transformación a través de la aplicación de vacío, probablemente por un mayor ingreso de la suspensión de *Agrobacterium* al interior (Joh, Wroblewski, Ewing, & VanderGheynst, 2005; Simmons, VanderGheynst, & Upadhyaya, 2009).

Las hojas de aguacate presentan diferencias evidentes en cuanto a grosor, textura, coloración, rigidez y en experimentos preliminares se encontró ciertos grupos de hojas donde había más puntos de

transformación. Se ha demostrado que la eficiencia de transformación por *Agrobacterium* depende en gran medida de la edad del tejido vegetal, haciéndose más recalcitrante con el envejecimiento (Wixom et al., 2018). También, se ha relacionado la capacidad de infiltrar suspensiones de *Agrobacterium* en hojas con el volumen de los espacios intercelulares y el arreglo de las células del mesófilo, pues hojas con reducidos espacios y células muy compactas podrían dificultar la inserción de suficiente cantidad de bacterias (Zheng et al., 2021). Por tanto, se optó por clasificar las hojas en grupos de edad para encontrar el grupo con mayor capacidad de infiltración o eficiencia de transformación. Encontrando que los estadios intermedios C y D obtienen la mejor eficiencia, concuerda con algunos estudios donde mencionan que una edad intermedia puede tener mayores espacios intercelulares al tiempo en que están lo suficientemente maduras para resistir el proceso de transformación (An et al., n.d.; Han, Ma, Kong, Takano, & Liu, 2013; Verma et al., 2008). También se ha encontrado que gruesas cutículas cerosas pueden causar dificultad ante la infiltración cómo sucede en *Rosa chinensis* (Lu, Bai, Ren, Liu, & Wang, 2017). Así que se hipotetiza que otra razón por la cual las hojas de estadio avanzado de aguacate E no lograron ser transformadas es por la presencia de esta cutícula cerosa que incluso pudo haberse introducido en las micro-heridas impidiendo la infiltración.

Los resultados mostraron un fuerte aumento de la eficiencia de transformación ante el pretratamiento con micro-heridas, donde las hojas no tratadas presentaron contados o ningún punto con expresión de betalaínas. Como se menciona en el marco teórico, las heridas en el tejido vegetal constituyen un factor importante en la transformación mediada por *Agrobacterium*, ya que estas son el sitio de entrada para las bacterias y además el tejido herido secreta moléculas que inducen los genes *vir* de *Agrobacterium* encargados del proceso de transformación (Horsch et al., 1985). Para este estudio se aplicó acetosiringona como inductor externo de la virulencia; también, se sabe que las hojas de *Persea americana* contienen otros compuestos fenólicos cómo vainillina y ácido cinámico (Castro-López et al., 2019), los cuales han demostrado tener incluso más capacidad inductora de virulencia en *Agrobacterium* que la misma acetosiringona (Cha, Chen, Yee, Aziz, & Loh, 2011). Por tanto, se hipotetiza que las micro-heridas no solo aumentan la infiltración de la suspensión bacteriana en las hojas, sino que podrían causar la liberación de compuestos que favorecen la transformación.

La recalcitrancia de las plantas a la transformación con *Agrobacterium* también es atribuida a la activación de la respuesta inmune ante la percepción de bacterias (Pitzschke, 2013). Es sabido que la respuesta inmune de las plantas ante diversas amenazas es desencadenada por ciertas hormonas, según el tipo de amenaza. Por ejemplo, el AJ es una fitohormona que, ante el ataque de insectos o daño mecánico, señala la respuesta de defensa activando la “resistencia sistémica inducida” (ISR), mientras desactiva la “resistencia adquirida sistémica” (SAR), respuesta inmune desencadenada por ácido salicílico (AS) para defensa en contra de infecciones biotróficas (Choudhary, Prakash, & Johri, 2007; Durrant & Dong, 2004). Por tanto, se hipotetiza que la adición exógena de AJ puede suprimir SAR por una compleja red de señalización entre AJ y AS, haciendo la planta más vulnerable a la infección bacteriana ya que está empleando más recursos en activar defensa contra insectos (Pieterse, Leon-Reyes, Van Der Ent, & Van Wees, 2009). Los resultados en nuestro trabajo muestran un contundente aumento del nivel de expresión del constructo *RUBY* en hojas de aguacate con la aplicación de AJ en el medio de infiltración con *Agrobacterium* LBA4404, lo cual también concuerda con datos previos de expresión transitoria en hojas de girasol (S. Jung & McDonald, 2016). En este estudio probaron diferentes hormonas, obteniendo la mayor acumulación de la proteína de interés ante la aplicación de AJ 250 μ M y con la aplicación de AS obtuvieron la más baja concentración. Se desconoce si una concentración diferente a 250 μ M de AJ puede causar mayor nivel de expresión en aguacate ya que no se probó con diferentes concentraciones. En los resultados combinados de micro-heridas y AJ, se encuentra un efecto sinérgico en la aplicación de estos dos tratamientos, pues cuando se aplican por separado, la transformación es poca o nula, mientras que, al aplicar ambos tratamientos, se puede observar alta expresión de *RUBY*, lo cual fue consistente tanto para hojas de estadio C y D (Fig. 22). Por tanto, ambos tratamientos fueron necesarios o cruciales en este proyecto para optimizar la transformación transitoria en hojas de aguacate.

Aunque en superficies diferentes a hojas los detergentes no iónicos Tween-20 y Triton X-100 han mostrado tener la misma capacidad de adsorción (Martínez et al., 1997), en el presente estudio se encontró mayor transformación al aplicar Triton X-100. Probablemente esto se deba a las diferencias en la interacción de cada surfactante con las células vegetales, ya que el Triton X-100 inserta un monómero detergente en la membrana lipídica, permeabilizándola, mientras el Tween-20

puede regular las propiedades de difusión de proteínas transmembrana y tiene una concentración crítica de micela (CMC) baja, por lo que se conoce como detergente suave (Dresser et al., 2022; Johnson, 2013). Se ha encontrado que el Triton X-100 tiene mayor capacidad de solubilizar macrófagos y algunos tipos de membranas celulares sobre el Tween-20 (Schuck, Honsho, Ekroos, Shevchenko, & Simons, 2003).

Con todos los parámetros optimizados en este trabajo se acerca la posibilidad de transformar transitoriamente hojas unidas a la planta completa de *Persea americana*, lo cual permitirá explorar función génica y vías metabólicas en esta planta no-modelo.

11. Conclusiones

Agroinfiltración de hojas sueltas de aguacate con diferentes tratamientos

Vector de sobreexpresión

- Debido a la dificultad de realizar un filtro observando fluorescencia en hojas de aguacate, al gran consumo de tiempo que implican los inmunoensayos, sumado al tiempo de espera de expresión de GFP en la hoja, a lo costoso de los reactivos para inmunoensayos y a la gran cantidad de falsos positivos en el Western Blot, los vectores pJL-TRBO-G, pEff y pHREAC fueron descartados para realizar optimización de condiciones de transformación transitoria en hojas de aguacate.
- El vector binario 35S:*RUBY* demostró ser un vector de expresión génica efectivo, de bajo costo, con un sistema reportero de alta visibilidad en hojas de aguacate; pues se observó claramente coloración roja rubí bajo luz natural sin equipo especializado.
- La coloración producida por *RUBY* se observó hasta que la hoja se deterioró (más de 15 DPI) a diferencia de GFP que tuvo un punto máximo de fluorescencia (5-7 DPI) y luego disminuyó. No es claro si esta presencia permanente en la coloración es debido a que hay una constante expresión del vector *RUBY* o simplemente es porque la molécula de betalaína es más estable que la proteína GFP

Efecto de la cepa, estadio de la hoja, AJ y micro-heridas

- Los estadios C y D de la hoja en conjunto con la aplicación de micro-heridas, AJ y cepa LBA4404 fueron los factores que permitieron obtener la transformación transitoria de

hojas de aguacate. Al cambiar o eliminar alguno de estos factores se obtiene nula o casi nula transformación.

- No se ha comprobado para hojas de aguacate si el aumento en la eficiencia de transformación con micro-heridas es causado simplemente por el mayor ingreso de medio de infiltración a la hoja o también es por el efecto de la liberación de algún compuesto que favorezca a la virulencia en *Agrobacterium*.
- El estadio D resiste más a la infiltración que el C que es más joven y débil. El estadio E que corresponde a hojas más viejas son difíciles de infiltrar por su gruesa textura o tiene mayor capacidad inmune, por tanto, no se observó expresión de 35S:*RUBY* más que en contadas hojas con 1 o dos puntos claros.

Efecto de surfactantes

- Triton X-100 demostró tener un efecto positivo en la infiltración de las hojas, incluso se notó algunos puntos de transformación en hojas sin heridas. Sin embargo, varias hojas con este surfactante presentaban necrosis. Existe la posibilidad de que ante una concentración aún menor a 0.002% se pueda alcanzar igual una alta transformación y disminuir el daño.

Efecto de infiltración sin vacío e incubación prolongada

- Sin tratamiento de vacío y con las demás condiciones ensayadas, las hojas de aguacate no lograron ser transformadas y con incubación prolongada (16 o 24 horas) en medio de infiltración las hojas sufren un deterioro acelerado y no sobreviven al tratamiento.

Efecto de co-infiltración con AGL1- pBBRacdSgabT

- La infiltración a partir de un co-cultivo ($OD_{600}=0.6$) de LBA4404 portando el vector 35S:*RUBY* con AGL1 portando el vector pBBRacdSgabT, no mostró tener efecto significativo sobre el aumento de la eficiencia de transformación ni en evitar la necrosis pues ambos tratamientos sufrieron deterioro.
- Es posible que pBBRacdSgabT no pudo ser expresado exitosamente en las hojas ya que en los ensayos vistos anteriormente se ha encontrado que AGL1 tiene baja o nula capacidad de

transformar hojas de aguacate a concentración de OD₆₀₀ 0.6. Sería pertinente probar el co-cultivo con otra cepa de mayor eficiencia de transformación.

Efecto de la concentración de *Agrobacterium* en el medio de infiltración:

- Se confirma que la concentración óptima de *Agrobacterium* en la suspensión celular para transformar hojas de aguacate es a DO₆₀₀ 0.6, siendo superior a los resultados con 1.0. Es posible que a altas concentraciones bacterianas ocurra algún efecto inhibitorio sobre la transferencia de T-DNA en aguacate.

Efecto de diferentes presiones de vacío y número de repeticiones:

- La mayor eficiencia de transformación transitoria en hojas de aguacate Hass fue observada a 0.06 MPa y 3 vacíos. Sería pertinente ensayar mayor tiempo de vacío o mayor cantidad de repeticiones de vacío para ver si es posible encontrar mayor transformación.

Comparación de medios de infiltración:

- No se encontró diferencia entre el medio #1 o #2, por tanto, en posteriores ensayos se puede usar el medio #2 que es más económico.

12. Prospección:

- Con este protocolo de transformación de hoja de aguacate que ha demostrado funcionar de forma eficiente, se viabiliza la posibilidad de transformar *in planta* lo cual permitiría observar los efectos de la transformación por más cantidad de tiempo sin depender de la caducidad de una hoja suelta. Teniendo todos los parámetros anteriormente optimizados sólo se tendría que encontrar la forma de someter la planta al vacío, lo cual podría realizarse introduciendo parte de una rama al interior de la cámara de vacío con el resto de la planta al exterior e ingeniar cómo sellar los puntos de entrada de aire para lograr la misma presión de vacío que se obtuvo en el experimento con hojas.

- Con el conocimiento cada vez mayor de las secuencias de los genes de *P. americana*, sus transcritos, y ahora con el logro de transformación transitoria en hojas del importante cultivar Hass, se podrá caracterizar funcionalmente genes en esta planta. Por tanto, se podrán generar mutantes y transgénicos para estudiar los genes que brindan resistencia a enfermedades o adversidades ambientales, genes encargados de ciertos rasgos de calidad en el fruto, etc.
- Al obtener la planta de Aguacate Hass transformada transitoriamente *in planta* se podría generar plantas con floración precoz (Callahan et al., 2016; Endo et al., 2020) y así acceder a programas de mejoramiento genético acelerado (Fast-Track breeding) donde el largo periodo juvenil del aguacate ya no será un obstáculo para obtener nuevas variedades mejoradas.

ANEXOS Metodología

1. Detección de Ruby

Determinación de área transformada por Photoshop

A continuación, se muestra la serie de pasos realizados para obtener el área transformada por Photoshop:

- 1) Abrir la imagen de la hoja desde el panel de Photoshop
- 2) Con la herramienta de “Selección rápida” o tecla W se selecciona la mitad de la hoja con micro-heridas. Luego se da clic derecho y selecciona “Capa vía copiar”. Esto genera que se copie el área de roller a una nueva capa (ventana). El total de capas aparecen en la esquina inferior derecha y ahí se puede seleccionar en cual capa se quiere posicionar.
- 3) Se posiciona en la nueva capa (con la hoja a la mitad) y selecciona la herramienta de “varita mágica” (o selección difusa) luego se da clic a los puntos transformados con *RUBY* y el programa seleccionará otros píxeles que tengan la misma coloración o similar y los píxeles que se encuentren a su alrededor según la tolerancia. En la parte superior de la ventana está la opción de “Toler” que nos permite seleccionar con cuanta tolerancia de número de píxeles se quiere trabajar. Por ejemplo, si se ubica el cursor en un área grande muy roja, y tenemos Toler de 10, el programa seleccionará todos los píxeles con ese mismo tono de rojo y además seleccionará 10 píxeles a la redonda.
- 4) Cómo la herramienta sólo reconoce el color que se selecciona, se deben seleccionar varios puntos ya que la hoja presenta diferentes tonalidades de betalainas (aparentemente naranja,

- rojo intenso, rojo claro, rosa, etc). Normalmente para cada hoja se seleccionan cerca a 10 puntos diferentes o hasta que se note que se ha cubierto toda el área transformada.
- 5) En este trabajo se encontró que el Toler óptimo para seleccionar las áreas es 10 y en caso de que algún pixel de coloración verde apareciera en la selección, se usa el Toler 3 y se usa la opción de remover selección (signo – en la barita).
 - 6) Una vez hecha la selección, se da clic derecho y selecciona capa vía copiar, lo cual genera que se copie sólo el área con *RUBY* a una nueva capa (ventana).
 - 7) Luego con el área seleccionada se da clic en el panel superior de Photoshop en la opción de imagen>análisis>Grabar medidas y automáticamente el programa arroja diferentes medidas, que incluyen el área en pixeles de la región seleccionada.

2. Detección de GFP

2.1. Extracción de proteína GFP

Se realiza extracción de proteínas para posteriores ensayos de detección de GFP por inmunoensayos y por fluorimetría, buscando emplear un método de extracción de proteínas cuyo extracto pueda ser analizado tanto por fluorimetría como por inmunoensayos en vez de realizar dos métodos diferentes para minimizar tiempo y recursos. Por tanto, se emplearán diferentes buffers de extracción para identificar cual es el más apto, los cuales son:

<p>Buffer 1 (N)e Trizol Cloroformo. Etanol 100%. Isopropanol. Clorhidrato de guanidina 0.3M (x3 reps) Etanol 100% SDS al 1%</p>	<p>uno mM KCl 5 mM MgCl₂ 10% (v/v) glicerol 10 mM b-mercaptoetanol</p>	<p>Isopropanol. Etanol100% Disolución de pellet 2M Urea pH12</p>
<p>Buffer 2 (J) 25 mM Na₂HPO₄ 100mM NaCl 0.5% Triton X-100 1mM PMSF (en el momento)</p>	<p>Buffer 4 (N Buffer 1 modifíc) Trizol Cloroformo. Etanol 100%. Isopropanol. Clorhidrato de guanidina. 0.3M Etanol100% 2M Urea pH12</p>	<p>Buffer 7 (Marillonnet et al., 2004) 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 5 mM 2-mercaptoethanol 10 mM EDTA 0.1% Triton X-100</p>
<p>Buffer 3 (Mardanova et al., 2017) 0.4 mM sacarosa 50 mM tris pH 8</p>	<p>Buffer 5 (MJ) Buffer 3 + Triton 0.5% + PMSF</p> <p>Buffer 6 Iso Trizol Cloroformo. Etanol 100%.</p>	

2.2. ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas):

- Aproximadamente 100 mg de tejido de la hoja se muelen en nitrógeno líquido, y se resuspenden en 400 µL de buffer de extracción de proteínas (TRIS-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 10 mM y PMSF 1 mM).
- Se resuspende durante 3-5 min, seguido por centrifugación a 13 000 rpm durante 10 min a 4°C.
- Se colecta el sobrenadante en un tubo limpio y se procede con la técnica o se puede almacenar a -20 °C.
- En una microplaca de poliestireno de 96 pozos se agrega 100 µL de buffer de carbonatos (3.7 g/L NaHCO₃, 0.64 g/L Na₂CO₃)
- Se añade un volumen igual (100 µL) del extracto de las proteínas de las hojas junto con diluciones de concentración conocida de la proteína estándar contenidas en el mismo volumen (100 µL de buffer de carbonatos) durante la noche a 4 °C.
- Se hacen 3 lavados con TBS-T y se bloquean con 5% de leche libre de grasa durante 2 h, a 25°C o toda la noche a 4°C.
- Las placas luego se lavan con TBS-T 3X se añadirán anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés (dilución 1:1000). Se incubarán durante 4 horas a 25°C o toda la noche a 4°C.
- Se hacen 3 lavados con TBS-T. Posteriormente se añadirá el anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón, conjugado con peroxidasa durante 2 h a 25°C (dilución 1:5000). Después del lavado, se determinará la unión de los anticuerpos con orto-fenilendiamina (OPD) (ver hoja del proveedor para su funcionalización)
- Inmediatamente posterior a su incubación se determina la DO a 405 nm durante 30 in hasta que se sature la reacción.

2.3. Western blot.

Electroforesis de proteínas

Se Limpian los vidrios con alcohol, se alinean los vidrios, el vidrio separador, se colocan en el soporte y se revisa que estén fijos. Luego se coloca sobre la base y se revisa que no existan fugas agregando etanol y luego retirándolo.

- Preparación del gel de separación según la siguiente tabla

REACTIVO	GEL 10% (10 mL)	GEL 7.5% (10 mL)	GEL 12% (10 mL)
poliacrilamida	3.33 mL	2.5 mL	4.16 mL
Amortiguador Tris-base 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
SDS 20%	50 µL	50 µL	50 µL
Agua Desionizada	4 mL	4.87 mL	3.2 mL
Temed	6.5 µL	6.5 µL	6.5 µL
APS 10%	100 µL	100 µL	100

- Se agrega isopropanol hasta el borde del vidrio para que polimerice en ausencia de aire, se retira el isopropanol con papel filtro evitando tocar el gel y luego preparar el gel concentrador según la siguiente tabla:

REACTIVO	5 mL
Poliacrilamida	0.67 mL
Amortiguador Tris-base 6.8	1.25 mL
SDS 20%	25 μ L
Agua Desionizada	3 mL
Temed	5 μ L
APS 10%	80 μ L

- Vaciarlo sobre el gel de separación, colocar el peine, una vez polimerizado se desmonta el gel de la base y se quita con cuidado el peine. Se coloca dentro de la cámara de electroforesis con el vidrio pequeño hacia adentro y se llena la cámara con buffer de corrida. Se cargan los geles con el marcador de peso molecular y las muestras correspondientes. Luego correr el gel a 120 V por 1:30 h aproximadamente.

Transferencia

Llevar a cabo la transferencia húmeda a membranas de PVDF:

- Funcionalizar la membrana de PVDF con metanol por 2 minutos y posteriormente equilibrarla 5 min en Buffer de transferencia. Colocar 4 papeles filtro, gel de poliacrilamida y membrana de PVDF en un recipiente y cubrirlos con buffer de transferencia. Hacer un sándwich dentro del aparato de transferencia de la siguiente manera:

Placa negra + Esponja + 2 papeles filtro + Gel + Membrana de nitrocelulosa + 2 papeles filtro + esponja + Placa roja

- Se deben quitar las burbujas haciendo rodar un objeto cilíndrico sobre los últimos papeles filtro. Luego colocarlo en la cámara de transferencia revisando que el lado negro coincida con electrodo negativo y el rojo con el positivo. Se llena la cámara con buffer de transferencia. Colocar la cámara de transferencia dentro de un recipiente con hielo y agua fría, mantener en frío y con un agitador magnético dentro de la cámara para mantener la temperatura uniforme. Realizar la transferencia a 150 V por 1 h.

Detección de proteínas

- Se lava la membrana con TBS-T 3 veces, bloquear con leche al 5% en TBS-T por 2 h y luego incubar con el anticuerpo primario una noche a 4 °C. Lavar la membrana con TBS-T 3 veces e Incubar con el anticuerpo secundario 1-3 h a temperatura ambiente. Se lava de nuevo la membrana con TBS-T 3 veces y se coloca la membrana en un plástico transparente y sellable para evitar fugas. Se colocan 500 μ L de las soluciones 1 y 2 del kit PIERCE® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) y se incuban por 1 min. Luego se retira el exceso de reactivo.
- Se fija la membrana dentro del cassette, luego cortar la placa de revelado y colocarla encima de la membrana (en oscuridad máxima), cerrar el cassette. Esperar el tiempo correspondiente 1-5 min, sacar la placa y meterlas a la solución reveladora y solución fijadora y agua (en este orden).

Detección de GFP por espectrometría de fluorescencia

Se toman 50-150 µl del extracto proteico y se llevan al monocromador (TECAN). Este equipo debe ser programado con los parámetros de longitud de onda, número de flashes, Gain y step como se muestra en las siguientes figuras, dependiendo de si se quiere conocer la intensidad de la fluorescencia en una longitud de onda en específico o si se quiere conocer todo el espectro de fluorescencia en un rango de longitud de onda.

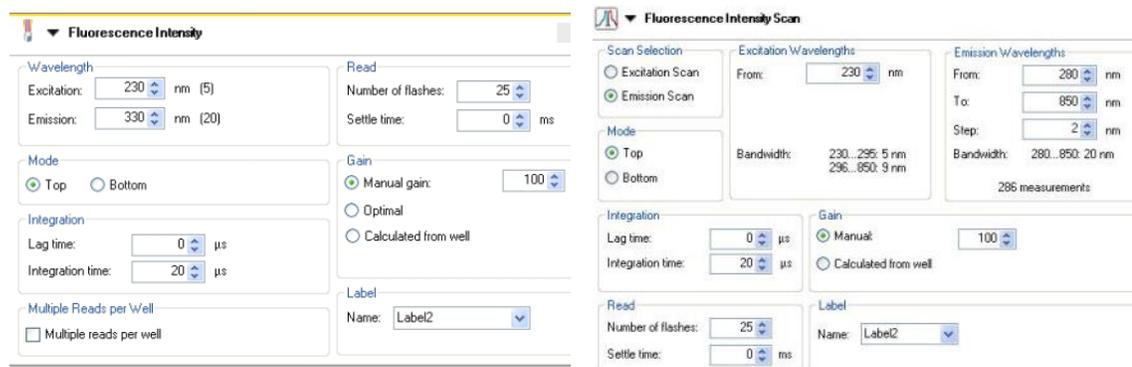


Fig. S 1

Para GFP se tiene que la longitud de onda a la cual obtiene mayor excitación es a 400 nm y la longitud de onda a la cual emite con mayor intensidad es a 508 nm.

ANEXOS Resultados

Observación de plantas control (*N. benthamiana*) bajo luz UV al 3dpi usando diferentes cepas que portaban el vector pJL-TRBO-G:

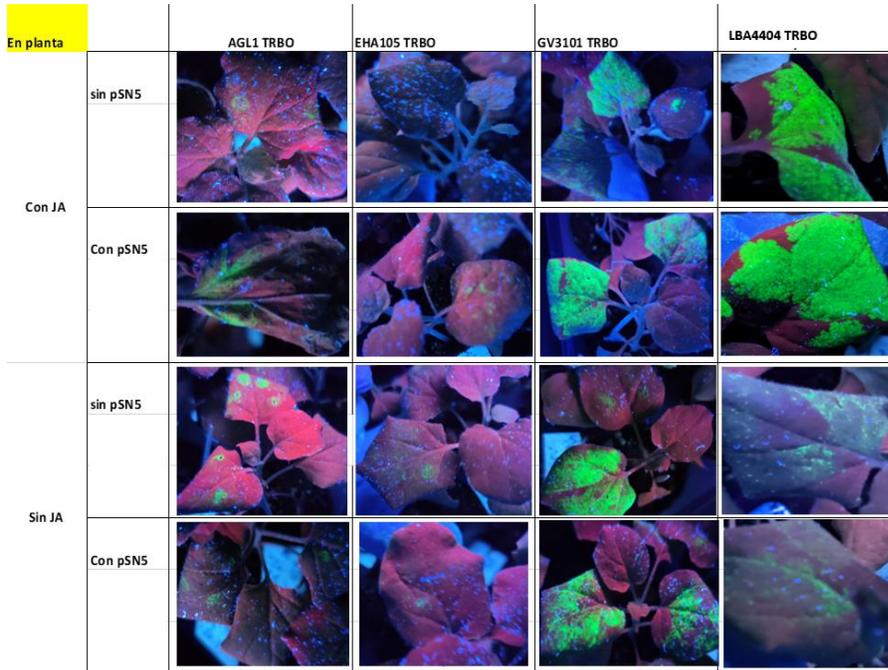


Fig. S 2 Plantas de *N. benthamiana* al 3dpi de transformación con pJL-TRBO-GFP y diferentes tratamientos.

3. Detección de GFP en hojas de aguacate por inmunoensayos:

Se realizó infiltración por vacío sobre hojas jóvenes de aguacate usando las cepas AGL1, EHA105, GV3101 y LBA4404 portando los vectores pJL-TRBO-G y pHREAC y con adición de Jasmonato (JA), aplicación de microneedle. Para cada tratamiento se usó 2 hojas y las condiciones de infiltración están definidas en el apartado de la metodología.

Debido a que no se pudo identificar de forma contundente la presencia de GFP en las hojas de aguacate por observación bajo luz UV, se procedió con métodos de detección por anticuerpos como ELISA o Western blot. A continuación, se presentan los resultados de estas pruebas.

Prueba Elisa

Para esta prueba se eligieron algunas de las muestras obtenidas de los diferentes tratamientos (Tabla 1) donde se infiltró con los vectores pJL-TRBO-G y pHREAC. Donde se usó como control positivo muestras de *N. benthamiana* transformada con GFP y GFP pura de proveedor Merck.

Tabla e Muestras analizadas con prueba ELISA

1. T2 AGL1 pHREAC
2. T3 AGL1 pHREAC
3. T4 AGL1 pHREAC
4. T3 EHA pHREAC
5. T4 EHA pHREAC
6. T1 GV3101 pHREAC

7. T3 GV3101 pHREAC
8. T8 GV3101 pHREAC
9. T1 LBA4404 pHREAC
10. e
11. T3 LBA4404 pHREAC
12. T5 LBA4404 pHREAC
13. T7 LBA4404 pHREAC
14. T8 LBA4404 pHREAC

15. T1 AGL1 TRBO
16. T2 AGL1 TRBO
17.
18. T5 AGL1 TRBO
19. T7 AGL1 TRBO
20. T1 EHA TRBO
21. T3 EHA TRBO
22. T5 EHA TRBO

23. T6 EHA TRBO
24. T1 GV3101 TRBO
25. T3 GV3101 TRBO

26. T3 GV3101 TRBO
27. T7 EHA TRBO
28. T4 GV3101 TRBO

29. T5 GV3101 TRBO
30. T7 GV3101 TRBO

En la Tabla 1 se muestran los veinte mejores resultados de absorbancia. Aquí se puede observar varias muestras con valores de absorbancia que duplican el control negativo (0.85), lo cual indica que hay presencia de GFP en estas muestras y por tanto la transformación fue exitosa.

El resto de las muestras inferiores al Top 20 poseen valores bajos, muy cercanos al control negativo de 0.093 y no se muestran en esta tabla.

Tabla 10 Resultados de absorbancia de la prueba ELISA

TOP	CELDA	ABS 1304 segundos	Muestra	Tratamiento	Cepa	Vector
Control N. benth.	G5	0.572	+ N. benth	---	---	---
Control GFP	E5	0.536	+ GFP	---	---	---
1	A1	0.199	1	T2	AGL1	pHREAC
2	D3	0.181	20	T1	EHA	TRBO
3	B3	0.170	18	T5	AGL1	TRBO
4	H3	0.164	24	T1	GV3101	TRBO
5	C4	0.153	27	T7	EHA	TRBO
6	G2	0.148	15	T1	AGL1	TRBO
7	A2	0.145	9	T1	LBA4404	pHREAC
8	C3	0.145	19	T7	AGL1	TRBO
9	A4	0.140	25	T3	GV3101	TRBO
10	E1	0.132	5	T4	EHA	pHREAC
11	D1	0.130	4	T3	EHA	pHREAC
12	G1	0.130	7	T3	GV3101	pHREAC
13	H1	0.128	8	T8	GV3101	pHREAC
14	F4	0.126	30	Durazno transformado con pEff		
15	E3	0.122	21	T3	EHA	TRBO
16	F2	0.121	14	T8	LBA4404	pHREAC
17	H2	0.120	16	T2	AGL1	TRBO
18	D2	0.119	12	T5	LBA4404	pHREAC
19	F1	0.118	6	T1	GV3101	pHREAC
20	B4	0.117	26	T3	GV3101	TRBO

4. Western Blot

Para confirmar los resultados del Elisa, también se realizó Western Blot para algunas de estas muestras. En la Fig. 17 se puede observar que en los pozos de las muestras del Top 1 al 15 efectivamente hubo reacción de quimioluminiscencia y por tanto hay presencia de GFP. Incluso, en esta imagen se puede observar cierta correlación de mayor área de coloración para el Top1 de Elisa y menor para el Top 15, lo cual indica que estas primeras muestras si tienen mayor concentración. En los pozos del Top 3 y del control N. Benth, se

observan varias bandas de menor peso molecular, lo cual indica que hubo desnaturalización de la proteína, y por tanto se debe estandarizar el método de extracción para evitar estos eventos en el futuro.



Fig. S 3 Resultado western blot muestras de proteína de hojas de aguacate transformadas con pJL-TRBO-G , pHREAC y pEff-GV3101.

5. Detección de señal de fluorescencia de GFP en lector de microplacas

Debido a que realizar ensayos de ELISA y Western Blot son costos en cuanto a tiempo y dinero, se decidió optar por una alternativa que consumiera menos tiempo. Por tanto, se tuvo en cuenta que la señal de fluorescencia GFP en un extracto puede ser leída por un equipo monocromador. Así que se realizaron calibraciones en los espectros de emisión y excitación para encontrar a cuál la longitud de onda se excita y emite la molécula de GFP en la muestra de extracción de proteínas. También se emplearon diferentes protocolos de extracción de proteínas para encontrar cuál extracto permitía detectar mayor señal de GFP disminuyendo las interferencias que pueden causar otros compuestos e la planta.

5.1. Comparativa entre diferentes buffers de extracción de proteína para detectar señal de fluorescencia

Buffers>

Buffer 1 vs Buffer 2

Se realizó extracción de proteína de hoja de aguacate transformada (Top1 Elisa) con los dos buffers, así que se comparó en el fluorómetro las lecturas de cada muestra bajo longitudes de onda de 400nm y 508 nm (excitación y emisión). Donde los resultados de fluorescencia son:

Tabla 11 comparación entre buffer 1 y 2

Muestra	Fluorescencia
Ctrl + Tabaco transformado con GFP	177210
Buffer 1	4794
Buffer 2	98865
Ctrl – Aguacate sin transformar	56539

El buffer 2 muestra ser más adecuado para ser analizado en el monocromador ya que, aunque la muestra con el buffer 1 también tiene la misma concentración de GFP, la lectura de fluorescencia es mucho menor a la del control negativo. Probablemente es debido a que el buffer 1 contiene agentes desnaturizantes que afectan la actividad de GFP.

Buffers 2-7

Se realizó extracción de proteínas de muestras obtenidas a partir de la maceración de hojas de aguacate con hojas de *N. benthamiana* transformada con GFP. El Control- corresponde a extracciones de hojas de aguacate sin GFP. Según los resultados las lecturas que muestran una diferencia entre el control negativo la muestra problema serían las del Buffer 5 y 6. Sin embargo, al adicionar triton al buffer 3, se observa que también hubo diferencia entre el control- y la muestra. (Fig. S 4 y S 5)

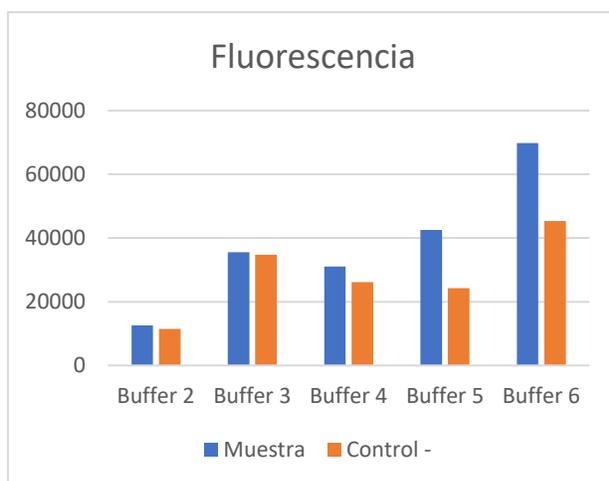


Fig. S 4 Comparación entre muestras extraídas con buffers 2-6

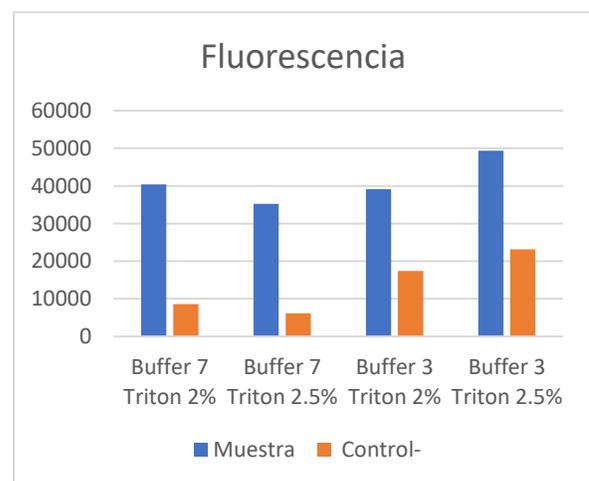


Fig. S 5 Comparación entre muestras extraídas con buffers 3 y 6 y diferentes concentraciones de triton

Bibliografía

- Acanda, Y., Welker, S., Orbović, V., & Levy, A. (2021). A simple and efficient agroinfiltration method for transient gene expression in Citrus. *Plant Cell Reports*, (0123456789).
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02700-w>
- Adhikari, D. P., Biener, G., Stoneman, M. R., Badu, D. N., Paprocki, J. D., Eis, A., ... Raicu, V. (2021). Comparative photophysical properties of some widely used fluorescent proteins under two-photon excitation conditions. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 262.
<https://doi.org/10.1016/J.SAA.2021.120133>
- Alcaraz, M. L., & Hormazaa, J. I. (2019). Reproductive biology of avocado (*Persea americana*). *Acta Horticulturae*, 1231, 23–28. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1231.5>
- An, X., Wang, B., Liu, L., Jiang, H., Chen, J., Ye, S., ... Peng, D. (n.d.). *Agrobacterium-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf midribs as explants in ramie [Boehmeria nivea (L.) Gaud]*. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3188-4>
- Barton, K. A., Binns, A. N., Matzke, A. J. M., & Chilton, M. D. (1983). Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T-DNA, and transmission of T-DNA to R1 progeny. *Cell*, 32(4), 1033–1043. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90288-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90288-X)
- Callahan, A. M., Srinivasan, C., Dardick, C., & Scorza, R. (2016). Rapid Cycle Breeding: Application of Transgenic Early Flowering for Perennial Trees. *Plant Breeding Reviews*, 40, 299–334.
<https://doi.org/10.1002/9781119279723.ch7>
- Castro-López, C., Bautista-Hernández, I., González-Hernández, M. D., Martínez-Ávila, G. C. G., Rojas, R., Gutiérrez-Díez, A., ... Aguirre-Arzola, V. E. (2019). Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Leaf Purified Hydroalcoholic Extracts from Seven Mexican *Persea americana* Cultivars. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 173, 24(1), 173. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24010173>
- Cha, T. S., Chen, C. F., Yee, W., Aziz, A., & Loh, S. H. (2011). Cinnamic acid, coumarin and vanillin: Alternative phenolic compounds for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the unicellular green alga, *Nannochloropsis* sp. *Journal of Microbiological Methods*, 84(3), 430–434.
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.01.005>
- Chang, S., Mahon, E. L., MacKay, H. A., Rottmann, W. H., Strauss, S. H., Pijut, P. M., ... Jones, T. J.

- (2018). Genetic engineering of trees: progress and new horizons. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2018 54:4, 54(4), 341–376. <https://doi.org/10.1007/S11627-018-9914-1>
- Chaparro-Pulido, C. A., Montiel, M. M., Palomo-Ríos, E., Mercado, J. A., & Pliego-Alfaro, F. (2014). Development of an efficient transient transformation protocol for avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic callus. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(2), 292–298. <https://doi.org/10.1007/S11627-013-9564-2/FIGURES/4>
- Chapman, S. C., Chakraborty, S., Fernanda Dreccer B, M., & Howden, S. M. (2012). Plant adaptation to climate change-opportunities and priorities in breeding. *Crop & Pasture Science*, 63, 251–268. <https://doi.org/10.1071/CP11303>
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., & Xie, D. (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in arabidopsis. *Molecular Plant*, 4(2), 279–288. <https://doi.org/10.1093/MP/SSQ073>
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)
- Choudhary, D. K., Prakash, A., & Johri, B. N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47(4), 289–297. <https://doi.org/10.1007/S12088-007-0054-2>
- Conti, G., Xoconostle-Cázares, B., Marcelino-Pérez, G., Hopp, H. E., & Reyes, C. A. (2021). Citrus Genetic Transformation: An Overview of the Current Strategies and Insights on the New Emerging Technologies. *Frontiers in Plant Science*, 12, 2519. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.768197/BIBTEX>
- Degtyarenko, A. I., Gorpenchenko, T. Y., Grigorochuk, V. P., Bulgakov, V. P., & Shkryl, Y. N. (2021). Optimization of the transient Agrobacterium-mediated transformation of *Panax ginseng* shoots and its use to change the profile of ginsenoside production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2021 146:2, 146(2), 357–373. <https://doi.org/10.1007/S11240-021-02075-6>
- Dresser, L., Graham, S. P., Miller, L. M., Schaefer, C., Conteduca, D., Johnson, S., ... Quinn, S. D. (2022). Tween-20 induces the structural remodelling of single lipid vesicles. *BioRxiv*, 2022.03.01.482482.

<https://doi.org/10.1101/2022.03.01.482482>

- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 185–209. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYTO.42.040803.140421>
- Dyé, F., Berthelot, K., Griffon, B., Delay, D., & Delmotte, F. M. (1997). Alkylsyringamides, new inducers of *Agrobacterium tumefaciens* virulence genes. *Biochimie*, 79(1), 3–6. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(97\)87618-3](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(97)87618-3)
- Endo, T., Fujii, H., Omura, M., & Shimada, T. (2020). *Fast-track breeding system to introduce CTV resistance of trifoliolate orange into citrus germplasm , by integrating early flowering transgenic plants with marker- assisted selection*. 1–16.
- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T., & Omura, M. (2005). Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, 14(5), 703–712. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-6632-3>
- FAO. (2022). *Major Tropical Fruits: Preliminary results 2021*. Retrieved from <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CB9412EN/>
- FAOSTAT. (2021). Food and Agriculture Organization of the United Nations. In *FAOSTAT Statistical Database*. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gelvin, S. B. (2006). *Agrobacterium* virulence gene induction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 77–84. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:77>
- Greve, H. De, Leemans, J., Hernalsteens, J. P., Thia-toong, L., Beuckeleer, M. De, Willmitzer, L., ... Schell, J. (1982). Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* 1982 300:5894, 300(5894), 752–755. <https://doi.org/10.1038/300752a0>
- Grützner, R., Schubert, R., Horn, C., Yang, C., Vogt, T., & Marillonnet, S. (2021). Engineering Betalain Biosynthesis in Tomato for High Level Betanin Production in Fruits. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1070. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.682443/BIBTEX>
- Han, X., Ma, S., Kong, X., Takano, T., & Liu, S. (2013). Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Hybrid Poplar *Populus davidiana* Dode × *Populus bollena* Lauche. *International Journal of Molecular Sciences* 2013, Vol. 14, Pages 2515-2528, 14(2), 2515–2528.

<https://doi.org/10.3390/IJMS14022515>

He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., & Zhao, Y. (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture Research* 2020 7:1, 7(1), 1–6.

<https://doi.org/10.1038/s41438-020-00390-1>

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., & Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4691), 1229–1230. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.227.4691.1229>

Hosein, F. N., Lennon, A. M., & Umaharan, P. (2012). Optimization of an Agrobacterium-mediated transient assay for gene expression studies in anthurium andraeanum. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 137(4), 263–272. <https://doi.org/10.21273/jashs.137.4.263>

Hwang, H., Yu, M., & Lai, E. (2017). *Agrobacterium-mediated plant transformation : biology and applications*. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>

Joh, L. D., Wroblewski, T., Ewing, N. N., & VanderGheynst, J. S. (2005). High-level transient expression of recombinant protein in lettuce. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(7), 861–871. <https://doi.org/10.1002/BIT.20557>

Johnson, M. (2013). Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/MM.EN.3.163>

Jung, S. K., McDonald, K. A., & Dandekar, A. M. (2015). Effect of leaf incubation temperature profiles on agrobacterium tumefaciens-mediated transient expression. *Biotechnology Progress*, 31(3), 783–790. <https://doi.org/10.1002/btpr.2077>

Jung, S., & McDonald, K. A. (2016). *Improved Transient Production of a Cellulase Enzyme in Detached Sunflower Leaves Using Plant Hormones*. 732, 726–732. <https://doi.org/10.1007/s12257-016-0410-3>

Kimura, M., Cutler, S., & Isobe, S. (2015). A novel phenolic compound, chloroxynil, improves agrobacterium-mediated transient transformation in *Lotus japonicus*. *PLoS ONE*, 10(7), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131626>

Klocko, A. L., Ma, C., Robertson, S., Esfandiari, E., Nilsson, O., & Strauss, S. H. (2016). FT overexpression induces precocious flowering and normal reproductive development in *Eucalyptus*. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 808–819. <https://doi.org/10.1111/pbi.12431>

- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). The roles of bacterial and host plant factors in Agrobacterium-mediated genetic transformation. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(6–8), 467. <https://doi.org/10.1387/IJDB.130199BL>
- Li, S., Xu, B., Niu, X., Lu, X., Cheng, J., Zhou, M., & Hooykaas, P. J. J. (2021). JAZ8 Interacts With VirE3 Attenuating Agrobacterium Mediated Root Tumorigenesis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 2476. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.685533/BIBTEX>
- Lizamore, D., & Winefield, C. (2015). The addition of an organosilicone surfactant to Agrobacterium suspensions enables efficient transient transformation of in vitro grapevine leaf tissue at ambient pressure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(2), 607–615. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0627-9>
- Lu, J., Bai, M., Ren, H., Liu, J., & Wang, C. (2017). An efficient transient expression system for gene function analysis in rose. *Plant Methods*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13007-017-0268-1/FIGURES/9>
- Maeda, K., Kikuchi, T., Kasajima, I., Li, C., Yamagishi, N., Yamashita, H., & Yoshikawa, N. (2020). Virus-induced flowering by apple latent spherical virus vector: Effective use to accelerate breeding of grapevine. *Viruses*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/v12010070>
- Maeda, Kiyooki, Kikuchi, T., Kasajima, I., Li, C., Yamagishi, N., Yamashita, H., & Yoshikawa, N. (2020). Virus-induced flowering by apple latent spherical virus vector: Effective use to accelerate breeding of grapevine. *Viruses*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/v12010070>
- Mardanov, E. S., Blokhina, E. A., Tsybalova, L. M., Peyret, H., Lomonossoff, G. P., & Ravin, N. V. (2017). Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of potato virus X. *Frontiers in Plant Science*, 8(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00247>
- Martínez-Rodríguez, A., Guez, Cabrerizo-Vázquez, MA, Ichez, Hidalgo-Aacute, & R, Ivarez. (1997). A Comparative Study on the Adsorption of Triton X-100 and Tween 20 onto Latexes with Different Interfacial Properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 187(1), 139–147. <https://doi.org/10.1006/JCIS.1996.4681>
- Mortensen, S., Bernal-Franco, D., Cole, L. F., Sathitloetsakun, S., Cram, E. J., & Lee-Parsons, C. W. T.

- (2019). Easi transformation: An efficient transient expression method for analyzing gene function in *Catharanthus roseus* seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 10(June), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00755>
- Mourgues, F., Chevreau, E., Lambert, C., & De Bondt, A. (1996). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports* 1996 16:3, 16(3), 245–249. <https://doi.org/10.1007/S002990050216>
- Nonaka, S., Someya, T., Kadota, Y., Nakamura, K., & Ezura, H. (2019). Super-*Agrobacterium* ver. 4: Improving the Transformation Frequencies and Genetic Engineering Possibilities for Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01204>
- Norris, S. R., Meyer, S. E., & Callis, J. (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*, 21(5), 895–906. <https://doi.org/10.1007/BF00027120>
- Oa, R. O. V. C., & Lindbo, J. A. (2007). *TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus*. 145(December), 1232–1240. <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>
- OECD/FAO. (2021). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. *OECD Publishing*.
<https://doi.org/10.1787/19428846-EN>
- Osei, M. K., Asante, M. D., Agyeman, A., Adebayo, M. A., & Adu-Dapaah, H. (2014). *Plant Breeding: A Tool for Achieving Food Sufficiency*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06904-3_11
- Penninckx, A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., De Samblanx, G. W., Buchala, A., ... Broekaert, W. F. (1996). Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway. *The Plant Cell*, 8, 2309–2323. Retrieved from <https://academic.oup.com/plcell/article/8/12/2309/5985185>
- Petri, C., Albuquerque, N., Faize, M., Scorza, R., & Dardick, C. (2018). Current achievements and future directions in genetic engineering of European plum (*Prunus domestica* L.). *Transgenic Research*, 27(3), 225. <https://doi.org/10.1007/S11248-018-0072-3>
- Peyret, H., Brown, J. K. M., & Lomonossoff, G. P. (2019). Improving plant transient expression through the rational design of synthetic 5' and 3' untranslated regions. *Plant Methods*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/s13007-019-0494-9>

- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van Der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 2009 5:5, 5(5), 308–316.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pitzschke, A. (2013). Agrobacterium infection and plant defense-transformation success hangs by a thread. *Frontiers in Plant Science*, 4(DEC), 519. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00519/BIBTEX>
- Pliego-Alfaro, F., Palomo, E., Mercado, J., Pliego, C., Barcelo, A., Lopez, R., ... Litz, R. (2020). 12.1 Persea americana Avocado. In R. Litz & F. Pliego-Alfaro (Eds.), *Biotechnology of Fruit and Nut Crops, 2nd Edition* (2nd ed., pp. 258–281). Retrieved from <https://books.google.com/books?id=TrvTDwAAQBAJ&pg=PA258&lpg=PA258&dq=12.1+persea+americana+avocado+fernando+pliego-alfaro&source=bl&ots=BDceSkYBhe&sig=ACfU3U3jiUtto7RW-jVVS147cM8iv7An3w&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjqoLLe9L3wAhUJVN8KHfi5AmcQ6AEwEXoECAYQAw#v=>
- Polturak, G., & Aharoni, A. (2018). “La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments. *Molecular Plant*, 11(1), 7–22. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2017.10.008>
- Prabhu, S. A., Ndlovu, B., Engelbrecht, J., & Van Den Berg, N. (2017). Generation of composite Persea americana (Mill.) (avocado) plants: A proof-of-concept-study. *PLOS ONE*, 12(10), e0185896. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0185896>
- Prewitt, S. F., Shalit-Kaneh, A., Maximova, S. N., & Guiltinan, M. J. (2021). Inter-species functional compatibility of the Theobroma cacao and Arabidopsis FT orthologs: 90 million years of functional conservation of meristem identity genes. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02982-y>
- Ramkumar, T. R., Lenka, S. K., Arya, S. S., & Bansal, K. C. (2020). A Short History and Perspectives on Plant Genetic Transformation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2124, 39–68. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_3
- Saifi, S. K., Passricha, N., Tuteja, R., Kharb, P., & Tuteja, N. (2020). In planta transformation: A smart way of crop improvement. *Advancement in Crop Improvement Techniques*, 351–362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818581-0.00021-8>
- Schröpfer, S., Lempe, J., Emeriewen, O. F., & Flachowsky, H. (2022). Recent Developments and Strategies

- for the Application of Agrobacterium-Mediated Transformation of Apple *Malus × domestica* Borkh. *Frontiers in Plant Science*, 13, 2236. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.928292/BIBTEX>
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., & Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5795–5800. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0631579100>
- Simmons, C. W., Vandergheynst, J. S., & Upadhyaya, S. K. (2009). A model of Agrobacterium tumefaciens vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent in planta transgene transient expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 965–970. <https://doi.org/10.1002/BIT.22118>
- Somssich, M. (2019). *A Short History of the CaMV 35S Promoter 3*. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27096v3>
- Song, G., Prieto, H., & Orbovic, V. (2019). Agrobacterium-Mediated Transformation of Tree Fruit Crops: Methods, Progress, and Challenges. *Frontiers in Plant Science*, 0, 226. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00226>
- Song, G. Q., & Sink, K. C. (2006). Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 344, 263–272. <https://doi.org/10.1385/1-59745-131-2:263/FIGURES/1>
- Stachel, S. E., Nester, E. W., & Zambryski, P. C. (1986). A plant cell factor induces Agrobacterium tumefaciens vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(2), 379–383. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.2.379>
- Stachel, Scott E., Messens, E., Van Montagu, M., & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens. *Nature* 1985 318:6047, 318(6047), 624–629. <https://doi.org/10.1038/318624a0>
- Tamayo-Ramos, D. I., Salazar-González, J. A., Casson, S. A., & Urrea-López, R. (2022). Old and new horizons on *Persea americana* transformation techniques and applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S11240-022-02268-7/FIGURES/1>
- Uematsu, C., Murase, M., Ichikawa, H., & Imamura, J. (1991). Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of kiwi fruit. *Plant Cell Reports* 1991 10:6, 10(6), 286–290. <https://doi.org/10.1007/BF00193143>
- Velázquez, K., Agüero, J., Vives, M. C., Aleza, P., Pina, J. A., Moreno, P., ... Guerri, J. (2016). Precocious

- flowering of juvenile citrus induced by a viral vector based on Citrus leaf blotch virus: a new tool for genetics and breeding. *Plant Biotechnology Journal*, 14(10), 1976–1985.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12555>
- Verma, A., Nain, V., Kumari, C., Singh, S. K., Narasu, M. L., & Ananda Kumar, P. (2008). Tissue specific response of *Agrobacterium tumefaciens* attachment to *Sorghum bicolor* (L) Moench. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 14(4), 307–313.
- Viet, D., Reniel, C., Jiwon, S. P., Young, K., & Oh, K. (2017). Optimization of *Agrobacterium* -mediated transient expression of heterologous genes in spinach. *Plant Biotechnology Reports*, 11(6), 397–405.
<https://doi.org/10.1007/s11816-017-0457-4>
- Wixom, A. Q., Casavant, N. C., Kuhl, J. C., Xiao, F., Dandurand, L. M., & Caplan, A. B. (2018). *Solanum sisymbriifolium* plants become more recalcitrant to *Agrobacterium* transfection as they age. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102, 209–218.
<https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2018.03.004>
- Wötzel, S., Andrello, M., Albani, M. C., Koch, M. A., Coupland, G., & Gugerli, F. (2022). *Arabidopsis thaliana*: A perennial model plant for ecological genomics and life-history evolution. *Molecular Ecology Resources*, 22(2), 468–486. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13490>
- Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., ... Yoshikawa, N. (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopic expression of the *Arabidopsis thaliana* FT gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Molecular Biology*, 75(1), 193–204. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9718-0>
- ZHANG, X. ming, WU, Y. fei, LI, Z., SONG, C. bing, & WANG, X. ping. (2021). Advancements in plant regeneration and genetic transformation of grapevine (*Vitis* spp.). *Journal of Integrative Agriculture*, 20(6), 1407–1434. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63586-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63586-9)
- Zhang, Y., Tang, D., Lin, X., Ding, M., & Tong, Z. (2018). Genome-wide identification of MADS-box family genes in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and a functional analysis of PeMADS5 in flowering. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1394-2>
- Zheng, L., Yang, J., Chen, Y., Ding, L., Wei, J., & Wang, H. (2021). An improved and efficient method of *Agrobacterium syringae* infiltration for transient transformation and its application in the elucidation of

gene function in poplar. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02833-w>

Zhou, X., Carranco, R., Vitha, S., & Hall, T. C. (2005). The dark side of green fluorescent protein. *The New Phytologist*, 168(2), 313–322. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01489.X>

Zong, X., Chen, Q., Nagaty, M. A., Kang, Y., Lang, G., & Song, G. qing. (2018). Adventitious shoot regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf explants of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Https://Doi.Org/10.1080/14620316.2018.1470908*, 94(2), 229–236. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1470908>