



# **Eficiencia de la Transgénesis Transitoria en Genotipos de Soja Resistentes y Susceptibles a Sequía**

**María Belén Listur**

**Tutora: Dra. María Martha Sainz**

**Co-tutor: Mag. Esteban Casaretto**

**Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Agronomía- UdelaR**

**Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica**

**Montevideo, Uruguay 2020**

## Agradecimientos

A mi tutora Martita, por su guía, paciencia, disposición, y conocimiento brindado durante este proceso de tesis.

A Mariana, por su ayuda con el microscopio, y su disposición a responder mis dudas.

A Esteban, por su disposición ante mis pedidos.

A Laura, por su flexibilidad y disposición.

A todos mis compañeros de laboratorio, por la buena onda y apoyo constante.

A mis amigos y compañeros de la FCien, por estos años de remarla siempre para un mismo lado.

A mis amigas de toda la vida y a Cristian, por siempre apoyarme, confiar en mí, y darme para adelante.

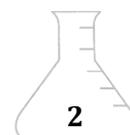
A mi familia, y en especial a mis padres y hermano, **por todo**.



1. Índice.....	1
2. Resumen.....	4
3. Introducción.....	6
3.1 Plantas Transgénicas.....	6
3.1.1 Métodos Directos.....	7
3.1.1.1 Biolística.....	7
3.1.1.2 Electroporación.....	8
3.1.1.3 Sonicación.....	9
3.1.1.4 Liposomas.....	9
3.1.1.5 Microinyección.....	10
3.1.2 Métodos indirectos.....	10
3.1.2.1 Vectores virales.....	10
3.1.2.2 Genero <i>Agrobacterium</i> .....	11
3.2 Transformación mediada por <i>A. rhizogenes</i> .....	15
3.3 Transformación de soja.....	17
4. Objetivos.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
5. Materiales y Métodos.....	22
5.1. Material vegetal.....	22
5.2. Cepa bacteriana.....	22
5.3. Transformación de <i>A. rhizogenes</i> y selección de colonias.....	23
5.3.1. Transformación por electroporación.....	23



5.3.2. Confirmación de la presencia del vector binario.....	23
5.3.3. Selección de la colonia efectiva.....	24
5.4. Transformación de soja mediada por <i>A. rhizogenes</i> .....	26
5.4.1. Diseño experimental y análisis estadístico.....	26
5.4.2. Cultivo de <i>A. rhizogenes</i> .....	27
5.4.3. Infección de las plántulas, aparición y crecimiento de <i>hairy-roots</i> .....	27
5.4.4. Identificación de raíces transgénicas.....	29
5.4.5. Cuantificación de la eficiencia de transformación.....	29
5.5. Extracción de ADN genómico de las <i>hairy-roots</i> .....	29
5.6. Amplificación por PCR de los genes <i>rolB</i> , <i>virD</i> , <i>egfp</i> .....	30
5.7. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa.....	31
5.8. <i>Análisis Western blot</i> .....	32
5.8.1. Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	32
5.8.2. SDS-PAGE.....	32
5.8.3. Transferencia de proteínas a membrana.....	33
5.8.4. Inmunodetección de GFP.....	33
5.9. Herramientas informáticas.....	34
6. Resultados.....	35
6.1. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	35
6.1.1. Verificación de la presencia del vector binario.....	35
6.1.2. Selección de la colonia efectiva.....	36
6.2. Soja.....	37



6.2.1. Cinética del proceso de aparición de <i>hairy-roots</i> .....	37
6.2.2. Identificación de raíces transgénicas mediante microscopía.....	42
6.2.3. Eficiencia de transformación.....	44
6.2.4. Análisis <i>Western blot</i> para la confirmación de las raíces transgénicas.....	47
6.2.5. Análisis de la transformación mediante PCR (genes <i>rolB</i> , <i>virD</i> y <i>egfp</i> ).....	49
7. Discusión.....	51
7.1. Importancia de seleccionar la colonia efectiva. ....	51
7.2. Análisis de la cinética del proceso de aparición de <i>hairy-roots</i> y su relación con la eficiencia de transformación. ....	53
7.3. Re-confirmación del material transgénico.....	56
8. Conclusiones.....	60
9. Anexo.....	61
10. Bibliografía.....	62



## 2. Resumen

La soja es un cultivo de gran importancia en el Uruguay, siendo el principal cultivo agrícola desde el año 2010. La generación de plantas transgénicas es una herramienta útil para el estudio de dicho cultivo. La bacteria patógena *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) tiene la capacidad de transferir e integrar en el genoma de su hospedero genes contenidos dentro de su ADN de transferencia (ADN-T), que al expresarse inducen la formación de raíces (*hairy-roots*). Debido a que sólo las secuencias borde del ADN-T son requeridas para que la transferencia ocurra, se puede utilizar un sistema de vectores binarios para introducir un gen(es) al genoma del hospedero. La transformación mediada por *A. rhizogenes* es un tipo de transformación transitoria, donde se obtienen plantas compuestas con la raíz transgénica y la parte aérea silvestre. En los ensayos de transformación de soja es deseable que el genotipo a transformar comience a generar raíces a los pocos días de la infección, que genere muchas *hairy-roots* y que tenga una alta eficiencia de transformación. En particular, la cinética del proceso de aparición de las raíces, que estaría relacionado con la susceptibilidad del genotipo a la transformación, no ha sido, hasta el momento, caracterizado en detalle. En este trabajo nos propusimos poner a punto la técnica de transformación mediada por *A. rhizogenes* en el genotipo de referencia para la técnica (Thorne) y en dos genotipos de importancia agronómica (SO7\_6557 y TJS2049). Para los tres genotipos, se determinó la eficiencia de transformación y se analizó la cinética de aparición de *hairy-roots*. La cepa K599 de *A. rhizogenes* fue transformada con el vector pK7GWIWG2D(II),0 que contiene el gen reportero GFP. La infección se realizó por medio de una herida en el hipocótilo de plántulas de 5 días, sobre la cual se colocó la bacteria. Entre los días 8 y 18 post-infección se monitoreó la aparición de raíces con el fin de conocer la cinética del proceso. Entre los días 15-18 se cortaron las *hairy-roots* originadas a partir del sitio de infección y se identificaron las raíces positivas, transformadas, mediante microscopía. Los resultados mostraron que la cinética del proceso de aparición de *hairy-roots* presenta tres “etapas o fases”, pero no se encontraron diferencias significativas entre genotipos en las variables analizadas. Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de transformación de los genotipos. Por tanto, no se pudo establecer una relación entre las variables evaluadas durante el análisis de la cinética de aparición de raíces y las eficiencias de transformación.

**Palabras clave:** transformación transitoria; soja; *A. rhizogenes*; hairy-roots



## 3. Introducción

### 3.1. Plantas transgénicas

El incremento constante de la población y urbanización han tenido como consecuencia la pérdida de tierras de uso agrícola, el aumento en la demanda de recursos alimentarios y de materias primas. Según la FAO (2018), para el año 2050 la población mundial alcanzará los 9,7 mil millones, un 32% más que la población mundial en el 2015. La urbanización continuará creciendo, y alrededor de dos tercios de la población mundial será urbana. Para alimentar a esta población más grande y más urbana se necesitará aumentar la producción y optimizar aspectos tecnológicos.

El mejoramiento de los cultivos para aumentar la producción se ha realizado a través de selección por miles de años previo a la creación de los transgénicos. Desafortunadamente, la selección y la cruce controlada de ejemplares con características de interés solo ha podido resolver la demanda de manera parcial, por lo que se espera que la implementación de herramientas y estrategias moleculares sumada a los métodos empleados tradicionalmente, permita obtener plantas con una mayor productividad y calidad y nuevos productos agrícolas (Quiroz-Chávez et al., 2012; Jhansi Rani and Usha, 2013).

Las plantas genéticamente modificadas o transgénicas se generan alterando el genoma (introduciendo, eliminando o silenciando un gen o grupo de genes de interés) utilizando la tecnología de ADN recombinante (Moeller and Wang, 2008). La transferencia de genes deseados dirigida de un organismo a otro y la posterior integración estable y expresión de dichos genes en el genoma se conoce como “transformación genética”. El gen o los genes transferidos son conocidos como transgen(es). Estos pueden ser endógenos modificados o genes foráneos aislado de grupos filogenéticos variados (Keshavareddy et al., 2018).

El propósito de insertar un gen o una combinación de genes en una planta es hacerla lo más útil y productiva posible. Este proceso proporciona ventajas como mejorar la vida útil, mayor rendimiento, mejor calidad, resistencia a las plagas, resistencia a temperaturas extremas y a la sequía, entre otras. Además, las plantas transgénicas se pueden emplear



con el fin de que expresen proteínas con fines terapéuticos y farmacéuticos (Cramer et al., 1999; Beltrán, 2005; Jhansi Rani and Usha, 2013).

La generación de plantas transgénicas es un procedimiento complejo que consta de varias etapas: primero se suministra ADN exógeno a la célula huésped; segundo, el ADN exógeno se integra de manera estable en el genoma de la célula huésped dando como resultado la expresión adecuada del gen; tercero, se regenera una planta transgénica viable (Darbani et al., 2008).

A la hora de producir dichas plantas se deben tener en cuenta los siguientes requisitos: un tejido diana con células competentes para la regeneración de la planta, un método para introducir ADN exógeno en esas células con potencial de regeneración y, un procedimiento para seleccionar y regenerar plantas transformadas con una frecuencia satisfactoria. Por otra parte, es deseable que la técnica seleccionada sea simple, implicando un mínimo número de manipulaciones, que genere transformantes estables y uniformes (no quiméricos) para la propagación vegetativa de especies, y que permita obtener patrones de integración simples y bajo número de copias, para minimizar el probabilidad de disrupción genética no deseada en sitios de inserción o multicopia asociada al silenciamiento transgénico (Keshavareddy et al., 2018).

Actualmente existen numerosos métodos de transformación disponibles, desarrollados con el fin de transformar satisfactoriamente una amplia variedad de plantas. Estos métodos se pueden dividir en dos grupos principales: directos e indirectos, de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia del material genético hacia la célula vegetal. Los métodos directos emplean procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica y mecánica (Rao et al., 2009; Granados and Chaparro-Giraldo, 2012). Los métodos indirectos se basan en la utilización de vectores biológicos, empleando sus características naturales de patogenicidad en plantas, para la introducción de los genes de interés.

### **3.1.1. Métodos directos**

#### **3.1.1.1. Biolística**



Esta técnica consiste en recubrir microportadores (partículas de oro o tungsteno de 0.5 - 5.0  $\mu\text{m}$ ; Sharma et al., 2005) con el ADN de interés mediante precipitación con cloruro de calcio y espermidina (Kikkert et al., 2005). Luego, estas partículas son disparadas a velocidades supersónicas hacia la célula blanco utilizando una pistola génica o equipo de biolística. Una vez dentro de la célula, el ADN se eluye de los microportadores. Una fracción de las moléculas de ADN podría alcanzar el núcleo e incorporarse de forma estable en un cromosoma de la célula huésped. Por otro lado, el ADN puede permanecer extra cromosómico en el núcleo y expresarse en forma transitoria (Kikkert et al., 2005).

La biolística ha sido utilizada con éxito en una amplia gama de especies vegetales incluso en algunas recalcitrantes tanto a la transformación con *Agrobacterium* como a otros métodos de transferencia directa (Kikkert et al., 2005; Barampuram and Zhang, 2011). Las principales ventajas de este sistema es que es independiente de la especie y genotipo y que no necesita vectores especializados para introducir el ADN, ya que pueden emplearse construcciones de plásmidos circulares, lineales, o un cassette de expresión lineal (Keshavareddy et al., 2018). Asimismo, esta estrategia se ha empleado, junto con la microinyección, para la transformación de cloroplastos (Maliga, 2004). La principal desventaja del método es que da como resultado patrones de integración complejos con múltiples copias o incluso concatémicos (repeticiones en tándem del transgen) en los sitios de integración, pudiendo generar silenciamiento génico o variación en la expresión del transgen (Darbani et al., 2008). Además, su uso está limitado por la capacidad de regeneración del tejido que se bombardea y la eficiencia de la integración estable del ADN (Stewart et al., 2011).

### 3.1.1.2. Electroporación

La electroporación consiste en aumentar la permeabilidad de las membranas mediante un aumento significativo de la conductividad eléctrica causado por la aplicación de un pulso eléctrico (Krassowska and Filev, 2007). Este pulso provoca la formación de poros transitorios en las membranas que permiten el paso de macromoléculas, fuga de iones, escape de metabolitos y mayor absorción de ADN por parte de las células (Krassowska and Filev, 2007). La electroporación se lleva a cabo en un dispositivo llamado electroporador, en el cual las células son tratadas con impulsos eléctricos controlados de



alto voltaje y pulsos cortos de duración de microsegundos a milisegundos, utilizando campos entre los 200 V/cm hasta los 600 V/cm (Granados and Chaparro-Giraldo, 2012). La absorción del ADN puede conducir a una expresión estable o transitoria del ADN (Stewart et al., 2011). El método se aplicó originalmente a protoplastos de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y se ha aplicado también a células e incluso tejidos (Stewart et al., 2011).

### **3.1.1.3. Sonicación**

Esta técnica, que se basa en el uso de ultrasonido con frecuencias superiores a 20 KHz (Yoon and Park, 2010), está diseñada para aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática de forma transitoria, para facilitar la absorción de ADN y otras macromoléculas. El mecanismo por el cual ocurre la permeabilización de las membranas por la acción de ultrasonido no se ha dilucidado por completo. Se cree que el mayor efecto de la sonicación es debido a la cavitación acústica (Liu et al., 2006). Existen dos posibilidades que explican cómo se aumenta la permeabilidad: primero debido al violento colapso de las burbujas de cavitación, generando alta presión y ondas de choque a alta temperatura que posiblemente podrían causar la ruptura localizada de la membrana plasmática y conducen a la absorción de solutos exógenos seguidos de un restablecimiento de la integridad de la membrana. La segunda posibilidad se origina en el modelo electromecánico presentado por Zimmermann et al., (1974) que sugiere la existencia de una presión hidrostática crítica a la cual el potencial intrínseco de la membrana es suficientemente alto para inducir la ruptura mecánica de la membrana. Se ha reportado que el ultrasonido media la absorción de genes en protoplastos de plantas, células en suspensión y tejidos (Liu et al., 2006).

### **3.1.1.4. Liposomas**

Los liposomas son moléculas lipídicas circulares con un interior acuoso capaz de transportar fragmentos de ADN y ARN. El modo por el cual el ADN ingresa a la célula aún no está claro, si bien la fusión se acepta como el medio más probable de entrega (Gad et al., 1990). Las células diana apropiadas para este tipo de transformación son los protoplastos por su falta de pared celular (Gad et al., 1990). También se han logrado



transformar granos de polen y células con heridas en su membrana plasmática (Gad et al., 1990). La transformación mediada por liposomas, a pesar de los bajos gastos y pocos requisitos de equipamiento, está lejos de ser rutinaria debido a su laboriosidad y baja eficiencia (Rao et al., 2009).

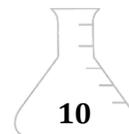
### **3.1.1.5. Microinyección**

La técnica se basa en la introducción de ADN en el núcleo o en el citoplasma de las células mediante el uso de una pipeta de inyección con capilar de vidrio (Morikawa and Yamada, 1985). Requiere el uso de micro manipuladores, que constan de un microscopio óptico y sus accesorios (Granados and Chaparro-Giraldo, 2012). Durante la introducción del ADN, las células se inmovilizan en agar de bajo punto de fusión con una pipeta de retención y de succión, y posteriormente el ADN se inyecta en el citoplasma o en el núcleo (Barampuram and Zhang, 2011). En plantas esta técnica ha tenido poco éxito debido a las gruesas paredes celulares y a la falta de disponibilidad de un sistema de regeneración de célula a planta en la mayoría de las especies (Rao et al., 2009).

### **3.1.2. Métodos indirectos**

#### **3.1.2.1. Vectores virales**

Esta técnica se basa en la introducción de un virus con un gen de interés quien, al entrar a la planta huésped, se replicará y posteriormente la proteína de interés será producida en cantidades significativas. Existen dos estrategias empleadas para la construcción de vectores virales (Gleba et al., 2004, 2007). En la primera, llamada “virus completo”, el suministro de amplicones se logra infectando al huésped con una partícula viral madura o con una molécula de ADN/ARN que contiene una copia completa del vector viral (Gleba et al., 2004). Esta estrategia tiene las siguientes desventajas: las inserciones mayores a 1 Kb generalmente no se pueden expresar, la infección progresa a diferentes velocidades y el vector suele ser inestable por lo que muchos tejidos infectados no expresan la proteína de interés (Gleba et al., 2007). En la segunda estrategia, llamada “virus deconstruido”, el virus es completamente reconstruido, eliminando o sustituyendo regiones



virales, manteniendo los elementos virales necesarios para la expresión eficiente, y reemplazando las funciones faltantes utilizando componentes no virales (Gleba et al., 2004, 2007). Las desventajas de este enfoque es que algunas maquinarias resultantes suelen ser bastante ineficientes, que la capacidad del virus para moverse sistémicamente suele ser específica de los tejidos y especies, y que se deteriora fácilmente debido a la manipulación genética (Gleba et al., 2007). El uso de vectores da como resultado la expresión de proteínas de forma transitoria, es decir, no forma un rasgo heredable ya que el gen no se incorpora en el genoma de la planta (Gleba et al., 2007).

### 3.1.2.2. Género *Agrobacterium*

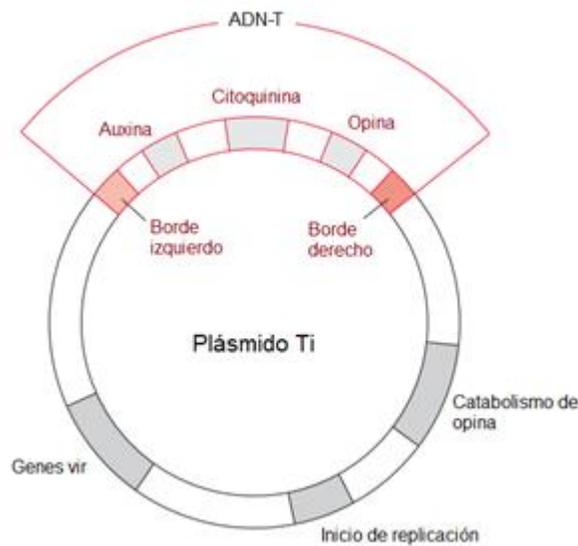
El género *Agrobacterium* es utilizado como mediador para la introducción de genes de interés en plantas debido a su capacidad y eficiencia para infectar diversos organismos vegetales (Hellens et al., 2000; Tzfira et al., 2004). La transformación mediada por *Agrobacterium* marcó el inicio de la era moderna de la biotecnología vegetal en 1983, cuando tres grupos de investigadores obtuvieron plantas transformadas (Vasil, 2008). El género *Agrobacterium* fue creado por Conn (1942) quien lo incluyó dentro de la familia *Rhizobiaceae* junto con el género *Rhizobium* (Flores-Félix et al., 2019). En la actualidad, el género contiene 14 especies, incluyendo las especies *Agrobacterium rhizogenes* (*A. rhizogenes*) causante de la enfermedad de las raíces velludas y *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) causante de la enfermedad agalla de la corona (Flores-Félix et al., 2019).

La infección por *Agrobacterium* en una planta es el resultado de un proceso de evolución altamente especializado: la transferencia horizontal de genes desde bacterias hacia plantas (Granados and Chaparro-Giraldo, 2012). Hasta la fecha, la comprensión básica de los mecanismos moleculares de la transformación genética de plantas por los miembros del género *Agrobacterium* se basa en extensos estudios realizados en *A. tumefaciens*, si bien se considera que el proceso general de infección es similar entre *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* (Veena and Taylor, 2007).

Los componentes genéticos portados por *A. tumefaciens* requeridos para la transformación de plantas incluyen: 1) el ADN de transferencia (ADN-T), que se transfiere a la célula vegetal, 2) la región de virulencia (*vir*) del plásmido inductor de tumores (Ti), 3) los loci *chvA*, *chvB* y *pscA*, esenciales para el proceso de transferencia y cuya expresión es



constitutiva en contraste con la región *vir* (Ziemienowicz, 2014). El ADN-T se encuentra en el plásmido Ti, y contiene dos tipos de genes: genes oncogénicos, que codifican enzimas involucradas en la síntesis de auxinas y citoquininas (que causan la formación de tumores), y genes involucrados en la producción de opinas (Barampuram and Zhang, 2011) (Figura 1). El ADN-T está flanqueado por dos repeticiones directas de 25 pb, llamadas borde izquierdo (BI) y borde derecho (BD), que actúan como una señal de elemento *cis* para la transferencia del ADN-T (Zupan et al., 2000) (Figura 1). Los genes *vir* se encuentran fuera del ADN-T en el plásmido Ti (Figura 1). Estos genes están organizados en varios operones (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*). Los otros operones necesarios para la transformación (*chvA*, *chvB* y *pscA*) son cromosómicos (Ziemienowicz, 2014).



**Figura 1. Representación esquemática del plásmido Ti.** Se indican las secuencias borde, delimitando el ADN-T y los genes que contiene (en rojo). Las regiones restantes del plásmido (en gris) incluyen los genes *vir*, los genes para el catabolismo de opina y el inicio de la replicación (Adaptado de Heldt and Piechulla, 2011).

El mecanismo de transferencia de genes de *A. tumefaciens* a las células vegetales implica varios pasos que incluyen: la colonización bacteriana, la inducción del sistema de virulencia bacteriana, la generación del complejo de transferencia de ADN-T, la transferencia del ADN-T y la integración del ADN-T en el genoma de la planta (Ziemienowicz, 2014). Antes de iniciarse la transferencia, las bacterias se adhieren a las

células vegetales dañadas gracias a la biosíntesis de un polisacárido extracelular denominado polisacárido unipolar, fibras de celulosa y otros compuestos (Hwang et al., 2017). El proceso de transferencia del ADN-T se inicia cuando *Agrobacterium* percibe ciertos compuestos fenólicos y azúcares provenientes de las células vegetales heridas (Winans, 1992; Bourret and Silversmith, 2010). Estos compuestos fenólicos sirven como inductores (o co-inductores) de los genes *vir* (Gelvin, 2000). Las sustancias fenólicas como la acetosiringona y compuestos relacionados se perciben a través de la proteína sensorial VirA, que en coordinación con el transportador de monosacáridos ChvE, inducen la autofosforilación de VirA, que posteriormente activa mediante fosforilación a la proteína VirG (Gelvin, 2003; Krenek et al., 2015). Finalmente, la proteína VirG activada actúa como factor de transcripción induciendo la transcripción de los genes *vir* (Krenek et al., 2015). La expresión de los genes de virulencia conduce a la producción de un ADN-T monocatenario, denominado cadena T, que luego se transporta a la célula huésped. Las proteínas VirD1 y VirD2 tienen un papel esencial en este paso, al reconocer las secuencias BI y BD del ADN-T y cortar los extremos de la hebra, gracias a su actividad endonucleasa (Gelvin, 2003). Este proceso da como resultado la generación de moléculas de cadena T unidas covalentemente a VirD2 en el extremo 5' del BD. Luego, la cadena T junto con varias proteínas *vir* se exportan al citoplasma de la célula huésped a través del aparato de exportación de tipo IV formado por VirD4 y varias proteínas VirB (Hwang et al., 2017). A este conjunto formado por la cadena T, VirD2 y VirE2 se le conoce como complejo T (Gelvin, 2000). Las proteínas VirD2 y VirE2 contienen secuencias de localización nuclear activas en la planta, las cuales se cree que están involucradas en la importación de ADN-T al núcleo (Hwang et al., 2017); además, se sabe que hay varias proteínas vegetales que participan con VirD2 y VirE2 en este proceso (Krenek et al., 2015). Luego, el complejo T ingresa al núcleo celular mediante un mecanismo activo mediado por la maquinaria de importación nuclear de la célula huésped (Barampuram and Zhang, 2011). Esto facilita la integración de la cadena T en el genoma en posiciones aleatorias mediante un proceso de recombinación no homóloga (Barampuram and Zhang, 2011).

*A. tumefaciens* es capaz de transformar numerosas células huésped, entre las que se incluyen plantas dicotiledóneas y algunas especies de angiospermas monocotiledóneas y gimnospermas (DeCleene and DeLey, 1976). Este método presenta varias ventajas sobre otros métodos de transformación ya que es fácil de usar, relativamente económico y



generalmente da como resultado un bajo número de copias e inserciones de ADN (Travella et al., 2005; Zhang et al., 2005; Gao et al., 2008). Sin embargo, muchas especies tales como especies forestales utilizadas para la producción de madera, papel y pulpa no son susceptibles a este tipo de transformación (Gelvin, 2003). Si bien en las últimas décadas se ha avanzado en la tecnología de cultivo de tejidos y en la comprensión del mecanismo de transferencia, la base molecular y genética para el rango de huéspedes de una cepa de *Agrobacterium* dada sigue sin estar clara (Keshavareddy et al., 2018). Además, otros factores tales como el vector plasmídico, composición del medio de cultivo, daño tisular, supresión o eliminación de la infección por *Agrobacterium* después del co-cultivo, afectan la transferencia e integración del ADN-T (Ziemienowicz, 2014).

Para utilizar *A. tumefaciens* como vector para generar plantas transgénicas, se emplean cepas desarmadas, es decir, aquellas a las que se les ha eliminado los oncogenes del ADN-T salvaje. El gen de interés y los marcadores de selección pueden introducirse dentro del ADN-T del plasmido Ti, o colocarlos en un sistema vectores binarios. Debido a que el plasmido Ti es grande y generalmente tiene un número de copias bajo, resulta difícil su aislamiento y clonación (Gelvin, 2003; Hwang et al., 2017). Por este motivo se opta por utilizar un sistema de vectores binarios, que consiste en introducir dentro de la cepa de *Agrobacterium* un vector que contenga el gen de interés y el marcador de selección flanqueado entre las secuencias BI y BD. Como los genes *vir* presentes en el plasmido Ti actúan en *trans* reconociendo los BI y BD sin discriminar su naturaleza, no es necesario que los genes de interés se encuentren dentro del ADN-T del plásmido bacteriano (Gelvin, 2003; Hwang et al., 2017).

Las estrategias de transformación mediadas por *Agrobacterium* se pueden dividir en aquellas que requieren cultivo *in vitro* de tejidos y aquellas en las que la transformación ocurre en plantas enteras (Keshavareddy et al., 2018). Las primeras se basan en la selección de explantes adecuados, la inoculación de éstos con *Agrobacterium*, el co-cultivo explante-*Agrobacterium*, la posterior eliminación de la bacteria, la selección de los explantes transformados y por último la posterior regeneración a planta completa (Charity et al., 2005; Hiei and Komari, 2006). La transformación de plantas enteras es un método alternativo, que tiene como ventajas una menor mano de obra, un período de tiempo más corto, menores posibilidades de contaminación y variación somaclonal (Hwang et al., 2017; Keshavareddy et al., 2018). Enfoques como la agroinfiltración (Wroblewski et al., 2005;

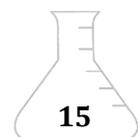


Tague and Mantis, 2006) y la inmersión floral emplean esta estrategia (Clough and Bent, 1998).

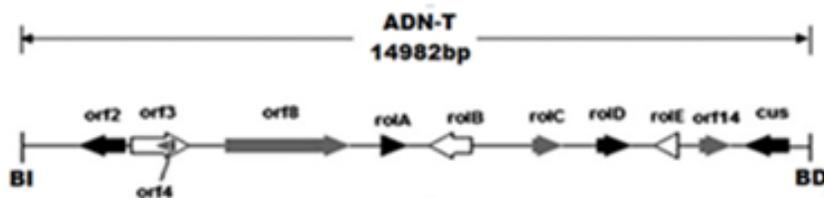
### 3.2. Transformación mediada por *Agrobacterium rhizogenes*

*A. rhizogenes* se identificó por primera vez hace más de 70 años como el agente causante de la enfermedad de la raíz velluda, o también conocida por su sigla en inglés *hairy-root* (Hildebrand, 1939). Es una bacteria Gram negativa en forma de bastón, no esporulada, que puede presentarse individualmente o en pares y que es móvil por medio de uno a seis flagelos peritricos (Ozyigit et al., 2013). Todas las cepas de *A. rhizogenes* se caracterizan por la presencia del plásmido inductor de raíces (Ri) (Gelvin, 2003; Veena and Taylor, 2007), cuyo ADN-T contiene los oncogenes *rol*, implicados en el inicio y desarrollo de la enfermedad, y genes esenciales para la biosíntesis de opinas (Hansen et al., 1994). Las *hairy-roots* son órganos completamente funcionales que se caracterizan por un crecimiento plagiotrópico, un alto grado de ramificación lateral y una profusión de pelos radiculares (Balandrin et al., 1985; Flores et al., 1999). Una de las características importantes de las raíces inducidas por *A. rhizogenes* es su capacidad para crecer *in vitro* en ausencia de fitohormonas (Rao and Ravishankar, 2002).

El rango de hospederos naturales de *A. rhizogenes* parece estar restringido a un número bajo de especies de plantas como manzana, pepino, tomate o melón. No obstante, bajo condiciones de laboratorio más de 450 especies diferentes de plantas pueden ser susceptibles a la infección por *A. rhizogenes* (Porter and Flores, 1991), incluida una amplia gama de dicotiledóneas y familias de plantas monocotiledóneas (DeCleene and DeLey, 1981; Tepfer et al., 1989) y algunas gimnospermas (Diouf et al., 1995; Yibrah et al., 1996). Distintos tejidos y órganos vegetales como el hipocótilo, la hoja, el tallo, el pecíolo, el cotiledón, entre otros, han demostrado ser susceptibles a la infección y transformación por *A. rhizogenes*, con la producción resultante de *hairy-roots* (Mugnier, 1988; Królícka et al., 2001; Jualang Azlan et al., 2002). Cabe señalar que las respuestas varían dependiendo de la cepa de *A. rhizogenes* que se utilice (ya que cada una cuenta con un rango de hospederos), su interacción con la especie vegetal y el tipo de tejido (Veena and Taylor, 2007; Bahramnejad et al., 2019).



El mecanismo por el cual se generan las *hairy-roots* puede dividirse en cuatro pasos: 1) activación del sistema de virulencia bacteriano, 2) procesamiento del ADN-T, 3) movimiento del ADN-T desde la bacteria a la célula hospedera, 4) inducción de la formación y crecimiento de la raíz (Veena and Taylor, 2007). Se conoce que los primeros tres mecanismos son muy similares a los de *A. tumefaciens* debido al alto grado de homología entre los plásmidos Ri y Ti (Ozyigit et al., 2013). Sin embargo, el mecanismo por el cual se forman las *hairy-roots* no está completamente dilucidado hasta el momento (Veena and Taylor, 2007). Diversos estudios han evidenciado que los genes *rol* presentes en el ADN-T (Figura 2) son los responsables de los rasgos característicos de las raíces transformadas, como el rápido crecimiento plagiotrópico con un aumento de la ramificación lateral y el crecimiento independiente de fitohormonas (Bahramnejad et al., 2019). Se presume que los genes *rol* alteran las características fisiológicas y bioquímicas de las plantas al alterar la percepción hormonal (Bahramnejad et al., 2019). Algunas cepas contienen además en el ADN-T genes que están involucrados en la biosíntesis de auxina. Se ha propuesto que estos genes proporcionan las auxinas necesarias para que los genes *rol* induzcan la formación de raíces (Cardarelli et al., 1985), y que además serían necesarios para extender el rango de hospedadores de la bacteria (Ozyigit et al., 2013).



**Figura 2. Componentes del ADN-T de la cepa K599 de *A. rhizogenes*.** Se indican los oncogenes *rolA*, *rolB*, *rolC* y *rolE*, marcos de lectura abiertos (*orf*) y el gen implicado en la síntesis de cucumopina (*cus*) (Adaptado de Xiang et al., 2016).

Al igual que *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* puede ser empleado como vector biológico para introducir genes exógenos en células vegetales. El plásmido Ri se emplea sin eliminar los oncogenes específicos del ADN-T cuando se quiere inducir las *hairy-roots* (Bahramnejad et al., 2019). La introducción de un vector binario en una cepa de *A.*

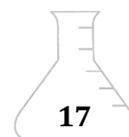
*rhizogenes* que porta un plásmido Ri eventualmente conducirá a la co-transformación de la planta huésped con el ADN-T de ambos vectores, es decir, el ADN-T del plásmido Ri y el ADN-T del vector binario, dando como resultado *hairy-roots* que pueden o no contener el transgen (Cho et al., 2000).

Las *hairy-roots* son una gran herramienta ya que se pueden utilizar para determinar el patrón de expresión de promotores (Isayenkov et al., 2005), localización subcelular de proteínas (Marjamaa et al., 2006), inducir silenciamiento de genes (Robert et al., 2018), estudiar interacciones raíces-rizobios (Estrada-Navarrete et al., 2006), raíces-hongos (Mugnier, 1988) y nemátodos (Morriss et al., 2017). Además de sus usos en investigación, son empleadas para producción de metabolitos secundarios (Georgiev et al., 2012) y fitorremediación (Guillon et al., 2006).

### 3.3. Transformación de soja

La soja [*Glycine max* (L.) Merrill] es, a nivel mundial, el principal cultivo económico de semillas oleaginosas (Manavalan et al., 2009). Este cultivo se emplea para diversos usos, como alimenticios, nutricionales, industriales y farmacéuticos. Las semillas de soja contienen aproximadamente 40% de proteína y 20% de aceite en base seca (Manavalan et al., 2009; Yamada et al., 2011). Además, son una fuente de macronutrientes, minerales, metabolitos secundarios tales como isoflavonas (Sakai and Kogiso, 2008), saponinas, ácido fítico, oligosacáridos (Liener, 1994) y fitoestrógenos (Ososki and Kennelly, 2003). En nuestro país es el principal cultivo agrícola desde el año 2010; su área de cultivo ha crecido constantemente en los últimos años situándose, actualmente, en más de un millón de hectáreas (DIEA 2016).

Existen genotipos de soja que, por selección, mejoramiento y/o transformación genética, presentan características específicas como resistencia a herbicidas, a plagas o con una respuesta diferencial al déficit hídrico. En particular, en nuestro laboratorio se han caracterizado genotipos que presentan una respuesta rápida a dicho estrés a los que llamamos “susceptibles” y genotipos que responden de forma más lenta cuando se encuentran en una condición de déficit hídrico a los que llamamos “resistentes”. La diferencia entre los genotipos en la respuesta implica que, frente a una condición de déficit hídrico, aquel de respuesta lenta no presenta a nivel metabólico y/o fisiológico cambios

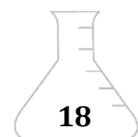


fenotípicos evidentes que indiquen una percepción clara del estrés en las primeras etapas de imposición del mismo; por el contrario, aquel de respuesta rápida presenta, en esa misma situación de estrés, cambios que evidencian una respuesta a esa condición de déficit hídrico.

Debido a su importancia, durante la última década la soja modificada genéticamente ha seguido siendo el cultivo biotecnológico más comercializado (Jia et al., 2015). A nivel internacional se han desarrollado bases de datos con una gran disponibilidad de información genómica y transcriptómica. Su genoma se encuentra completamente secuenciado, anotado y disponible en bases de datos tales como: Phytozome, SoyKb y Soybase (<http://phytozome.org/>; <http://soykb.org/>; <http://soybase.org/>). Además, se han desarrollado varios recursos entre los que se encuentran una base de datos de secuencias nucleotídicas expresadas (ESTs, de “*expressed sequence tags*”), de ADN copia de longitud completa y de microarreglos de ADN copia (Stacey et al., 2008; Umezawa et al., 2008). Estos recursos brindan una variedad de oportunidades para el mejoramiento de la soja mediante distintos enfoques genéticos.

La transformación genética de la soja ha sido un desafío debido a la variabilidad genética de los cultivares, a las diferencias en sus respuestas al cultivo *in vitro* y a procedimientos de transformación (Droste et al., 2000). Los métodos que han resultado ser más exitosos para la generación de plantas transformadas de forma estable son el bombardeo de partículas donde se utilizan embriones somáticos inducidos a partir de cotiledones inmaduros y la transformación mediante *A. tumefaciens* donde se emplean mayormente explantes de nodos cotiledonarios de plántulas jóvenes y semillas maduras embebidas (Yamada et al., 2011). Sin embargo, estas técnicas de transformación requieren de un intenso trabajo y son demasiado ineficiente para ser utilizadas a gran escala.

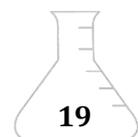
Cuando se está trabajando en biología de raíz, ya sea estudiando la función de genes relacionados a ella, con interacciones simbióticas y patogénicas, con absorción de nutrientes o transporte de hormonas, se puede hacer uso de la transformación mediada por *A. rhizogenes* (Kereszt et al., 2007). Para este tipo de abordaje se utiliza el "sistema de plantas compuestas" que fue desarrollado por Hansen et al., (1989) y que consiste en la obtención de una planta con la parte aérea salvaje y con las raíces transgénicas (Collier et al., 2005). Una de las ventajas más importante de esta técnica es la capacidad de generar información a nivel de toda la planta, en comparación con raíces crecidas en cultivos *in*



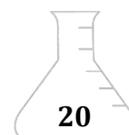
*vitro*, lo cual permite realizar un análisis funcional. Las plantas compuestas generadas de esta manera se pueden trasplantar y cultivar con éxito en el suelo o en hidroponia, según se desee. Al eliminar el componente de cultivo de tejidos, que sí requiere la transformación vía *A. tumefaciens*, el método se simplifica enormemente en cuanto a costos e infraestructura requerida. Además, este sistema reduce significativamente el tiempo necesario para generar raíces genéticamente transformadas de varios meses a pocas semanas, si se lo compara con la generación de plantas transgénicas mediada por *A. tumefaciens* (Veena and Taylor, 2007).

El método consiste en generar una herida en el nodo cotiledonario y/o en la región proximal del hipocótilo y, posteriormente, colocar sobre dicha herida alguna cepa hipervirulenta de *A. rhizogenes* transformada previamente con la construcción de interés. En particular, la cepa K599 ha demostrado ser muy efectiva en la generación de *hairy-roots* en soja (Savka et al., 1990). Después de 2-3 semanas de la infección, cuando las *hairy-roots* se han desarrollado a partir del sitio de infección y alcanzado una longitud de 5-10 cm, la raíz principal de la planta se elimina cortando el hipocótilo justo por debajo del sitio de infección y las plantas compuestas pueden utilizarse para realizar los análisis deseados (Kereszt et al., 2007). Hay dos aspectos metodológicos del proceso antes mencionado que son muy relevantes si se quiere lograr una alta eficiencia de transformación. Uno es que las plántulas a infectar presenten los cotiledones verdes y sin separar y el otro es mantener durante el período de generación de las *hairy-roots* niveles altos de humedad (al menos 85%) en el sitio de infección (Kereszt et al. 2007).

De todas formas, aún teniendo el protocolo de transformación optimizado, se ha visto que la eficiencia de transformación es muy variable y dependiente de factores biológicos tales como el genotipo de soja a transformar (Savka et al., 1990; Cho et al., 2000) y la virulencia de la cepa de *A. rhizogenes* empleada (Savka et al., 1990; Ozyigit et al., 2013), pero también de otros factores como la experiencia del usuario que lleva a cabo el protocolo. En este sistema, hay tres características que son deseables encontrar en el genotipo a transformar: 1) que la generación de *hairy-roots* comience pocos días después de la infección (que redundaría en ensayos más cortos y menor requerimiento de espacio); 2) que genere muchas *hairy-roots* (que implica la obtención de mayor cantidad de material potencialmente transgénico); 3) que presente una alta eficiencia de transformación (que es lo que finalmente determina la cantidad de material transgénico con el cual realizar los



estudios posteriores deseados). A pesar de esto, no es común encontrar genotipos que cumplan con todas estas características (Cao et al., 2009). Además, la cinética del proceso de aparición de las raíces, que podría estar relacionado con la susceptibilidad del genotipo a la transformación, no ha sido, hasta el momento, caracterizado en detalle, así como tampoco su relación con la eficiencia de transformación. Este aspecto fue de especial interés en este trabajo de tesis ya que se buscó conocer dicha cinética y evaluar su posible relación con la eficiencia de transformación en los distintos genotipos ensayados.



## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

Evaluar la eficiencia de transformación de genotipos de soja por medio de *Agrobacterium rhizogenes*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Poner a punto la técnica de transformación transitoria en el genotipo de soja de referencia para esta técnica.
- Obtener plantas transformadas de otros dos genotipos de soja de interés para el laboratorio.
- Analizar la cinética de aparición de *hairy-roots* en los tres genotipos y evaluar su relación con la eficiencia de la transformación.



## 5. Materiales y Métodos

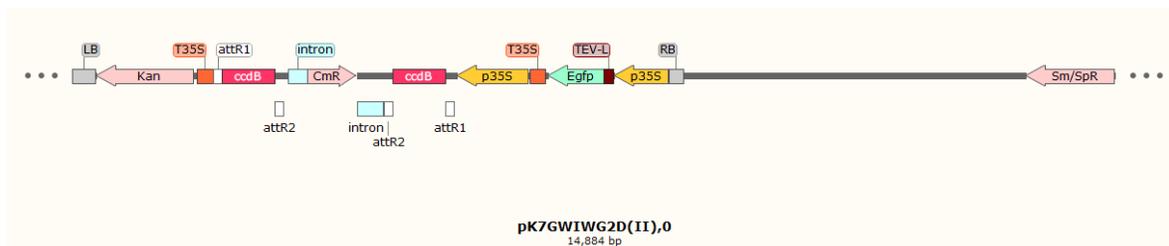
### 5.1. Material vegetal

Se trabajó con dos genotipos de soja con respuesta contrastante a sequía, el S07-6557, tolerante, y el TJS049, susceptible (cedidos por Sergio Ceretta-INIA La Estanzuela), de interés para el laboratorio, y con el genotipo Thorne, que es el modelo para la transformación transitoria mediada por *A. rhizogenes* (McBlain et al., 2003).

### 5.2. Cepa bacteriana

Se utilizó la cepa hipervirulenta K599 de *A. rhizogenes* (NCPB2659), la cual contiene el plásmido RI 2659 de tipo cucumopina (Xiang et al., 2016) y resistencia a espectinomicina 30 µg/µL (Sm/SpR). La cepa fue proporcionada por el Dr. Germán Robert del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Córdoba, Argentina.

Esta cepa fue transformada con el vector binario pK7GWIWG2D(II),0 (Figura 3) que presenta dos marcadores de selección: Sm/SpR para la selección en bacterias (100 µg/µL en *Agrobacterium* y 50 µg/µL en *E.coli*), y el gen de resistencia a kanamicina (Kan) para la selección en el tejido vegetal y, además, contiene como gen reportero a la proteína verde fluorescente GFP.



**Figura 3. Esquema del vector pK7GWIWG2D(II),0.** Se indican las regiones comprendidas en el ADN-T y el gen de resistencia a espectinomicina para la selección en bacteria (Sm/SpR). La imagen fue extraída del Software SnapGene.

### 5.3. Transformación de *A. rhizogenes* y selección de colonias

#### 5.3.1. Transformación por electroporación

La transformación se realizó con un electroporador modular (The Gene Pulser Xcell™, Biorad), usando el programa “Agrobacterium” de dicho equipo. Se partió de una alícuota de 50 µl de células competentes de la cepa K599 de *A. rhizogenes* a la cual se adicionó 1 µl de ADN plasmídico (vector pK7GWIWG2D(II),0) con una concentración de 142,8 ng/µL. Se colocó la muestra dentro de la cubeta del electroporador (0,1 cm) y se generó un impulso eléctrico a 2,4 Kvolt, 200 Ω y 25 µf. Inmediatamente después se adicionó 200 µL de medio SOC (Tabla 1), y se incubaron las células durante 4 h a 28 °C. Seguidamente, las células se plaquearon en medio Luria-Bertani (LB)-agar (Tabla 2) con 100 µg/µL Sm/Sp, y se incubaron durante 48 h a 28°C.

Tabla 1. Composición del medio SOC.

Nutriente	Concentración
Triptona	2%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10mM
Glucosa	20 mM

Tabla 2. Composición del medio LB.

Nutriente	Concentración (g/L)
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	5

#### 5.3.2. Confirmación de la presencia del vector binario

Previo a la transformación de las plantas, se verificó la presencia del vector binario en 10 colonias presuntamente transformadas mediante PCR de colonia empleando los cebadores para amplificar el gen *egfp* (Tabla 3). Se utilizó el termociclador Senso Quenst



modelo Labcycler.

**Tabla 3. Oligonucleótidos usados para confirmar la presencia del vector binario en las colonias de *A. rhizogenes*.** Fwd: cebador sentido; Rev: cebador antisentido.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	Tamaño del Fragmento (pb)
<b>eGFP Fwd</b>	CTCGATGTTGTGGCGGATCT	60,5	535
<b>eGFP Rev</b>	ATTATCCTCGGCCGACATGG	60,5	

El mix de PCR empleado se muestra en la Tabla 4 y el programa del termociclador en la Tabla 5. El molde de la reacción se preparó resuspendiendo una parte de cada colonia en 20 µL hidróxido de sodio 20 mM durante 10 min a temperatura ambiente. De esta preparación se utilizaron 2 µL por reacción.

**Tabla 4. Mix de PCR.**

Componentes	Concentración
<b>Taq Buffer</b>	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	2 mM
<b>dNTPs</b>	0,12 mM
<b>Taq (<i>Thermo Scientific</i>; #EP041)</b>	0,06 U/µL
<b>Cebador Fwd</b>	0,12 µM
<b>Cebador rev</b>	0,12 µM

**Tabla 5. Programa del termociclador.**

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
<b>Desnaturalización Inicial</b>	94	180	1
<b>Desnaturalización</b>	94	40	25
<b>Hibridación</b>	53	30	
<b>Extensión</b>	72	40	
<b>Extensión final</b>	72	120	1

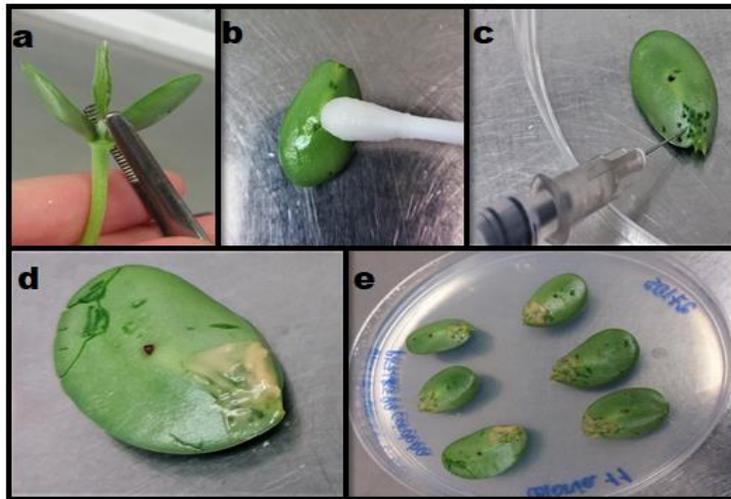
### 5.3.3. Selección de la colonia efectiva

Las colonias que contenían la construcción se repicaron en placas LB-agar con 100 µg/µL Sm/Sp y se incubaron durante 24 h a 28 °C. El césped de células obtenido se colectó



en un microtubo y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura estéril hasta formar una “pasta” homogénea.

Se utilizaron 6 cotiledones por colonia para seleccionar la colonia efectiva. Los cotiledones se obtuvieron de plántulas de 5 días del genotipo Thome (Figura 4: a). Estos fueron colocados sobre una placa de Petri y se esterilizaron superficialmente con etanol 70% con la finalidad de bajar la carga microbiana que pudieran tener (Figura 4: b). Luego, con una jeringa de 1 mL se pincharon los cotiledones en la cara abaxial (Figura 4: c) y se colocó “pasta” bacteriana sobre las heridas (Figura 4: d). Por último, los cotiledones se colocaron en placas de Petri con agar/agua al 0,8% con el lado abaxial hacia arriba (Figura 4: e) y se colocaron en cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad), con 25/18  $^{\circ}\text{C}$  (día/noche) y una radiación de 800  $\mu\text{mol}$  de fotones $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ . El experimento se monitoreó cada 5 días, observando la aparición de callos y raíces, hasta el día 15. La colonia seleccionada fue la que más *hairy roots* generó. A partir de ella se obtuvieron gliceroles que se almacenaron en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 4. Etapas del proceso de transformación de cotiledones para la selección de la colonia efectiva.** Se muestran las distintas etapas del proceso de transformación. **a)** Escisión del cotiledón con una pinza previamente esterilizada. **b)** Esterilización superficial con etanol 70%. **c)** Generación de heridas mediante pinchazos en la cara abaxial del cotiledón. **d)** Colocación de la pasta bacteriana sobre las heridas. **e)** Los seis cotiledones empleados por colonia colocados en placas con medio agar-agua al 0,8%.

#### 5.4. Transformación de soja mediada por *A. rhizogenes*

Se siguió la metodología descrita en Kereszt et al., 2007 con algunas modificaciones en cuanto al cultivo de la bacteria y al crecimiento de las plantas, que se detallan en las secciones 5.4.2. y 5.4.3., respectivamente.

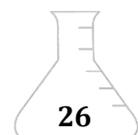
##### 5.4.1. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó en tres ensayos. Cada ensayo es considerado un ambiente. En cada uno de estos ambientes se evaluaron los siguientes genotipos de soja: Thorne, SO7-6557, TJS2049 bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones por genotipo. En cada ensayo se sembraron 48 semillas por genotipo en bandejas de 31x15x10 cm utilizando como sustrato vermiculita. Las bandejas se colocaron en la cámara de crecimiento antes mencionada (5.3.2.) con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) y 30/20 °C (día/noche). Las plantas se regaron con solución nutritiva B&D (Broughton y Dilworth, 1971; Tabla 6). Pasados 5 días desde la siembra se eligieron 10 plántulas para ser infectadas. Estas plántulas infectadas se trasplantaron a macetas de 355 mL (unidad experimental).

**Tabla 6. Composición de la solución nutritiva B&D.**

Nutriente	Concentración (mg/L)
<b>CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	147,05
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	68,05
<b>Fe-Citrato</b>	6,63
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	61,65
<b>K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	43,50
<b>MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	0,17
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	0,12
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	0,14
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	0,05
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	0,03
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	0,03

El pH se ajustó a 6,5-6,7 con KOH 2M.



Para el análisis estadístico se utilizó el siguiente modelo lineal general:  $y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$  donde  $y_{ij}$  es la variable medida,  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo genotipo y  $\varepsilon_{ij}$  es el error experimental con  $N \sim (0, \sigma^2)$ . Para saber si hubo diferencias significativas entre los genotipos se compararon las medias mediante un análisis de la varianza (ANAVA) y LSD Fisher en cada ensayo. En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de  $p \leq 0,05$ .

#### 5.4.2. Cultivo de *A. rhizogenes*

Para la infección de las plantas de cada ensayo, se empleó una alícuota del glicerol de la colonia efectiva para cada genotipo. Cada alícuota fue plaqueada en LB/agar con 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Sm/Sp y 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  acetociringona, y se incubó durante 48 h a 28 °C. El césped de células obtenido se colectó en un microtubo y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura estéril hasta formar una “pasta” homogénea.

Al mismo tiempo se creció un cultivo de la misma cepa (K599) sin el vector binario (no transformada) en medio LB-agar con 30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Sm/Sp y 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  acetociringona durante 48 h a 28 °C. De igual forma que para el cultivo de la colonia efectiva, éste se colectó y se resuspendió en agua destilada ultra pura estéril. Este cultivo fue utilizado para realizar los controles negativos de la transformación.

#### 5.4.3. Infección de las plántulas, aparición y crecimiento de *hairy roots*

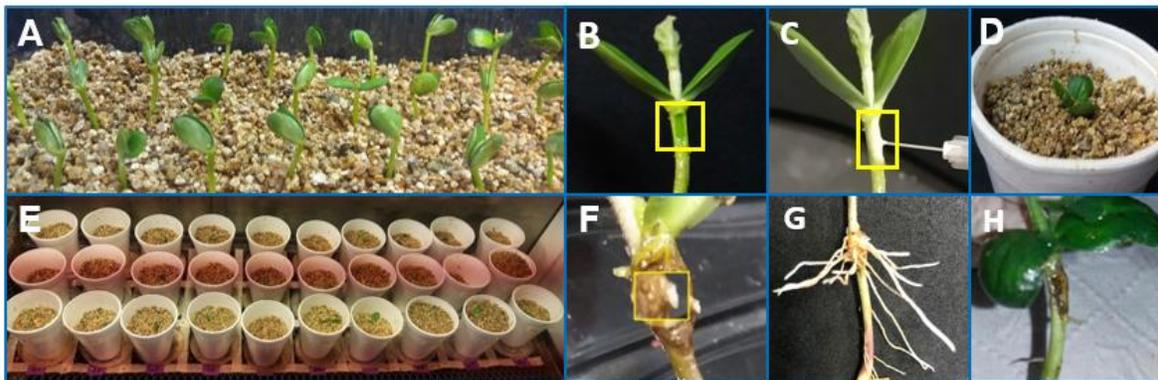
Las 10 plantas que se seleccionaron por cada genotipo y en cada ensayo presentaban similares características y se encontraban en condiciones óptimas para la transformación (cotiledones verdes y sin separar) (Figura 5: A). A cada plántula, se le cortó un pequeño segmento (1 cm de largo x 3 mm de profundidad, aproximadamente) del hipocótilo proximal con una hoja de bisturí (Figura 5: B) y se pinchó la herida con una jeringa de 1 mL conteniendo el cultivo de la colonia efectiva (5.3.3.) (Figura 5: C). Luego, las plántulas se colocaron individualmente en vasos de telgopor de 355 mL de volumen conteniendo vermiculita previamente humedecida, teniendo la precaución de que la herida quedara bien cubierta (Figura 5: D). Los vasos se colocaron en cámara de crecimiento con las condiciones antes mencionadas (5.3.2.) (Figura 5: E). En la Figura 5: H se muestra una planta infectada, pero no transformada.



Entre los días 8 y 17 post-infección, se cuantificó la aparición de raíces con el fin de conocer la cinética del proceso en los tres genotipos evaluados (Figura 5: F). Entre los días 15-18 se cortaron las *hairy-roots* originadas a partir del sitio de infección (Figura 5: G) y se identificaron las raíces positivas, transformadas, mediante la expresión de GFP en un microscopio de epifluorescencia.

Para los controles negativos se transformaron 2 plántulas del genotipo TJS2049, 2 plántulas del genotipo S07-6557 y 5 plántulas del genotipo Thorne para cada bloque de forma idéntica al resto del ensayo, pero infectándolas con la cepa K599 vacía, sin transformar. Entre los días 20 y 25 post-infección se cortó la raíz principal de las plantas transformadas.

Para todas las plantas, las *hairy-roots* que emergieron a partir del sitio de infección fueron cortadas y lavadas 3 veces con agua ultra pura estéril durante 15 seg; seguidamente, se incubaron 2 veces con 5 mg/mL cefotaxima durante 40 min y después nuevamente se realizaron 3 lavados de con agua ultra pura estéril durante 15 segundos. La finalidad de los lavados con cefotaxima es la eliminación del *Agrobacterium* que pueda quedar adherido a las raíces. Al finalizar los lavados, las muestras fueron maceradas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.



**Figura 5: Etapas del proceso de transformación de soja.** Se observan las distintas etapas, desde la germinación de las semillas hasta el día de observación de las *hairy-roots*. **A)** Plántulas de 5 días de edad. **B)** Sitio de infección en el hipocótilo. **C)** Infección de plántulas con la cepa K599 de *A. rhizogenes* transformada con el vector pK7GWIWG2D(II),0. **D)** Plántula post-infección. **E)** Plantas después de la infección en cámara de crecimiento con temperatura controlada (25/18 °C día/noche, respectivamente). **F)** Observación de la aparición de *hairy roots* desde el día 8 al 18 post-infección. **G)** Planta el día de corte y observación de las *hairy roots* en microscopio. **H)** Planta no transformada.

#### 5.4.4. Identificación de raíces transgénicas

Con el fin de identificar las raíces transgénicas, se cortaron todas las *hairy-roots* (enteras) generadas a partir del sitio de infección. La identificación se basó en la observación macroscópica de fluorescencia cuando las raíces eran excitadas con la luz UV del microscopio de epifluorescencia (ZEISS-AXIO Imager M2), aplicando filtros de excitación entre 450-490 nm y emisión a 515 nm. Una vez observada la fluorescencia, las raíces fueron separadas en *pools* llamados “positivo o transgénico”, “negativo” e “intermedio”, de acuerdo con el nivel de emisión que presentaban.

#### 5.4.5. Cuantificación de la eficiencia de transformación

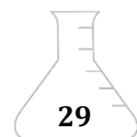
Para evaluar nuestros resultados en cuanto a la eficiencia del proceso, se calcularon para cada genotipo y ensayo, dos parámetros: la “*frecuencia de transformación*” que se define como el número de plantas que presentaron al menos una raíz transgénica sobre la cantidad de plantas totales, y la “*eficiencia de transformación por ensayo*”, que se calcula haciendo el promedio de la eficiencia de transformación por planta definida como el número de raíces transgénicas sobre el total de raíces. Ambos parámetros se expresan en porcentaje.

$$\text{Frecuencia de transformación (\%)} = \frac{\text{número de plantas transgénicas}}{\text{número de plantas totales}} * 100$$

$$\text{Eficiencia de transformación por planta (\%)} = \frac{\text{número de raíces transgénicas}}{\text{número total de raíces}} * 100$$

#### 5.5. Extracción de ADN genómico de las *hairy-roots*

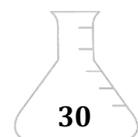
Se realizó la extracción del ADN genómico de los *pools* de *hairy-roots* obtenidos en la sección 5.4.5. para cada genotipo y en cada ensayo con la finalidad de confirmar por PCR la presencia de los genes *rolB* y *egfp*, y la ausencia del gen *virD* en las *hairy-roots* positivas. Se siguió el protocolo que se indica a continuación:



- 1) Se colocó aproximadamente 100 mg de la muestra en un microtubo de 1,5 mL. En campana de gases se adicionó a cada tubo 0,7 mL de 2X CTAB (CTAB 2% (w/v); NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM) con 7  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol.
- 2) Se mantuvieron las muestras en hielo 5 min.
- 3) Se maceró cada muestra con una vía de plástico durante 3-5 min.
- 4) Se incubaron las muestras en un baño de agua a 65 °C durante 30 min con ocasional inversión.
- 5) Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente.
- 6) En campana de gases, se agregó a cada muestra 600  $\mu$ L de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1) invirtiendo los tubos 5-6 veces. Luego se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm.
- 7) En campana de gases, se transfirió la fase acuosa (500  $\mu$ L) a microtubos nuevos. Seguidamente se precipitó el ADN con igual volumen de isopropanol y se mezcló. Se mantuvieron los tubos a -20°C durante 90 min.
- 8) Se centrifugaron las muestras durante 15 min a 13000 rpm, descartándose posteriormente el sobrenadante.
- 9) Se lavó el ADN precipitado con 1 ml de etanol al 70%, y se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm. Se descartó el etanol.
- 10) Se secó el pellet durante 20-40 min en un SpeedVac (Savant DNA 120, Thermo Scientific).
- 11) Se resuspendió el pellet en 30  $\mu$ L de agua ultra pura estéril.

### 5.6. Amplificación por PCR de los genes *rolB*, *virD*, *egfp*

Para la re-confirmación del material transgénico se realizó la amplificación mediante PCR de los genes *rolB*, *virD*, *egfp*, empleando los cebadores de las Tablas 3 y 7, y utilizando el ADN extraído en la sección 5.5.. El equipo empleado fue el termociclador Senso Quenst, modelo Labcycler. El mix utilizado se muestra en la Tabla 8 y el programa del termociclador se muestra en la Tabla 9.



**Tabla 7. Oligonucleótidos usados para re-confirmar el material transgénico.** Fwd: cebador sentido; Rev: cebador antisentido.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Tamaño del Fragmento (pb)
<i>virD</i> Fwd	TCCGACAGCATGGCCATAAG	60,5	247
<i>virD</i> Rev	CGGACAAAATGGAACGGAGC	60,5	
<i>rolB</i> Fwd	TCACGCCAGCATT TTTGGTG	58,4	238
<i>rolB</i> Rev	GAGATGGTCCGTGCTCACAA	60,5	

**Tabla 8. Mix de PCR empleado para re-confirmar el material transgénico.**

Componentes	Concentración
Taq Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
dNTPs	0,12 mM
Taq ( <i>Thermo Scientific; #EP041</i> )	0,06U/μL
Cebador Fwd	0,12 μM
Cebador rev	0,12 μM
Molde	40 ng

**Tabla 9. Programa del termociclador empleado para re-confirmar el material transgénico.**

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)	Ciclos
Desnaturalización Inicial	94	180	1
Desnaturalización	94	40	25
Hibridación	-	30	
Extensión	72	40	
Extensión final	72	180	1

### 5.7. Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa

El ADN se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% para los productos de la sección 5.3.2. y de 1,2% para los productos de la sección 5.6.. El tampón para los geles y la electroforesis fue TAE 1X (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA). En los



geles se agregó SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) en la cantidad indicada por el fabricante. Las muestras se mezclaron con el volumen del buffer de carga Orange G 6X (10 mg/mL Orange G, 40% glicerol), necesario para obtener una concentración final 1X. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb Ladder plus y 100 bp Ladder (Fermentas). Las electroforesis se realizaron a 90 V y el ADN se visualizó en un transiluminador con luz UV (DynaLight Dual intensity UV transilluminator), registrando y almacenándose las imágenes (Kodak Gel Logic 100, Imagine System).

## 5.8. Análisis *Western blot*

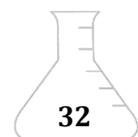
### 5.8.1. Extracción y cuantificación de proteínas totales

Se maceraron 100 mg de raíces previamente molidas con nitrógeno líquido (**sección 5.4.5.**) con 500  $\mu$ L de buffer de extracción (0.1 M tampón fosfato potásico pH 7.0; 1 mM EDTA; 0.2% ácido ascórbico; 0.1% triton x100; 15% glicerol; 1% polivinilpirrolidona (PVP); 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 0.36  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoetanol). Se centrifugó el homogenado a 15000g durante 15 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se realizó según Bradford, 1976.

### 5.8.2. SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas totales en condiciones desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida-SDS. Para la preparación del gel y el tampón se siguió el protocolo propuesto por Sambrook y Russel, 2000. La concentración de poliacrilamida utilizada para los geles concentrador y separador fue 5% y 12%, respectivamente. El tampón de corrida utilizado fue 25 mM Tris pH 8.3, 0.9 M glicina y 1% SDS.

Los extractos obtenidos según **5.8.1.** se mezclaron con tampón de carga (0.192 M Tris-HCl pH 6.8; 0.002% (p/v) Azul de bromofenol; 2% (p/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol; 10% (v/v) glicerol) en una relación 5:1 y se calentaron durante 10 min a 90 °C. Se cargó 10  $\mu$ g de proteína por pocillo. La electroforesis se realizó en una cuba Bio-Rad® (MiniProtean® III), la cual se inició a 80 V hasta que la muestra ingresara al gel separador y luego se continuó a 100 V hasta el final de la corrida.

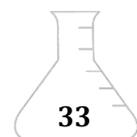


### 5.8.3. Transferencia de proteínas a membrana

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron durante 10 min en tampón de transferencia (25 mM tris, 192 mM glicina pH 8.3, 20% metanol). Previamente, se saturaron en el mismo tampón las membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno), cortadas 0,5 cm más grande que el gel, y las hojas de papel Whatman 1, cortadas del mismo tamaño que las esponjas y rejillas del dispositivo de electrotransferencia, que se montó según las instrucciones del fabricante (Bio-Rad®). La electrotransferencia se realizó a 31 mA durante 1 h. La membrana se tiñó en una solución 0.5% (p/v) de rojo ponceau (Sigma) y 1% (v/v) ácido acético para comprobar la correcta transferencia de las proteínas.

### 5.8.4. Inmunodetección de GFP

Para la inmunodetección de GFP se utilizaron anticuerpos policlonales fabricados en conejo. Las membranas se incubaron en TBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5 y 0,5 M NaCl) en agitación a 30 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Como solución de bloqueo se utilizó leche en polvo libre de grasa 5% en TBS-T (TBS-Tween 20 al 0.1%). Las membranas se incubaron en agitación a 30 rpm durante 1 h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo y, posteriormente, se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min cada vez. A continuación, se incubaron durante 1 h en agitación a 30 rpm a temperatura ambiente con la solución del anticuerpo primario anti-GFP (dilución 1:400; G-1544-Sigma-Aldrich®). Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min cada vez y luego se incubaron durante 1 h en agitación a 30 rpm a temperatura ambiente con la solución del anticuerpo secundario anti-IgG de conejo generado en cabra conjugado con HRP (dilución 1:10000; Agrisera®-#AS09602). Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 10 min cada vez y se procedió a su revelado con el kit ECL (Bio-Rad®) o con el kit Super Signal (Thermo Fisher®) según las indicaciones de los fabricantes y según el requerimiento. Por último, luego de 1 min de incubación se removió el líquido sobrante de las membranas y se revelaron en el visualizador C-Digit® (LI-COR).



### 5.9. Herramientas informáticas

Las secuencias de los genes *rolB* y *virD* empleadas para el diseño de los cebadores se obtuvieron en la web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La secuencia de ADN para el diseño de los cebadores para el gen *egfp* se obtuvo en el sitio web *Gateway Vectors* (<https://gatewayvectors.vib.be/>).

Para el diseño de cebadores de los genes *rolB* y *virD* se utilizó el programa online *Primer designing Tool* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

El diseño de cebadores del gen *egfp* se realizó en el programa online *Primer3Plus* (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>).

El análisis estadístico se realizó en el programa el InfoStat® versión 2019 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (<https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=46>)



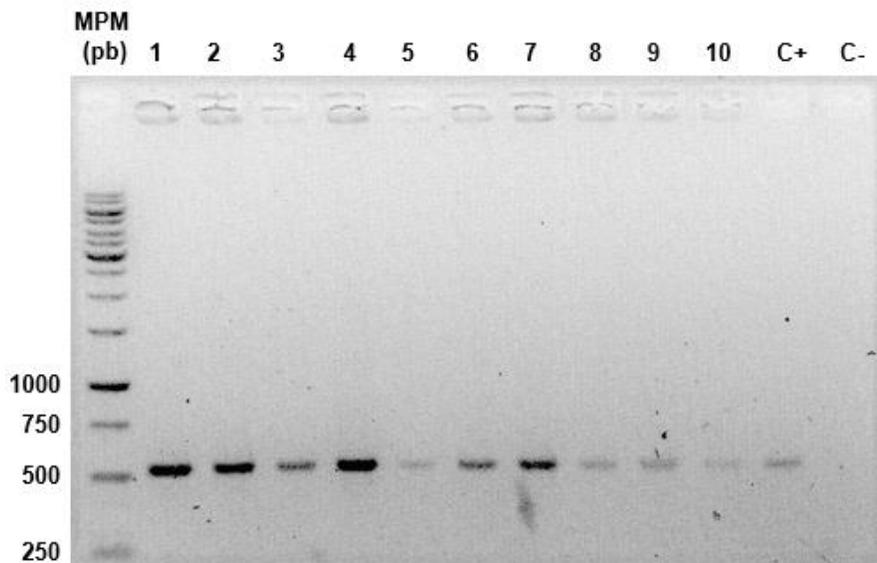
## 6. Resultados

### 6.1. *Agrobacterium rhizogenes*

#### 6.1.1. Verificación de la presencia del vector binario

Antes de proceder con la transformación de las plantas, se verificó la presencia del vector pK7GWIWG2D (II),0 en colonias de la cepa K599 presuntamente transformadas. Esta verificación se basó en la amplificación del gen *egfp* mediante la técnica de PCR de colonia.

En la Figura 6 se muestran los productos de PCR obtenidos para 10 colonias seleccionadas al azar. Todas mostraron una banda por encima de los 500 pb, al igual que el control positivo (dilución 1:100 del vector pK7GWIWG2D (II),0), correspondiendo al producto esperado de 535 pb. Por otro lado, en el control negativo (reacción de PCR donde se sustituyó el vector por agua) no se obtuvo ninguna banda, por lo cual, confirmamos que los productos obtenidos son específicos.

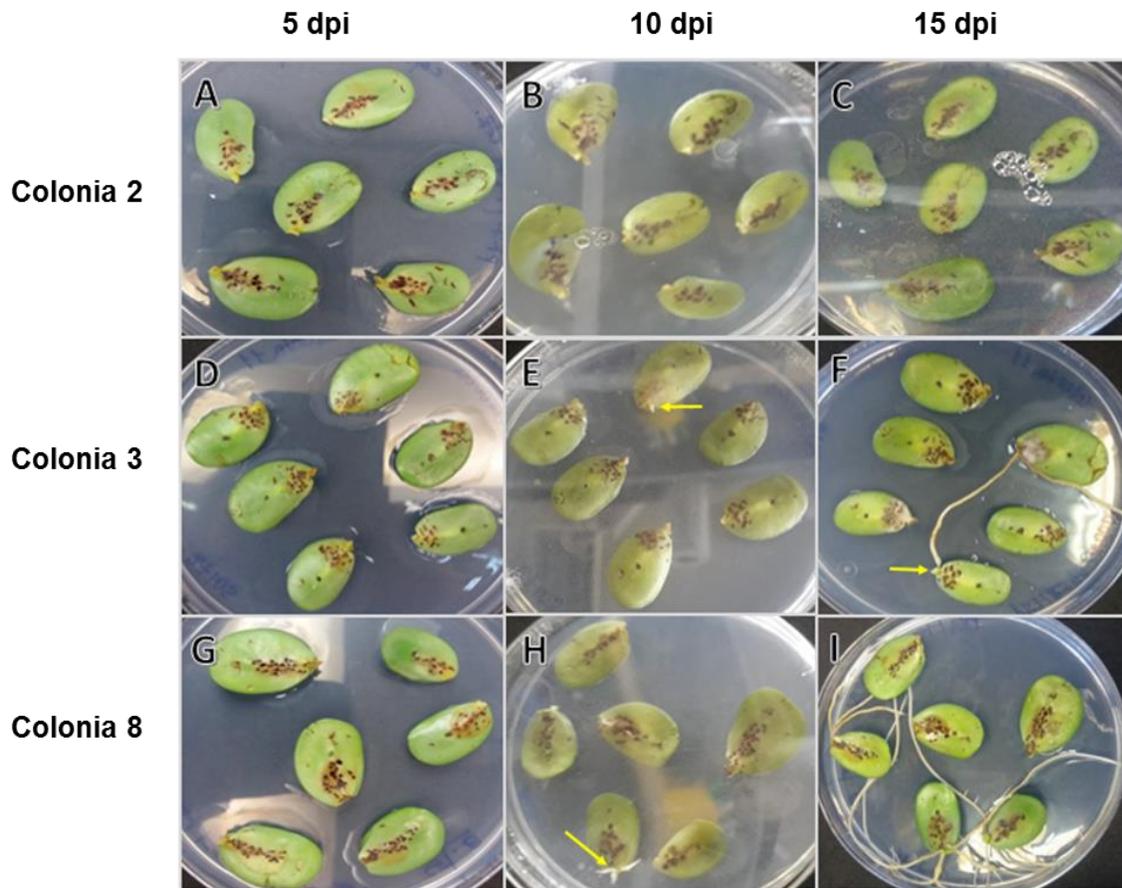


**Figura 6. Confirmación de la presencia del vector binario pK7GWIWG2D (II),0 en colonias de la cepa K599 de *A. rhizogenes*.** Gel de agarosa al 1% en el cual se observan los productos de PCR para 10 colonias (1-10). Como control positivo (C+) se utilizó una dilución 1:100 del vector pK7GWIWG2D (II),0. El control negativo (C-) consistió en una reacción de PCR sustituyendo el vector por agua. MPM (pb): marcador de peso molecular.

### 6.1.2. Selección de la colonia efectiva

Durante este trabajo de tesis observamos que la capacidad de infección de distintas colonias de la cepa K599 de *A. rhizogenes* transformadas con la construcción pK7GWIWG2D (II),0 era muy variable. Por esto, previo a la realización de los ensayos de transformación de plántulas de soja, chequeamos la capacidad de formación de *hairy-roots* de 10 colonias luego de realizar la transformación de las bacterias. La evaluación de la capacidad de infección y generación de *hairy-roots* se realizó mediante la infección *ex-vitro* de cotiledones. El uso de cotiledones como explantes para la regeneración de plantas se emplea hace más de 3 décadas (Wright et al., 1986) y también son comúnmente usados para transformar plantas (Hienchee et al., 1988; Paz et al., 2006). En el caso de la infección de los mismos con *A. rhizogenes*, el método se emplea para obtener rápidamente material transgénico (raíces) (Chen et al., 2018) o, como en este caso, para chequear la virulencia de las colonias. La transformación de las 10 colonias evaluadas fue confirmada en la sección 6.1.1. Se utilizaron 6 cotiledones de plántulas de 5 días por colonia evaluada.

Con la finalidad de presentar de forma resumida el proceso de evaluación de colonias que se realizó, en la Figura 7 se presenta la evolución en 3 puntos (5, 10 y 15 dpi) del proceso de transformación de los cotiledones infectados en 3 de las 10 colonias evaluadas (colonia 2, 3 y 8), que son representativas del conjunto. Se puede observar que a 5 dpi aún no han aparecido raíces en ninguno de los cotiledones para ninguna de las colonias (Figura 7: A, D y G). A 10 dpi solo 1 cotiledón de la colonia 3 presentó una raíz (Figura 7: E), y 1 cotiledón de la colonia 8 presentó 3 raíces (Figura 7: H). En este mismo punto, ningún cotiledón infectado con la colonia 2 presentó raíces (Figura 7: B). A 15 dpi, el último punto de observación del proceso, 2 de los 6 cotiledones infectados con la colonia 3 presentaban 1 raíz (Figura 7: F) y 3 de los 6 cotiledones infectados con la colonia 8 presentaban múltiples raíces (Figura 7: I). En cuanto a la colonia 2, todos los cotiledones continuaron sin tener raíces (Figura 7: C). A partir de este análisis queda claro que la colonia que mayor número de raíces generó, es decir, la más virulenta, fue la colonia 8 (Figura 7: G-I) y por tanto fue la seleccionada para los ensayos de infección de plántulas de soja.



**Figura 7. Resumen del proceso de transformación de cotiledones para la selección de la colonia efectiva.** Se muestra el proceso para las colonias 2, 3 y 8 a los 5, 10 y 15 días post-infección (dpi). Las flechas en color amarillo indican pequeñas raíces.

Se optó por observar el proceso de infección entre los 5 y 15 dpi ya que este período de tiempo es suficiente para identificar la colonia efectiva. Sin embargo, es relevante aclarar que el número de raíces sigue aumentando hasta aproximadamente 35 dpi; a partir de este punto ya no se obtienen nuevas raíces.

## 6.2. Soja

### 6.2.1. Cinética del proceso de aparición de *hairy-roots*

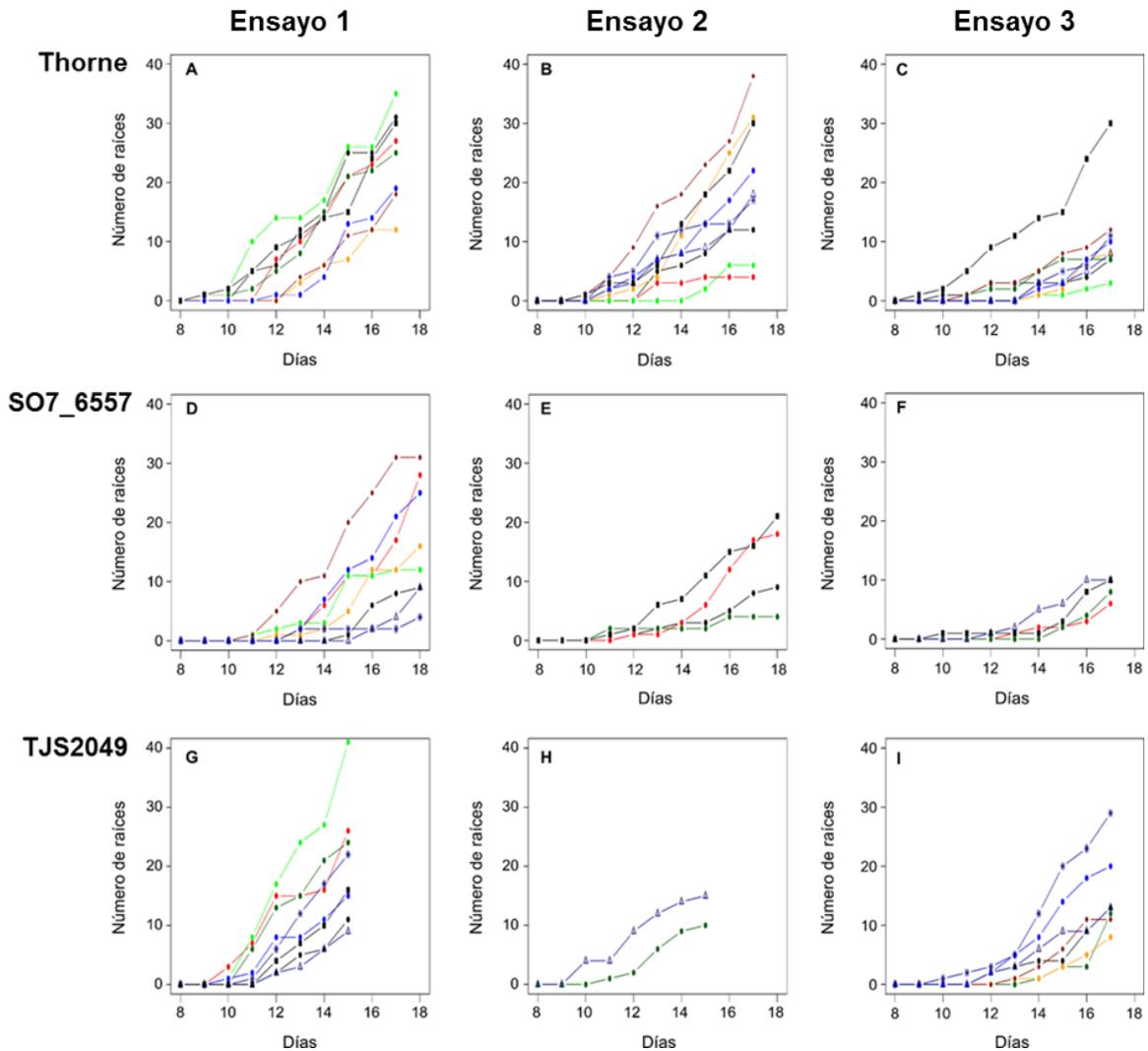
Como se mencionó previamente, en este trabajo analizamos la cinética del proceso de emergencia de *hairy-roots* a partir del sitio de infección con el fin de evaluar si ésta está

relacionada con la susceptibilidad del genotipo a la transformación, es decir, a la eficiencia del proceso. En este sentido, se cuantificó la emergencia de las *hairy-roots* durante el período de tiempo comprendido entre 8 y 15-18 dpi en los 3 genotipos ensayados (Thorne, SO7\_6557 y TJS2049). El período de tiempo seleccionado se debió a que antes de los 8 dpi en ningún caso observamos emergencia de raíces, y el punto final, de 15-18 dpi, nos permitió obtener raíces de una longitud adecuada para ser escindidas del sitio de emergencia y posteriormente observadas en el microscopio.

Según puede observarse en la Figura 8, hay variación en el punto final (día de corte y observación en el microscopio) entre los distintos ensayos y genotipos. Si bien para el genotipo Thorne el punto final fue 17 dpi en los 3 ensayos (Figura 8: A, B y C) para los genotipos SO7\_6557 y TJS2049 el punto final del tercer ensayo (Figura 8: F, I) varió respecto al primer y segundo ensayo, de 18 dpi y 15 dpi, respectivamente (Figura 8: D, E, G, H), a 17 dpi, con la finalidad de uniformizar para los 3 genotipos en el último ensayo el día final de observación y corte de raíces.

En el ensayo 1 de Thorne (Figura 8: A), las *hairy-roots* comenzaron a emerger a 9 dpi. A 12 dpi, salvo 1 planta, todas las restantes tenían al menos 1 raíz. A tiempo final, se observó que el número de raíces por planta fue muy variable (entre 11 y 35). En este caso se descartaron 2 plantas, una que no generó raíces y otra que presentó errores en la cuantificación. En el ensayo 2 de Thorne (Figura 8: B), las *hairy-roots* comenzaron a emerger a 10 dpi. A 13 dpi la mayoría de las plantas presentaban raíces. A tiempo final, de forma similar a lo ocurrido en el ensayo 1, el número de raíces por planta fue muy variable (entre 4 y 38). En este caso se descartó 1 planta que no generó raíces. En el ensayo 3 de Thorne (Figura 8: C), las *hairy-roots* comenzaron a emerger a 9 dpi. A 14 dpi todas las plantas tenían al menos 1 raíz. A tiempo final, salvo 1 planta, las restantes tenían entre 3 y

30 raíces, un rango más acotado que en los ensayos 1 y 2. En este caso se descartó 1 planta por presentar errores en la cuantificación.



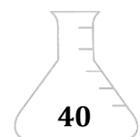
**Figura 8. Cinética de aparición de hairy-roots para los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 en los ensayos 1, 2 y 3.** El período en el que se cuantificó el proceso fue entre 8 y 15-18 dpi, dependiendo del genotipo y ensayo.

Es de remarcar que en el ensayo 3 en general (Figura 8: C, F, I), para los 3 genotipos, se observó un retraso en el día de emergencia de raíces, un menor número de raíces por planta, así como una menor variación de esta variable entre las distintas plantas si se lo compara con los 2 ensayos anteriores. Esto podría deberse a las condiciones de la

cámara de cultivo al momento del ensayo o a alguna particularidad del cultivo bacteriano empleado para transformar las plantas de este ensayo.

En el ensayo 1 de SO7\_6557 (Figura 8: D), las *hairy-roots* comenzaron a emerger a 11 dpi. A 15 dpi casi la totalidad de las plantas presentaban raíces. A tiempo final, el número de raíces totales se encontró nuevamente dentro de un rango muy disperso (entre 4 y 31). En este caso se descartaron 2 plantas que no generaron raíces. Es importante mencionar que en el ensayo 2 hubo problemas con la temperatura de la cámara de crecimiento donde germinaron las semillas, lo que provocó que las plántulas de los genotipos SO7\_6557 y TJS2049 (no así las de Thorne) usadas para la transformación no estuvieran en las condiciones óptimas (con cotiledones verdes y cerrados, y uniformes) para la transformación. Esto provocó que pocos días después de ser infectadas, muchas de estas plántulas murieran. Este es el motivo de por qué en este ensayo presentamos datos solo de 4 plantas del genotipo SO7\_6557 (Figura 8: E) y de 2 plantas para el genotipo TJS2049 (Figura 8: H). Para el genotipo SO7\_6557 (Figura 8: E), todas las plantas presentaban al menos 1 raíz a 12 dpi. A tiempo final, el rango de número de raíces por planta se situó entre 4 a 21. En el ensayo 3 de SO7\_6557 (Figura 8: F), las raíces comenzaron a emerger a 11 dpi, y a 15 dpi todas las plantas presentaban al menos 1 raíz. A tiempo final, el rango de número de raíces por planta fue de 6 a 10. En este caso se descartaron 4 plantas que no generaron raíces, y 2 que presentaron un comportamiento atípico.

En el ensayo 1 de TJS2049 (Figura 8: G), las *hairy-roots* comenzaron a emerger a 10 dpi. A 12 dpi todas las plantas presentaban raíces. A tiempo final, el rango de número de raíces por planta obtenido fue muy disperso situándose entre 9 y 41. En este caso se descartaron 2 plantas, 1 que no generó raíces y otra que presentó un comportamiento atípico. En el ensayo 2 de TJS2049 (Figura 8: H), las 2 plantas que pudieron ser cuantificadas presentaban raíces a 10 dpi, y a tiempo final una de ellas presentaba 10 raíces y la otra 15. En el ensayo 3 de este mismo genotipo (Figura 8: I), las *hairy-roots* comenzaron a emerger a 10 dpi. A 13 dpi la mayoría de las plántulas presentaban al menos 1 raíz. A tiempo final, el número de raíces por planta fue de entre 8 y 29. En este caso, se descartaron 2 plantas que no generaron raíces, y 1 por tener errores en la cuantificación.



A modo de resumen de lo antes mencionado, en la Tabla 10 se muestra el rango de número de raíces obtenido a tiempo final (día de corte y observación) para cada genotipo y en cada ensayo.

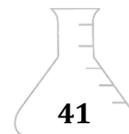
**Tabla 10. Rango de número de raíces para los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 en los ensayos 1, 2 y 3.**

Genotipo	Ensayo	Rango de número de raíces
Thorne	1	11-35
SO7_6557	1	4-31
TJS2049	1	9-41
Thorne	2	4-38
SO7_6557	2	4-21
TJS2049	2	10-15
Thorne	3	3-30
SO7_6557	3	6-10
TJS2049	3	8-29

Como se mencionó anteriormente, una característica deseable de encontrar en un genotipo en proceso de transformación es que las raíces comiencen a emerger a los pocos días de haber realizado la infección (Cao et al., 2009). En la Tabla 11 se muestra el día de aparición de *hairy-roots* después de la infección bacteriana (DAI, por su nombre en inglés *Days of hairy-roots emergence after bacterial infection*), con su respectivo desvío estándar para cada genotipo y ensayo. A excepción del genotipo SO7\_6557 en el ensayo 1, en los demás ensayos no se presentaron diferencias significativas entre los genotipos.

**Tabla 11. DAI para los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 en los ensayos 1, 2 y 3. Se indica con \* diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).**

Genotipo	Ensayo	DAI
Thorne	1	10,9 ± 1,7
SO7_6557	1	3 ± 1,8*
TJS2049	1	11 ± 0,9
Thorne	2	11,7 ± 1,7
SO7_6557	2	11,5 ± 0,6
TJS2049	2	10,5 ± 0,7
Thorne	3	12,4 ± 1,6
SO7_6557	3	13,8 ± 2,6
TJS2049	3	13 ± 1,8



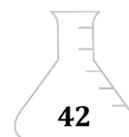
Analizando la Figura 8 en su conjunto se puede concluir que la variable analizada, el número de *hairy-roots* por planta transformada, presenta una alta variabilidad entre ensayos y genotipos. Sin embargo, es posible identificar distintas “etapas” o “fases” en el proceso de aparición de raíces en el tiempo. La primera es la que comprende el período de emergencia de las primeras raíces y es la que involucra más días, desde 1 dpi hasta 10 dpi en promedio. La segunda etapa involucra un aumento moderado en el número de raíces por planta (entre 10 y 14 dpi, aproximadamente), y es seguida de una última o tercera etapa en la cual el número de raíces aumenta más rápidamente (a partir de 14 dpi y hasta el punto final).

En particular, analizando con más detalle la segunda etapa, se puede observar que existe variación entre genotipos y entre ensayos. En el ensayo 1 y 2 de Thorne (Figura 8: A, B) el número de raíces aumenta lentamente durante los 2 días siguientes a la emergencia de las primeras raíces, en cambio, en el ensayo 3 (Figura 8: C) lo hace durante 4 días. Los ensayos 1 y 2 del genotipo SO7\_6557 no presentan etapas tan claras como los otros casos; en el primer caso es debido a la gran dispersión de los datos (Figura 8: D), y en el otro a las pocas plantas que se pudieron analizar (Figura 8: E). En el ensayo 3 se observa un aumento más lento en el número de raíces durante los 4 días posteriores a la aparición de las primeras raíces. En el ensayo 1 de TJS2049 (Figura 8: G) se observa que el número de raíces aumenta lentamente solo durante un día después de haber emergido las primeras raíces. El ensayo 2 (Figura 8: H) no puede analizarse debido a que solo se tienen datos de 2 plantas. En el ensayo 3 (Figura 8: I) el número de raíces crece lentamente durante los 3 días siguientes a la aparición de las primeras raíces.

### **6.2.2. Identificación de raíces transgénicas mediante microscopía**

La identificación de las raíces transgénicas (aquellas que presentaban la proteína GFP) se basó en su observación macroscópica al excitarlas con luz UV y observando su emisión de fluorescencia. Fue así que, durante la selección de raíces en los 3 genotipos evaluados, observamos la existencia de 3 poblaciones (Figura 9) con distintas intensidades de emisión de fluorescencia a las que denominamos:

- Población “positiva o transgénica”: conformada por raíces que emitían fluorescencia, se veían de un color verde intenso (Figura 9: A).

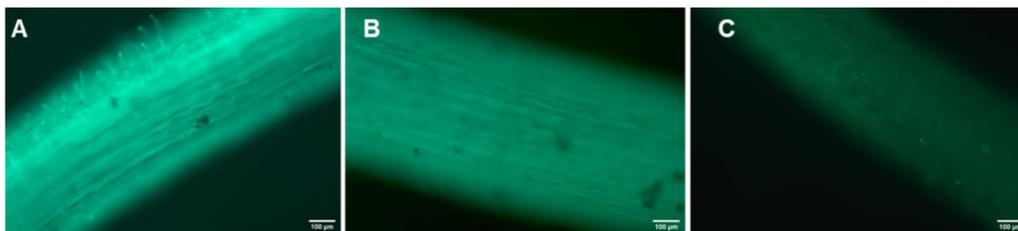


- Población “negativa”: conformada por raíces que no emitían fluorescencia, se veían de color rojo (Figura 9: C).
- Población “intermedia”: conformada por raíces que emitían una intensidad de fluorescencia notoriamente menor a la población “positiva”, se veían ligeramente verdes (Figura 9: B).



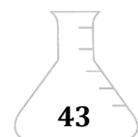
**Figura 9. Identificación macroscópica de las tres poblaciones de *hairy-roots* mediante la observación de emisión de fluorescencia.** A) Población “positiva o transgénica”. B) Población “intermedia”. C) Población “negativa”. Las imágenes fueron tomadas con la cámara del celular Samsung Galaxy J5.

En la Figura 10 se muestran raíces de las tres poblaciones antes definidas observadas al microscopio. En concordancia con la observación macroscópica, aquí se observó una intensa emisión de fluorescencia para la población “positiva o transgénica” (Figura 10: A), una emisión muy baja para la población “negativa” (Figura 10: C), y una emisión de fluorescencia de intensidad intermedia para la población “intermedia” (Figura 10: B).



**Figura 10. Observación microscópica de las tres poblaciones de *hairy-roots*.** A) Población “positiva o transgénica”. B) Población “intermedia”. C) Población “negativa”. Fotos tomadas con el software del microscopio (Zeiss-ZENpro Imaging Software).

En cuanto a cantidad de raíces, la población mayoritaria fue la “negativa”, seguida por la población “positiva o transgénica” y por último la “intermedia” de la cual se obtuvo



muy poca cantidad de raíces. Cada una de las poblaciones antes mencionadas obtenidas en los tres ensayos se juntaron y se utilizaron para la posterior re-confirmación del material transgénico mediante análisis *Western blot* y amplificación de genes por PCR.

### 6.2.3. Eficiencia de transformación

Conocer la eficiencia del proceso de transformación que se planea llevar a cabo es muy relevante ya que permite conocer, de forma aproximada, cuanto material transgénico se obtendrá al finalizar el ensayo. Esto, a su vez, permite adaptar la cantidad de material de partida a transformar para luego obtener una cantidad de material transgénico adecuada. Por otro lado, la información sobre eficiencias de transformación de procesos llevados a cabo con distintas metodologías es un insumo para elegir aquella adecuada para los intereses, recursos y experiencia del usuario. Debido a que nuestra metodología de transformación se basó en el uso de un vector biológico, factores como el genotipo de la planta, la cepa bacteriana utilizada y su virulencia y la manipulación por parte del usuario probablemente han influido en la eficiencia global del proceso de transgénesis. Por esto, calculamos la frecuencia de transformación, la eficiencia de transformación por planta y ensayo (como se destalla en la sección 5.4.5.) en todos los 3 genotipos con el fin de evaluar nuestros resultados en cuanto a la eficiencia del proceso.

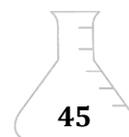
En cuanto a las frecuencias de transformación, en la Tabla 12 se muestran los valores obtenidos para los 3 genotipos en cada ensayo. El genotipo Thorne tuvo frecuencias elevadas (80-100 %) en los 3 ensayos. El genotipo TJS2049 presentó valores elevados para los ensayos 1 y 3 (80 %), y un valor bajo en el ensayo 2 (20 %), debido a que solo 2 plantas finalizaron el ensayo (como se mencionó en la sección 6.2.1.). El genotipo SO7\_6557 presentó valores medios (60-70 %) en los ensayos 1 y 3, y un valor bajo en el ensayo 2, porque solamente 4 plantas finalizaron el ensayo (como se mencionó en la sección 6.2.1.).



**Tabla 12. Frecuencias de transformación de los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 en los ensayos 1, 2 y 3.** La frecuencia de transformación se define como el porcentaje del número de plantas que presentaron al menos una raíz transgénica sobre la cantidad de plantas totales.

Genotipo	Ensayo	Frecuencia (%)
Thorne	1	90
SO7_6557	1	70
TJS2049	1	80
Thorne	2	80
SO7_6557	2	40
TJS2049	2	20
Thorne	3	100
SO7_6557	3	60
TJS2049	3	80

En cuanto a la eficiencia de transformación por planta, en la Figura 11 se muestran los *box plots* correspondientes a este parámetro para cada genotipo y para cada ensayo. Se observa una gran dispersión de los datos en la mayoría los genotipos y ensayos. Para el ensayo 1 (E1) de Thorne, se observó una distribución bastante simétrica y con poca dispersión de los datos en comparación con los ensayos 2 (E2) y 3 (E3) que presentaron una distribución asimétrica negativa con una mayor dispersión. Por otro lado, observando los valores de medianas vemos que fueron diferentes en cada ensayo, quedando los valores de mediana de E2 y E3 al límite del rango intercuartílico de E1. Para el genotipo SO7\_6557, también se obtuvo una tendencia dispersa de los datos en los 3 ensayos. El E1 mostró una distribución más simétrica, pero a la vez más dispersa en comparación con E2 y E3 que presentaron una distribución asimétrica positiva y una dispersión levemente menor. El valor de mediana en E2 y E3 fue muy similar, y en E1 se encontró comprendido dentro del rango intercuartílico de los otros ensayos. Para el genotipo TJS2049 se observó nuevamente una dispersión de los datos en todos los ensayos, aunque un poco menor que en SO7\_6557. Los datos de E1 mostraron una distribución asimétrica positiva, en E2 simétrica y en E3 asimétrica negativa. El valor de la mediana fue similar entre E1 y E2, y muy diferente en E3, quedando fuera del rango intercuartílico de los otros ensayos.



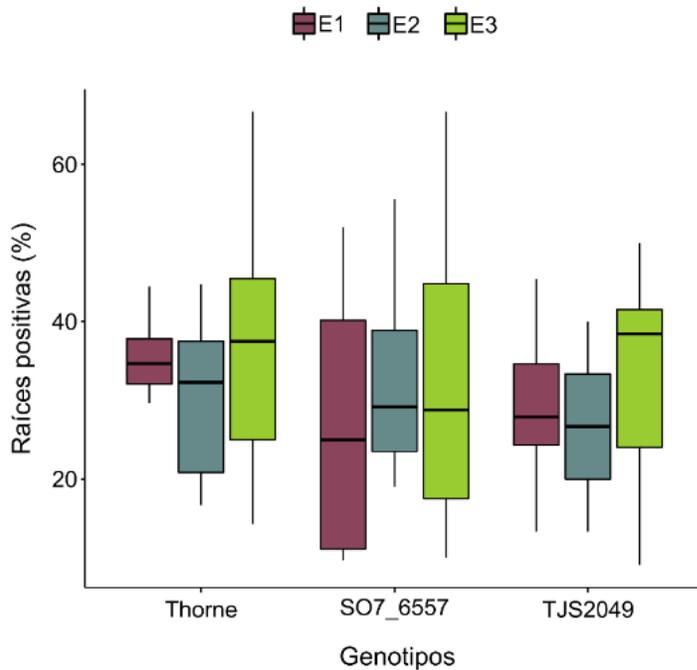


Figura 11. **Box plots** correspondientes a la eficiencia de transformación por planta de cada genotipo para cada ensayo. Ensayo 1 (E1), Ensayo 2 (E2), Ensayo 3 (E3). La eficiencia de transformación se define como el porcentaje del número de raíces transgénicas sobre el total de raíces.

Los valores de eficiencia de transformación por ensayo (Tabla 13) para todos los genotipos son relativamente bajos, presentan altos valores de desvío estándar (salvo en el ensayo 1 del genotipo Thorne) como era de suponer a partir de la dispersión de los datos observadas en la Figura 11. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos en cada ensayo ( $p_{\text{ensayo 1}} = 0,8764$ ,  $p_{\text{ensayo 2}} = 0,8116$  y  $p_{\text{ensayo 3}} = 0,6815$ ).

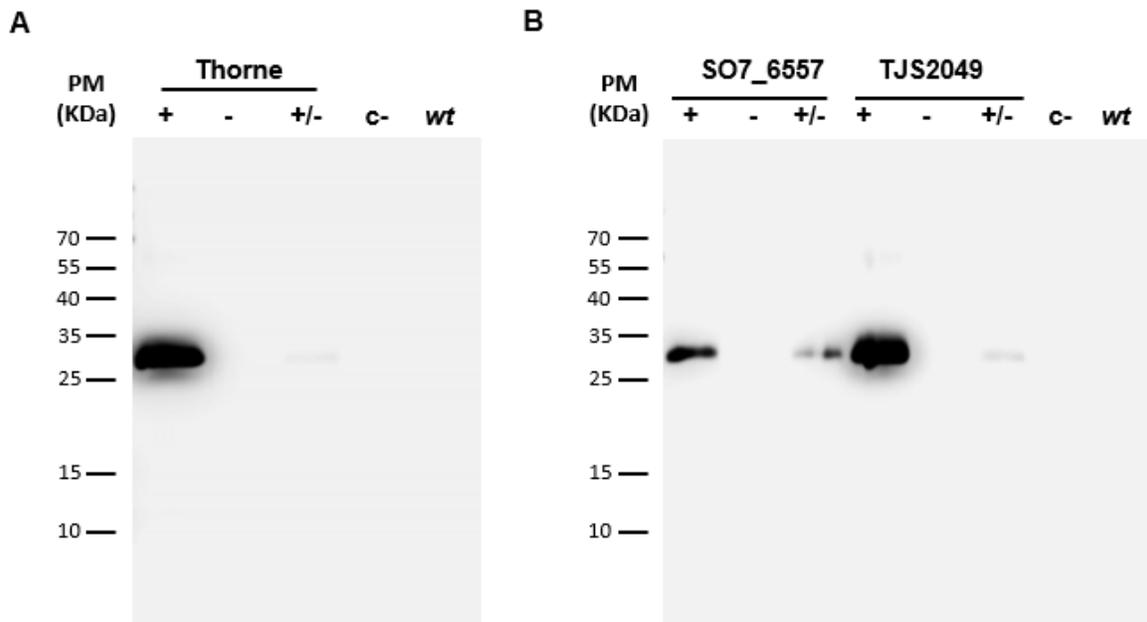
**Tabla 13. Eficiencia de transformación de los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 en los ensayos 1, 2 y 3.** La eficiencia de transformación por ensayo es el promedio de la eficiencia de transformación por planta definida como el número de raíces transgénicas sobre el total de raíces. Se expresa en porcentaje.

Genotipo	Ensayo	Eficiencia (%)
Thorne	1	34±7
SO7_6557	1	27±17
TJS2049	1	29±10
Thorne	2	36±21
SO7_6557	2	33±16
TJS2049	2	27±15
Thorne	3	45±26
SO7_6557	3	35±31
TJS2049	3	35±17

#### 6.2.4. Análisis *Western blot* para la confirmación de las raíces transgénicas

Entre la amplia variedad de genes reporteros existentes, el uso de GFP para la identificación de raíces transgénicas se encuentra entre los más utilizados ya que se conoce que el gen se integra en el genoma y que se expresa de manera eficiente (Cho et al., 2000). Si bien este método presenta como desventaja en sistemas vegetales la presencia de autofluorescencia debida a tejidos lignificados y con alto contenido de flavonas, que emiten en los mismos máximos espectrales que GFP (Lin et al., 2011), en este trabajo pudimos identificar raíces transgénicas que expresaban GFP con este método. Sin embargo, con el fin de validar el criterio tomado para las poblaciones “positiva o transgénica” y “negativa”, es decir re-confirmar los resultados obtenidos en la sección 6.2.2., y dilucidar si la fluorescencia emitida por la población “intermedia” era producto de la correcta inserción y expresión del transgén o se debía a autofluorescencia, realizamos un análisis *Western blot* para identificar la proteína GFP.

En la Figura 12 se presentan los *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-GFP de las poblaciones de *hairy-roots* “positiva o transgénica”, “negativa” y “intermedia” de los genotipos Thorne, TJS2049 y SO7\_6557. En estos experimentos se incluyó el control negativo de la transformación (plantas transformadas con la cepa K599 sin vector binario) para el genotipo Thorne y, como control negativo del experimento se utilizaron raíces salvajes de plantas Thorne crecidas en una cámara distinta a la que se encontraba el ensayo de transformación (para evitar la contaminación). Solo se incluyó el control negativo de la transformación para el genotipo Thorne debido a que los genotipos TJS2049 y SO7\_6557 no se transformaron en este caso.



**Figura 12. Análisis *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-GFP de las poblaciones de *hairy-roots* “positiva o transgénica”, “negativa” y “intermedia” de los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049. (+) Población “positiva o transgénica”, (-) Población “negativa”, (+/-) Población “intermedia”, (c-) Control negativo de la transformación, (wt) raíces salvajes, PM (KDa): marcador de peso molecular.**

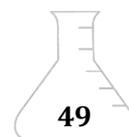
La población “positiva o transgénica” de Thorne (Figura 12: A) presentó una banda por encima de los 25 KDa la cual corresponde a la proteína GFP que tiene un peso molecular de 27 KDa; para la población “negativa” y ambos controles no se observó ninguna banda. Por otra parte, la población “intermedia” también presentó una banda de 27 KDa pero de menor intensidad que la población “positiva”. Iguales resultados se obtuvieron para los genotipos SO7\_6557 y TJS2049 (Figura 12: B). Las poblaciones “positivas o transgénicas” de ambos presentaron una banda de 27 KDa de igual forma que las poblaciones “intermedias”, si bien en este caso la banda es de menor intensidad. No se observó banda para las poblaciones “negativas” ni en los controles negativos. En la población “positiva o transgénica” del genotipo TJS2049 se observó además una banda inespecífica de 55 kDa aproximadamente.

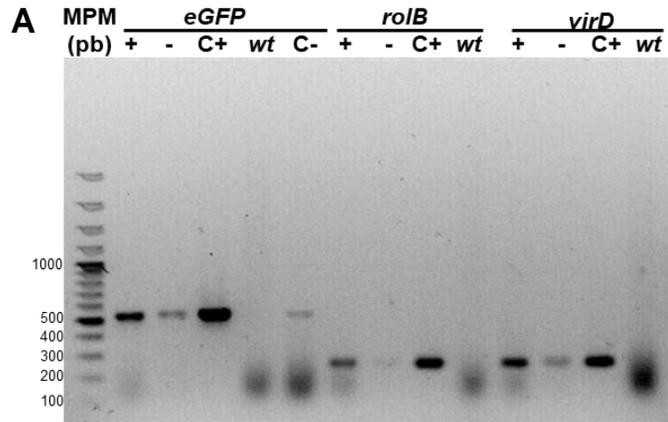
### 6.2.5. Análisis de la transformación mediante PCR (genes *rolB*, *virD* y *egfp*)

Otra metodología mediante la cual re-confirmamos la identidad de las poblaciones de *hairy-roots* “positivas o transgénicas” y “negativas” de los distintos genotipos fue PCR. No se incluyeron en este análisis las poblaciones “intermedias” debido a que no se contaba con material suficiente. Se incluyó como control positivo la cepa K599 transformada con el vector pK7GWIWG2D (II), 0, el control negativo de la transformación (plantas transformadas con la cepa K599 sin vector binario) y, como control negativo del experimento, raíces salvajes de plantas Thorne.

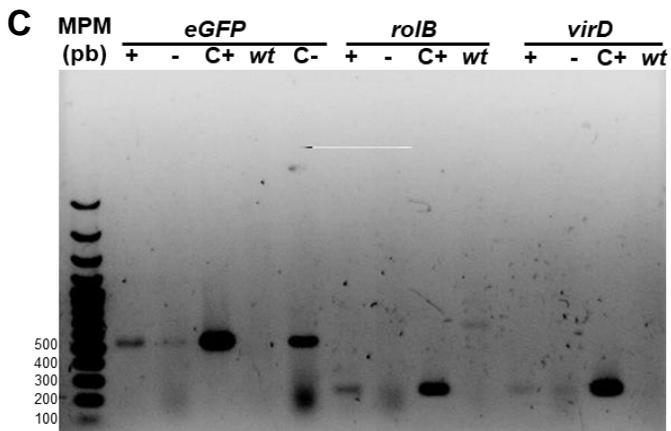
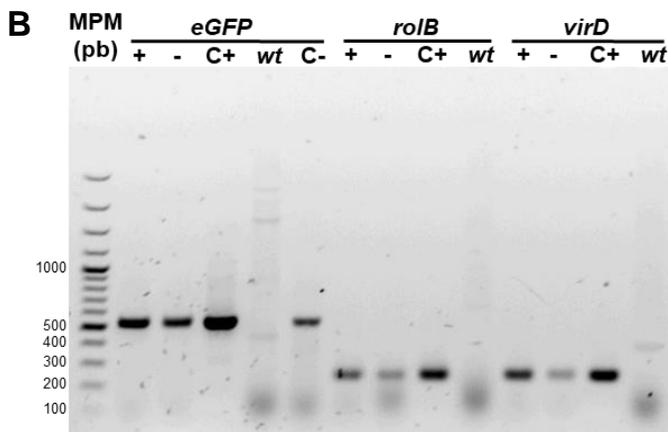
La estrategia se basó en amplificar tres genes: nuestro gen de interés *egfp*, el cual se espera que esté presente en las raíces positivas y, eventualmente, en raíces negativas (ya que las copias pueden haberse insertado en algún sitio del genoma que se encuentre silenciado, y por tanto, no puedan expresarse); el oncogén *rolB*, confirmando la presencia de ADN-T del plásmido Ri, y por tanto, ratificando la identidad de las raíces como *hairy-roots*, esperando que este se encuentre presente en raíces positivas y negativas. Por último, para validar que nuestros resultados se deben efectivamente a inserciones del ADN-T de ambos plásmidos en el genoma de las raíces, y no debido a una eventual contaminación por *A. rhizogenes*, incluimos en el análisis al gen *virD* que está presente únicamente en la bacteria (ya que no se transfiere al genoma de la planta).

En la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos para la amplificación de los 3 genes antes mencionados para las poblaciones de *hairy-roots* “positivas o transgénicas” y “negativas” de los 3 genotipos. Para el gen *egfp* en Thorne (Figura 13: A) se observó una banda superior a 500 bp en las raíces positivas, negativas, control negativo de la transformación y control positivo, los cuales corresponden con el fragmento esperado de unos 553 pb. Para el gen *rolB*, las raíces positivas y negativas mostraron una banda superior a los 200pb, al igual que el control positivo, coincidiendo con el fragmento esperado de unos 238 pb. Para el gen *virD* se obtuvo una banda superior a 200 pb para las raíces positivas, negativas y control positivo, correspondiendo con el fragmento esperado de unos 247 pb. Las raíces salvajes no mostraron ningún producto amplificado para los 3 genes.





**Figura 13. Re-confirmación del material transgénico mediante PCR.** Gel de agarosa al 1,2% donde los carriles (+) representan la población “positiva o transgénica”, (-) población “negativa”, (C+) cepa K599 transformada con pK7GWIWG2D (II), 0, (wt) raíces salvajes y (C-) control negativo de la transformación. A) Thorne, B) SO7\_6557, C) TJS2049.



Para el genotipo SO7\_6557 (Figura 13: B) se obtuvieron iguales resultados que en el genotipo Thorne para los genes *egfp*, *rolB* y *virD*. Además, las raíces salvajes mostraron 3 bandas inespecíficas para el gen *egfp* de aproximadamente 400 pb, 1250 pb, y 1350 pb; también mostraron otra banda inespecífica en *rolB* de aproximadamente 600 pb, y para el gen *virD* otra banda de aproximadamente 400 pb. De igual manera que Thorne y SO7\_6557, para el gen *egfp* de TJS2049 (Figura 13: C), se observó el fragmento esperado de 535 pb para las raíces positivas, negativas, control negativo de la transformación y control positivo. Para el gen *rolB*, se observó una banda de 238 pb para las raíces positivas y control positivo, mientras que las raíces negativas no mostraron una banda clara. Se obtuvieron productos de unos 247 pb para el gen *virD* en las raíces positivas, negativas y control positivo. Las raíces salvajes mostraron una banda inespecífica en el gen *rolB* (mayor a 500 pb) y ninguna banda para *egfp* y *virD*.

## 7. Discusión

### 7.1. Importancia de seleccionar la colonia efectiva

A la hora de optimizar un protocolo de transformación mediada por *A. rhizogenes* en las condiciones propias de laboratorio, es imprescindible reproducir las condiciones de cultivo que han demostrado ser clave para el éxito de esta transformación. Entre estas condiciones, se cuenta el lograr mantener en todo momento una alta humedad en el sitio de infección, necesaria para la morfogénesis y desarrollo de las raíces (Kereszt et al., 2007; Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2014), y mantener la temperatura de la cámara de crecimiento a no más de 25 °C/28 °C durante el período de crecimiento de las *hairy-roots*, puesto que a temperaturas superiores la maquinaria de transferencia del ADN-T se ve afectada, disminuyendo drásticamente la transformación (Kereszt et al., 2007; Cao et al., 2009). Otro aspecto relevante que condiciona en gran medida el éxito de la transformación es elegir plántulas con cotiledones cerrados y verdes (Kereszt et al., 2007). La importancia de este aspecto lo comprobamos en el ensayo 2 con los genotipos SO7\_6557 y TJS2049, en el cual se obtuvieron muy pocas plantas transformadas en cada genotipo debido a que las plántulas que fueron infectadas no estaban en condiciones óptimas. Además de que es deseable contar con eficiencias de transformación altas, es decir, un alto número de raíces transgénicas respecto al total de raíces obtenidas, otro factor que limita la cantidad de material transgénico que se va a obtener es el número de *hairy-roots* generadas. Este factor depende en gran parte de la virulencia de la cepa bacteriana empleada en la transformación. Durante este trabajo observamos que la virulencia de distintas colonias de la cepa K599 de *A. rhizogenes* transformadas con el vector pK7GWIWG2D (II),0 era diferente, es decir, cada una de ellas tenía una capacidad distinta de generar *hairy-roots* (Figura 7). Por esto, y con el fin de optimizar nuestro protocolo de manera de identificar aquella colonia que nos permitiera generar mayor número de *hairy-roots* en los ensayos de transformación de plántulas de soja y, por tanto, obtener mayor cantidad de material potencialmente transgénico, realizamos una búsqueda entre 10 colonias transformadas para seleccionar la colonia efectiva, aquella más virulenta. Para cumplir este objetivo infectamos 6 cotiledones con cada colonia y monitoreamos la cantidad de *hairy-roots*

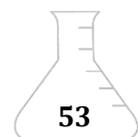


generadas a 5, 10 y 15 dpi. Los resultados evidenciaron virulencias muy diferentes entre las colonias. Hubo colonias, como la 2, que no tuvieron la capacidad de generar *hairy-roots* en el lapso de tiempo evaluado (Figura 7: C). Otras, como la colonia 3, presentaron una escasa capacidad de generación de *hairy-roots*, generando 2 o 3 raíces en algunos de los 6 cotiledones (Figura 7: F). Sin embargo, algunas colonias se destacaron por tener la capacidad de generar muchas *hairy-roots* en más de un cotiledón. Es así que de las 10 colonias evaluadas, la colonia 8 (Figura 7: I) fue la seleccionada para realizar los ensayos de transformación en las plántulas de soja por ser la que generó mayor número de *hairy-roots* en los cotiledones. Una posible hipótesis que explicaría esta diferencia en la capacidad de generación de raíces entre las colonias podría ser el número de copias del plásmido que ingresaron en las células durante la transformación. Para poder confirmar esta hipótesis se podría hacer un cultivo líquido de cada colonia, extraer el ADN plasmídico y cuantificarlo.

### **7.2. Análisis de la cinética del proceso de aparición de *hairy-roots* y su relación con la eficiencia de transformación**

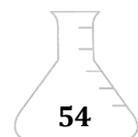
El análisis de la cinética del proceso de aparición de *hairy-roots* se basó en la cuantificación de las variables “número de *hairy-roots*” y “DAI”. Como se mencionó en la sección 3.3., tanto el número de *hairy-roots* que se obtienen a partir del sitio de infección en un proceso de transformación como el tiempo en que tardan esas raíces en emerger son aspectos relevantes a considerar en un genotipo a la hora de evaluar un protocolo de transformación. Por esto, era de nuestro interés evaluar si los distintos genotipos se comportaban de manera similar o no en estos aspectos, y también si existía alguna relación con la eficiencia de transformación.

Durante este análisis (Figura 8) observamos que la variable “número de *hairy-roots*” por planta transformada presentaba una alta variabilidad tanto entre plantas del mismo genotipo y ensayo, como entre genotipos. Esta variabilidad probablemente sea consecuencia de la manipulación al momento de herir e infectar las plántulas, ya que como se detalló en la sección 5.4.3. este procedimiento es meramente manual, siendo imposible de reproducir de forma idéntica en cada plántula, y determinante a la hora de generar



plantas transformadas. A pesar de esta gran variabilidad, se identificaron 3 “etapas” o “fases” a lo largo del tiempo, en las cuales predominarían diferentes procesos biológicos. La primera fase se caracteriza por ser la más larga en el tiempo y donde se observa la presencia de pequeños callos y eventualmente 1 o 2 raíces. Durante esta fase probablemente ocurra la activación del sistema de virulencia bacteriano, procesamiento del ADN-T, movimiento del ADN-T desde la bacteria a la célula hospedera e inserción del ADN-T en el genoma de la planta. La segunda fase, que transcurre durante un periodo corto de tiempo (1-4 días), se caracteriza por un aumento en el número de callos y crecimiento de los mismos, y escasa aparición de raíces, predominando la proliferación celular y posterior inducción de la raíz. La tercera y última etapa alcanza el tiempo final de observación y se caracteriza por la generación de más de una raíz en 24 h, predomina la diferenciación del tejido (callo) al fenotipo raíz y el crecimiento en longitud de las mismas.

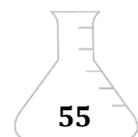
La variable “DAI” presentó una alta dispersión en la mayoría de los genotipos y ensayos, salvo para el genotipo TJS2049 en el ensayo 1 (sin considerar el ensayo 2 para los genotipos TJS2049 y SO7\_6557 por el bajo número de plantas, por lo mencionado en la sección 6.1.2.). Esta dispersión podría deberse a efectos de la técnica (manipulación) al momento de la infección de las plántulas. Por otra parte, solo en el ensayo 1 hubo diferencias significativas del genotipo SO7\_6557 con respecto a los genotipos Thorne y TJS2049 (Tabla 11). Si bien en los dos ensayos posteriores (ensayos 2 y 3) no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados, es relevante indicar que estos ensayos tuvieron características diferentes al ensayo 1 (mencionadas en la sección 6.1.2.), que derivó, en el ensayo 2, con que contáramos con un número muy desigual de plantas a evaluar entre los distintos genotipos. En el caso del ensayo 3, ocurrió un retraso significativo de DAI con respecto al ensayo 1 en los genotipos Thorne y TJS2049 (ver Anexo). Estas diferencias en las características de los ensayos probablemente han influido en la variabilidad de los resultados obtenidos, por lo cual, sería necesario realizar otro ensayo con iguales condiciones que el ensayo 1 para poder dilucidar si el genotipo SO7\_6557 es significativamente diferente a los genotipos Thorne y TJS2049 en cuanto a la variable DAI. Concluimos que los valores obtenidos de la variable “DAI” para todos los genotipos y ensayos fueron aceptables en el sentido de que en todos los casos el punto final, es decir, el día de corte y observación de las *hairy-roots*, fue menor a 21 dpi, siendo este valor el límite establecido en la metodología de referencia (Kereszt et al., 2007).



En cuanto al número de *hairy-roots* obtenidas a tiempo final del análisis (corte y observación de las raíces al microscopio), se obtuvo un rango amplio de valores para los 3 genotipos en el ensayo 1, y para los genotipos Thorne y SO7\_6557 en el ensayo 2 (Tabla 10). Esta gran variabilidad entre plantas del mismo genotipo y ensayo podría deberse nuevamente a efectos de la manipulación del material en el momento de la infección de las plantas. Por otro lado, los inconvenientes ocurridos en el ensayo 3 derivaron en rangos de número de *hairy-roots* más acotados, debido a un enlentecimiento del proceso de aparición de *hairy-roots* que se evidencia por un DAI más grande en los genotipos Thorne y TJS2049 (ver Anexo). Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por Kereszt et al., 2007; se logró obtener mediante este protocolo una buena cantidad de *hairy-roots* en todos los genotipos, superando el promedio obtenido según el protocolo de referencia (Kereszt et al., 2007) de 6-7 raíces por planta.

Como se mencionó anteriormente, con el fin de evaluar nuestra metodología de transformación y facilitar la comparación entre los ensayos se calcularon dos parámetros: la “frecuencia de transformación” y la “eficiencia de transformación” por ensayo de los 3 genotipos. En este sentido, el genotipo que resultó ser más susceptible a la transformación fue Thorne ya que presentó una alta frecuencia de transformación (80-100 %) en todos los ensayos, siendo además dicha frecuencia mayor a la de los restantes genotipos en todos los ensayos (Tabla 12). Si se tienen en cuenta los ensayos 1 y 3, el genotipo con el valor más alto de frecuencia de transformación después de Thorne fue TJS2049 con un 80% (Tabla 12). Por último, el genotipo que resultó ser menos susceptible a la transformación en nuestras condiciones fue SO7\_6557 con un promedio de frecuencia de transformación del 65% (Tabla 12). No se tomó en cuenta para el cálculo de estos parámetros el ensayo 2 para los genotipos SO7\_6557 y TJS2049 porque, como hemos mencionado previamente, el bajo número de plantas transformadas se debió a una mala calidad de las plántulas a transformar y no a que las plantas no se hayan transformado. Comparando nuestros resultados con los del protocolo de referencia (Kereszt et al., 2007), coincidimos en los valores de frecuencia obtenidos para los genotipos Thorne y TJS2049, estando comprendidos en el rango de 70%-100% obtenido en dicho protocolo, y un valor inferior para el genotipo SO7\_6557 (65%).

En cuanto al parámetro “eficiencia de transformación por planta”, y según se observa en la Figura 11, éste mostró una gran variabilidad tanto entre ensayos como entre

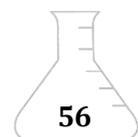


genotipos. Esta variabilidad era esperable luego de observar los altos desvíos estándares que se obtuvieron en los valores de eficiencia de transformación por ensayo (Tabla 13). Esta variabilidad podría deberse a múltiples factores como: efectos de la manipulación al momento de la herida e infección de las plántulas, errores al momento de la cuantificación de las raíces transgénicas (pérdida de raíces durante el corte y observación en el microscopio), o una característica intrínseca de la variable. Por otro lado, los valores de eficiencia de transformación por ensayo mostraron que todos los genotipos tienen una baja susceptibilidad a este tipo de transformación (Tabla 13). Esto podría deberse a una característica intrínseca de los genotipos ensayados ya que el éxito de la transformación mediada por *Agrobacterium* es genotipo-dependiente, o a que la metodología empleada no permite obtener transformaciones más eficientes en las condiciones de nuestro laboratorio.

A pesar de haberse obtenido una baja eficiencia de transformación en todos los genotipos evaluados, cuando el objetivo es el estudio de la biología de la raíz esta técnica continúa siendo una buena opción en comparación con los métodos de transformación estable, ya que, permite obtener en poco tiempo material transgénico, con una manipulación y equipamiento sencillo y permitiendo ajustar la cantidad de material aumentando el número de plantas transformadas (Collier et al., 2005; Veena and Taylor, 2007). En este sentido, debido a que el genotipo SO7\_6557 presentó la menor frecuencia de transformación, se debería aumentar considerablemente el número de plantas a transformar con respecto a los genotipos Thorne y TJS2049. En cuanto a uno de los objetivos de este trabajo que era evaluar una posible relación entre alguna(s) variable evaluada durante el análisis de la cinética de aparición de *hairy-roots* y la eficiencia de transformación, debemos decir que debido a la alta variabilidad que mostró el proceso de cinética de aparición de *hairy-roots*, y a que no hubo diferencias significativas en la eficiencia de transformación en los genotipos evaluados, no pudimos establecer ninguna relación entre ellos.

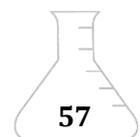
### 7.3. Re-confirmación del material transgénico

Durante la identificación de las raíces transgénicas, aquellas que expresaban GFP, observamos la existencia de 3 poblaciones de raíces con distintas intensidades de emisión



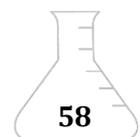
de fluorescencia en todos los genotipos evaluados. Las denominamos: “positiva o transgénica”, aquellas raíces cuya emisión de fluorescencia correspondía a la presencia de GFP; “negativa”, aquellas raíces que no emitían fluorescencia y por lo cual concluimos que no expresaban GFP; “intermedia”, aquellas raíces que presentaban cierta emisión de fluorescencia que podría deberse a la presencia de GFP o a la autofluorescencia intrínseca del tejido. A pesar de que pudimos reconocer exitosamente mediante microscopía las raíces que expresaban el transgén, decidimos realizar un análisis *Western blot* para confirmar la presencia de la proteína GFP, y un análisis mediante PCR para identificar la presencia o ausencia de los genes *egfp*, *rolB* y *virD* en las distintas poblaciones de *hairy-roots*. La finalidad de las 2 aproximaciones mencionadas fue validar el criterio tomado para las poblaciones de raíces “positiva o transgénica” y “negativa”, y dilucidar si la fluorescencia observada en la población “intermedia” era producto de la proteína GFP o se debía a la autofluorescencia del tejido.

Los resultados obtenidos mediante la técnica *Western blot* re-confirmaron el criterio tomado para las poblaciones de raíces “positivas o transgénicas” de los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 ya que como se observa en la Figura 12 en esta población de cada genotipo se obtuvo una banda de 27 kDa correspondiente a la proteína GFP. Además, no se observó banda tanto en el control negativo de la transformación (*hairy-roots* obtenidas de plantas transformadas con la cepa K599 vacía, sin vector binario), como en el control del experimento (raíces salvajes), lo cual valida que los resultados se deben realmente a la presencia de GFP, y no a algún producto inespecífico o eventual contaminación. Para las poblaciones de raíces “negativa”, nuevamente re-confirmamos el criterio tomado en todos los genotipos evaluados ya que no se obtuvo banda (Figura 12) y por lo tanto concluimos que estas raíces no presentaban GFP. Por último, confirmamos que la fluorescencia emitida por las poblaciones de raíces “intermedia” (observada en la sección 6.2.2.) se debía a la proteína GFP y no a la autofluorescencia intrínseca del tejido ya que se obtuvo la banda de 27 kDa correspondiente a GFP en todos los genotipos (Figura 12). Por tanto, esta población no son más que raíces transgénicas con un nivel de emisión de fluorescencia notoriamente menor. Esta diferencia en el nivel de emisión de fluorescencia se debe a una menor cantidad de GFP, ya que, la intensidad de fluorescencia depende de forma lineal de la cantidad de proteína presente en el tejido (Richards et al., 2003). Esta disminución de la cantidad de proteína presente en las raíces de la población “intermedia” está asociada a un

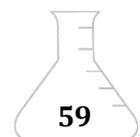


menor nivel de expresión del transgen, ya que la inserción del mismo ocurre de forma aleatoria en el genoma de la planta. Este hecho conlleva que cada evento pueda quedar flanqueado por distintas secuencias génicas afectando su nivel de expresión (Hernandez-Garcia et al., 2009), debido a que estas secuencias pueden contener elementos reguladores que pueden influir en la transcripción del transgen (De Bolle et al., 2003). Además, la estructura de la cromatina del ADN flanqueante determina la accesibilidad de las secuencias reguladoras por la maquinaria de transcripción, influyendo en la eficiencia transcripcional (De Bolle et al., 2003). El hecho que las raíces “mas-menos” sean en realidad “positivas o transgénicas” indica que tenemos un error en la cuantificación de las raíces transgénicas, subestimamos su valor, y, por consiguiente, tenemos un error en el cálculo de la eficiencia de transformación. Sin embargo, consideramos que este error no tuvo un impacto significativo en los resultados ya que esta población fue muy pequeña en comparación con las poblaciones “positiva o transgénica” y “negativa”.

Los resultados obtenidos mediante PCR mostraron la presencia de contaminación con *A. rhizogenes* en las poblaciones “positiva o transgénica” y “negativa” de los 3 genotipos evaluados, y en el control negativo de la transformación, ya que se amplificó el fragmento de 247 pb específico del gen *virD*, que como se mencionó anteriormente, no se transfiere al genoma de la plata, y se encuentra únicamente en el genoma de la bacteria (Figura 13). Además, esta contaminación se confirmó al observar en el control negativo de la transformación la amplificación del fragmento de 553pb correspondiente a *egfp*. Estos resultados muestran que el método empleado para la eliminación de *A. rhizogenes* de las raíces no fue eficiente, debido a que la bacteria no solo se encuentra presente en la superficie de las raíces, sino que además, se halla en el sistema vascular de las mismas y en las células del parénquima que rodean al xilema (Falasca et al., 2000). Por tanto, para próximos experimentos se debería optar por otra metodología de extracción de ADN genómico de forma que nos permita obtener y/o discriminar el ADN genómico de las *hairy-roots* del ADN de *A. rhizogenes*, ya que nuestros resultados muestran que es muy difícil eliminarlo por completo de las raíces. Además, este resultado evidencia que la contaminación del control negativo de la transformación ocurrió en la cámara de crecimiento, y/o a partir de material contaminado (vasos de telgopor, vermiculita, mesada de trabajo). En el control negativo del experimento (raíces salvajes), como era de esperar, no se observó la amplificación correspondiente a ninguno de los genes ensayados. En

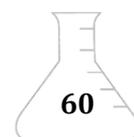


conclusión, debemos decir que no se logró re-confirmar mediante esta aproximación los resultados obtenidos inicialmente mediante microscopía. Sin embargo, los resultados del análisis *Western blot* son suficiente evidencia para poder concluir que el criterio tomado inicialmente para las poblaciones de raíces “positiva o transgénica” y “negativa” es correcto. Para la población de raíces “positiva o transgénica”, el hecho de haber confirmado la presencia de GFP ya nos indica que ambos transgenes (ADN-T del vector RI y ADN-T del vector binario) se insertaron en el genoma de la planta, y que las raíces son efectivamente *hairy-roots*. Por otra parte, en el caso de la población de raíces “negativa”, si bien la técnica de *Western blot* no nos brinda información (directamente) acerca si hubo o no inserción de los transgenes, un organismo se considera transformado genéticamente cuando un gen o grupo de genes se inserta de forma estable en el genoma y se expresa de manera adecuada (Darbani et al., 2008; Keshavareddy et al., 2018). Por lo tanto, como nuestro fin era poder identificar el material transgénico para luego poder cuantificarlo, es correcto tomar como población negativa o no transgénica a aquella que no expresa el transgén, que en nuestro caso es GFP.



## 8. Conclusiones

- La selección previa de la colonia efectiva es un paso importante para optimizar un protocolo de transformación mediante *A. rhizogenes*.
- Se logró poner a punto la técnica de transformación transitoria para los tres genotipos evaluados, obteniéndose plantas transformadas con altas frecuencias, pero bajas eficiencias.
- El análisis de la cinética de aparición de *hairy-roots* puede dividirse en tres “etapas o fases”.
- No se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de transformación entre los genotipos.
- No se pudo establecer ninguna relación entre las variables evaluadas durante el análisis de la cinética del proceso de aparición de *hairy-roots* y la eficiencia de transformación.
- Para próximos experimentos deben incluirse dentro de la población de raíces transgénicas aquellas que presentan una emisión de fluorescencia intermedia.

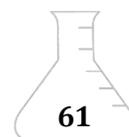


## 9. Anexo

En la tabla 14 se compararon los DAI de cada genotipo en los 3 ensayos. Se encontraron diferencias significativas en los DAI de los ensayos 1 y 3 en los genotipos Thorne y TJS2049, respectivamente.

**Tabla 14. Comparación de DAI para los genotipos Thorne, SO7\_6557 y TJS2049 en los 3 ensayos.** Se representan con letras distintas donde hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Genotipo	Ensayo	DAI
Thorne	1	10.9 A
Thorne	2	11.7 A B
Thorne	3	12.4 B
SO7_6557	1	13 A
SO7_6557	2	11.5 A
SO7_6557	3	13.8 B
TJS2049	1	11 A
TJS2049	2	10.5 A
TJS2049	3	13 B



## 10. Bibliografía

- Bahramnejad, B., Naji, M., Bose, R., Jha, S., 2019. A critical review on use of *Agrobacterium rhizogenes* and their associated binary vectors for plant transformation. *Biotechnol. Adv.* 37, 107405. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.06.004>
- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H., 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science.* 228, 1154–1160. <https://doi.org/10.1126/science.3890182>
- Barampuram S., Zhang, Z.J., 2011. Recent advances in plant transformation, in: *Plant chromosome engineering*, ed by James A Birchler. Humana Press, New Delhi, India, pp 1-35. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-957-4_1)
- Beltrán, J.P., 2005. La ingeniería genética de las plantas cultivadas, clave para mejorar la nutrición y la salud humanas. *An. la Real Acad. Nac. Farm.* 71, 587–608
- Bourret, R.B., Silversmith, R.E., 2010. Two-component signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 113–115. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.003>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.005>
- Cao, D., Hou, W., Song, S., Sun, H., Wu, C., et al., 2009. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 96, 45–52. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9458-x>
- Cardarelli, M., Spanò, L., De Paolis, A., Mauro, M.L., Vitali, G., Costantino, P., 1985. Identification of the genetic locus responsible for non-polar root induction by *Agrobacterium rhizogenes* 1855. *Plant Mol. Biol.* 5, 385–391. <https://doi.org/10.1007/BF00037559>
- Charity, J.A., Holland, L., Grace, L.J., Walter, C., 2005. Consistent and stable expression of the *nptII*, *uidA* and *bar* genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using nurse cultures. *Plant Cell Rep.* 23, 606–

616. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0851-6>

Chen, L., Cai, Y., Liu, X., Guo, C., Sun, S., et al., 2018. Soybean hairy roots produced *in vitro* by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Crop J.* 6, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.08.006>

Cho, H.J., Farrand, S.K., Noel, G.R., Widholm, J.M., 2000. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta* 210, 195–204. <https://doi.org/10.1007/PL00008126>

Clough, S.J., Bent, A.F., 1998. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x>

Collier, R., Fuchs, B., Walter, N., Lutke, W.K., Taylor, C.G., 2005. *Ex vitro* composite plants: An inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J.* 43, 449–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02454.x>

Conn, H.J., 1942. Validity of the genus *alcaligenes*. *J. Bacteriol.* 44, 353–360.

Cramer, C.L., Boothe, J.G., Oishi, K.K., 1999. Transgenic plants for therapeutic proteins: Linking upstream and downstream strategies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240, 95–118. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60234-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60234-4_5)

Darbani, B., Farajnia, S., Toorchi, M., Zakerbostanabad, S., Noeparvar, S., Stewart Jr., C.N., 2008. DNA-delivery methods to produce transgenic plants. *Biotechnol.* 7, 385–402. <https://doi.org/10.3923 / biotech.2008.385.402>

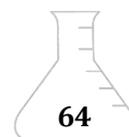
De Bolle, M.F.C., Butaye, K.M.J., Coucke, W.J.W., Goderis, I.J.W.M, Piet F.J. Wouters, P.F.J., et al., 2003. Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region on the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 165, 169–179. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00156-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00156-0)

DeCleene, M., DeLey, J., 1976. The host range of crown gall. *Bot. Rev.* 42, 389–466. <https://doi.org/10.1007/BF02860827>

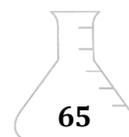
DeCleene, M., DeLey, J., 1981. The host range of infectious hairy-root. *Bot. Rev.* 47, 147–

194.

- DIEA 2016. Anuario estadístico. <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-deprogramacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016>
- Diouf, D., Gherbi, H., Prin, Y., Franche, C., Duhoux, E., Bogusz, D., 1995. Hairy root nodulation of *Casuarina glauca*: A system for the study of symbiotic gene expression in an actinorhizal tree. *Mol. Plant-Microbe Interact.* <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0532>
- Droste, A., Pasquali, G., Bodanese-Zanettini, M.H., 2000. Integrated bombardment and *Agrobacterium* transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Mol. Biol. Report.* 18, 51–59. <https://doi.org/10.1007/BF02825294>
- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, X., Olivares, J.E., Díaz-Camino, C., Santana, O., et al., 2006. *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: A tool for functional genomics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 1385–1393. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1385>
- Falasca, G., Reverberi, M., Lauri, P., Caboni, E., De Stradis, A., Altamura, M.M., 2000. How *Agrobacterium rhizogenes* triggers *de novo* root formation in a recalcitrant woody plant: An integrated histological, ultrastructural and molecular analysis. *New Phytol.* 145, 77–93. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00558.x>
- Flores-Félix, J.D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., Velázquez, E., 2019. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Syst Appl Microbiol.* 43:126046. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126046>
- Flores, H.E., Vivanco, J.M., Loyola-vargas, V.M., 1999. 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* 4:220-226. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(99\)01411-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(99)01411-9)
- Gad, A.E., Rosenberg, N., Altman, A., 1990. Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiol. Plant.* 79, 177–183. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb05883.x>
- Gao, C., Long, D., Lenk, I., Nielsen, K.K., 2008. Comparative analysis of transgenic tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated



- transformation and particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 27, 1601–1609. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0578-x>
- Gelvin, S.B., 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 223–256.
- Gelvin, S.B., 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 16–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16>
- Georgiev, M.I., Agostini, E., Ludwig-Müller, J., Xu, J., 2012. Genetically transformed roots: From plant disease to biotechnological resource. *Trends Biotechnol.* 30, 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.001>
- Gleba, Y., Klimyuk, V., Marillonnet, S., 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.002>
- Gleba, Y., Marillonnet, S., Klimyuk, V., 2004. Engineering viral expression vectors for plants: The “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>
- Granados, C.D., Chaparro-Giraldo, A., 2012. Métodos de transformación genética de plantas. *U.D.C.A Actual. Divulg. Científica* 15, 49–61.
- Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P.K., Rideau, M., Gantet, P., 2006. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.008>
- Hansen, G., Das, A., Chilton, M.D., 1994. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Plant Biol.* 91, 7603–7607. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7603>
- Hansen, J., Jørgensen, J.E., Stougaard, J., Marcker, K.A., 1989. Hairy roots - a short cut to transgenic root nodules. *Plant Cell Rep.* 8, 12–15. <https://doi.org/10.1007/BF00735768>
- Heldt, H.-W., Piechulla, B., 2011. Biotechnology alters plants to meet requirements of agriculture, nutrition and industry, in: *Plant Biochemistry*. Academic Press, pp 551–586.



<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384986-1.00022-3>

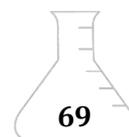
- Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H., 2000. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends Plant Sci. 5, 446–451. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01740-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01740-4)
- Hernandez-Garcia, C.M., Martinelli, A.P., Bouchard, R.A., J.Finer, J., 2009. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean. Plant Cell Rep. 837–849. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0681-7>
- Hiei, Y., Komari, T., 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 85, 271–283. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9069-8>
- Hienchee, M.A.W., Connor-Ward, D. V., Newell, C.A., McDonnell, R.E., Sato, S.J., et al., 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. Nat. Biotechnol. 6, 709–712. <https://doi.org/10.1038/nbt0988-1065>
- Hildebrand, E., 1934. Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. J. Agric. Res. 48, 857–885.
- Hwang, H.-H., Yu, M., Lai, E.-M., 2017. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. Arab. B. 15, e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
- Isayenkov, S., Mrosk, C., Stenzel, I., Strack, D., Hause, B., 2005. Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. Plant Physiol. 139, 1401–1410. <https://doi.org/10.1104/pp.105.069054>
- Jhansi Rani, S., Usha, R., 2013. Transgenic plants: Types, benefits, public concerns and future. J. Pharm. Res. 6, 879–883. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.08.008>
- Jia, Y., Yao, X., Zhao, M., Zhao, Q., Du, Y., et al., 2015. Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. Int. J. Mol. Sci. 16, 18522–18543. <https://doi.org/10.3390/ijms160818522>
- Jualang Azlan, G., Marziah, M., Radzali, M., Johari, R., 2002. Establishment of *Physalis*

- minima* hairy roots culture for the production of physalins. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 69, 271–278. <https://doi.org/10.1023/A:1015662118877>
- Kikkert, J.R., Vidal, J.R., Reisch, B.I., 2005. Stable transformation of plants cells by particle bombardment/bioplastics, in: *Transgenic Plants: Methods and protocols. Methods in Molecular Biology*, ed by Peña L. Humana Press, pp 61–78. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:061>
- Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C.D.T., Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., Gresshoff, P.M., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat. Protoc.* 2, 948–952. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.141>
- Keshavareddy, G., Kumar, A.R.V., S. Ramu, V., 2018. Methods of plant transformation- A review. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7, 2656–2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>
- Krassowska, W., Filev, P.D., 2007. Modeling electroporation in a single cell. *Biophys. J.* 92, 404–417. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.094235>
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Dosekocilova, A., Komis, G., Samaj, J., 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol. Adv.* 33, 1024–1042. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.012>
- Królicka, A., Staniszevska, I., Bielawski, K., Maliński, E., Szafranek, J., Lojkowska, E., 2001. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus*. *Plant Sci.* 160, 259–264. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00381-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00381-2)
- Liener, I.E., 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 34, 31-67. <https://doi.org/10.1080/10408399409527649>
- Lin, M.H., Gresshoff, P.M., Indrasumunar, A., Ferguson, B.J., 2011. PHairyRed: A novel binary vector containing the DsRed2 reporter gene for visual selection of transgenic hairy roots. *Mol. Plant* 4, 537–545. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq084>
- Liu, Y., Yang, H., Sakanishi, A., 2006. Ultrasound: Mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnol. Adv.* 24, 1–16.

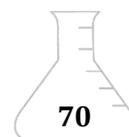
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.04.002>

- Maliga, P., 2004. Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 289–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141633>
- Manavalan, L.P., Guttikonda, S.K., Phan Tran, L.S., Nguyen, H.T., 2009. Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant Cell Physiol.* 50, 1260–1276. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp082>
- Marjamaa, K., Hildén, K., Kukkola, E., Lehtonen, M., Holkeri, H., et al., 2006. Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol. Biol.* 61, 719–732. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-0043-6>
- McBlain BA, Fioritto RJ, St Martin SK, Calip-Dubois AJ, Schmitthenner AF, et al., 2003. Registration of ‘Thorne’ Soybean. *Crop Sci.* 33, 6.
- Moeller, L., Wang, K., 2008. Engineering with precision: Tools for the new generation of transgenic crops. *Bioscience* 58, 391–401. <https://doi.org/10.1641/b580506>
- Mohammadi-Dehcheshmeh, M., Ebrahimie, E., Tyerman, S.D., Kaiser, B. N., 2014. A novel method based on combination of semi- *in vitro* and *in vivo* conditions in *Agrobacterium rhizogenes*-mediated hairy root transformation of Glycine species. *In Vitro Cell Dev-Pl.* 50, 282–291. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9575-z>
- Morikawa, H., Yamada, Y., 1985. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant Cell Physiol.* 26, 229–236. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076901>
- Morriss, S.C., Studham, M.E., Tylka, G.L., MacIntosh, G.C., 2017. Validation of a hairy roots system to study soybean-soybean aphid interactions. *PLoS One* 12, 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174914>
- Mugnier, J., 1988. Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* 7, 9–12. <https://doi.org/10.1007/BF00272966>
- Ososki, A.L., Kennelly, E.J., 2003. Phytoestrogens: A review of the present state of

- research. *Phyther. Res.* 17, 845–869. <https://doi.org/10.1002/ptr.1364>
- Ozyigit, I.I., Dogan, I., Artam Tarhan E., 2013. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and its biotechnological applications in crops, in: *Crop improvement: New approaches and modern techniques*, ed by K. R. Hakeem et al. Springer. pp 1-48. [https://doi.org/DOI 10.1007/978-1-4614-7028-1\\_1](https://doi.org/DOI 10.1007/978-1-4614-7028-1_1)
- Paz, M.M., Martinez, J.C., Kalvig, A.B., Fonger, T.M., Wang, K., 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 25, 206–213. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0048-7>
- Porter, J.R., Flores, K., 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10, 387–421. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689109382318>
- Quiroz-Chávez, J., García-Pérez, L.M., Quiroz-Figueroa, F.R., 2012. Mejoramiento vegetal usando genes con funciones conocidas. *Ra Ximhai* 8, 79–92. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.08.jq>
- Rao, A.Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A.A., et al., 2009. The myth of plant transformation. *Biotechnol. Adv.* 27, 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.028>
- Rao, S.R., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20, 101–153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1)
- Richards, H.A., Halfhill, M.D., Millwood, R.J., Stewart, C.N., 2003. Quantitative GFP fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 22, 117–121. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0638-1>
- Robert, G., Muñoz, N., Alvarado-affantranger, X., Saavedra, L., Davidenco, V., 2018. Phosphatidylinositol 3-kinase function at very early symbiont perception: A local nodulation control under stress conditions? *J. Exp. Bot.* <https://doi.org/10.1093/jxb/ery030>



- Sakai, T., Kogiso, M., 2008. Soy isoflavones and immunity. *J. Med. Investig.* 55, 167–173. <https://doi.org/10.2152/jmi.55.167>
- Savka, M.A., Ravillion, B., Noel, G.R., Farrand, S., 1990. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode. *Phytopathology* 80, 503– 508. <https://doi.org/10.1094/Phyto-80-503>
- Sharma, K.K., Bhatnagar-Mathur, P., Thorpe, T.A., 2005. Genetic transformation technology: Status and problems. *In Vitro Cell Dev-PI* 41, 102–112. <https://doi.org/10.1079/IVP2004618>
- Stacey, G., Parrott, W.A., Vodkin, L., Shoemaker, R.C., 2008. Draft Plan for Soybean Genomics National Science Foundation-Sponsored Workshop Report . Draft Plan for Soybean Genomics 1. *Plant Physiol* 135, 59–70. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037903.1>
- Stewart, C.N., Touraev, A., Citovsky, V., Tzfira, T., (Ed.). 2011. *Plant Transformation Technologies*. Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9780470958988>
- Tague, B.W., Mantis, J., 2006. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.* 323, 215–223. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:215>
- Tepfer, D., Metzger, L., Prost, R., 1989. Use of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* in rhizosphere research: applications in studies of cadmium assimilation from sewage sludges. *Plant Mol. Biol.* 13, 295–302. <https://doi.org/10.1007/BF00025317>
- Travella, S., Ross, S.M., Harden, J., Everett, C., Snape, J.W., Harwood, W.A., 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Rep.* 23, 780–789. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0892-x>
- Tzfira, T., Li, J., Lacroix, B., Citovsky, V., 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models. *Trends Genet.* 20, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.06.004>
- Umezawa, T., Sakurai, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Seki, M., et al., 2008. Sequencing and



- analysis of approximately 40,000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res.* 15, 333–346. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn024>
- Vasil, I.K., 2008. A short history of plant biotechnology. *Phytochem. Rev.* 7, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9075-z>
- Veena, V., Taylor, C.G., 2007. *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cell Dev-Pl* 43, 383–403. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9096-8>
- Winans, S.C., 1992. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions 56, 12–31.
- Wright, M.S., Koehler, S.M., Hinchee, M.A., Carnes, M.G., 1986. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max*. *Plant Cell Rep.* 5, 150–154. <https://doi.org/10.1007/BF00269257>
- Wroblewski, T., Tomczak, A., Michelmore, R., 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnol. J.* 3, 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00123.x>
- Xiang, T., Wang, S., Li, Y., Zhang, T., Wu, D., Zhou, S., 2016. Cucumopine type *Agrobacterium rhizogenes* K599 (Ncpcb2659) T-DNA mediated plant transformation and its application. *Bangladesh J. Bot.* 45, 935–945.
- Yamada, T., Takagi, K., Ishimoto, M., 2011. Recent advances in soybean transformation and their application to molecular breeding and genomic analysis. *Breed. Sci.* 61, 480–494. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.480>
- Yibrah, H.S., Grönroos, R., Lindroth, A., Franzén, H., Clapham, D., Von Arnold, S., 1996. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated induction of adventitious rooting from *Pinus contorta* hypocotyls and the effect of 5-azacytidine on transgene activity. *Transgenic Res.* 5, 75–85. <https://doi.org/10.1007/BF01969425>
- Yoon, C.S., Park, J.H., 2010. Ultrasound-mediated gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 7, 321–330. <https://doi.org/10.1517/17425241003596329>
- Zhang, Y., Yin, X., Yang, A., Li, G., Zhang, J., 2005. Stability of inheritance of transgenes in



maize (*Zea mays L.*) lines produced using different transformation methods. *Euphytica* 144, 11–22. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-4560-1>

Ziemienowicz, A., 2014. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.004>

Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F., 1974. Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophys. J.* 14, 881–899. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(74\)85956-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(74)85956-4)

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., Zambryski, P., 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant J.* 23, 11–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00808.x>

