

Optimización de la Transformación Genética Transitoria Mediada por *Agrobacterium* en Especies Frutales Tropicales

N. G. Franco Jiménez ^{#1}, M. G. Rodríguez Gandarilla ^{#2}, J. A. Massange Sánchez ^{#3}, R. Urrea López ^{#4}

[#] Unidad de Biotecnología Vegetal, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Jalisco, México.

¹ nafranco_al@ciatej.edu.mx, ² myrirod@gmail.com, ³ jmassange@ciatej.mx, ⁴ rurrea@ciatej.mx

Resumen—El comercio global de frutas tropicales crece año con año. A pesar de la importancia económica que representa el cultivo de estas plantas y que algunas especies ya cuentan con su genoma completamente secuenciado, la investigación en genómica funcional y su aplicación en el mejoramiento genético es limitada, principalmente por la dificultad en la transformación genética. Por lo anterior, nuestro objetivo ha sido optimizar parámetros de sobreexpresión transitoria de genes mediada por *Agrobacterium* en frutales tropicales de importancia económica, como son aguacate, cacao y limón mexicano. Se evaluaron diferentes métodos de infiltración, cepas de *Agrobacterium*, pretratamientos de las hojas y el efecto de coadyuvantes como fitohormonas, surfactantes e inductores de genes de virulencia. Se utilizó el reportero visual *RUBY*, que produce betalainas, para cuantificar la eficiencia de los tratamientos. Nuestros resultados demuestran por primera vez la utilidad del reportero visual *RUBY* en las tres especies. La agroinfiltración al vacío fue el tratamiento más efectivo en aguacate y cacao, en estas especies la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 generó mayor acumulación de betalainas; mientras que en hojas de limón mexicano, la mejor cepa fue GV3101. En aguacate, el tratamiento con microheridas y el uso de ácido jasmónico (250 μ M) mostró un efecto sinérgico. En hojas maduras de limón mexicano, la combinación de microheridas, ditiotreitól (100 μ M) y el surfactante Silwet (0.02%) incrementó significativamente la expresión transitoria. Estos resultados representan un avance clave para el estudio funcional de genes en frutales tropicales y sientan las bases para su eventual mejoramiento genético.

Palabras clave— Transformación genética, Expresión transitoria, *Agrobacterium*, especies perennes.

Abstract— Global trade in tropical fruits is growing year after year. Despite the economic importance of the cultivation of these plants and the fact that some species already have their genome completely sequenced, research in functional genomics and its application in genetic improvement is limited, mainly due to the difficulty in genetic transformation. Therefore, our objective was to optimise parameters of *Agrobacterium*-mediated transient gene overexpression in economically important tropical fruit trees, such as avocado, cocoa and Mexican lime. Different infiltration methods, *Agrobacterium* strains, leaf pre-treatments and the effect of adjuvants such as phytohormones, surfactants and virulence gene inducers were evaluated. The visual reporter *RUBY*, which produces betalains, was used to quantify the efficiency of the treatments. Our results demonstrate for the first time the usefulness of the visual reporter *RUBY* in all three species. Vacuum agroinfiltration was the most effective treatment in avocado and cocoa; in these

species, *Agrobacterium* strain LBA4404 generated higher betalains accumulation; while in Mexican lemon leaves, the best strain was GV3101. In avocado, treatment with micro-wounds and the use of jasmonic acid (250 μ M) showed a synergistic effect. In mature Mexican lemon leaves, the combination of micro-wounds, dithiothreitol (100 μ M) and Silwet surfactant (0.02%) significantly increased transient expression. These results represent a key advance for the functional study of genes in tropical fruit trees and lay the groundwork for their eventual genetic improvement.

Keywords— Genetic transformation, Transient expression, *Agrobacterium*, perennial species.

I. INTRODUCCIÓN

La transformación genética de plantas ha sido una herramienta fundamental para la investigación en biología molecular vegetal, el mejoramiento genético y el estudio funcional de genes. No obstante, muchas especies, entre ellas las leñosas perennes y tropicales, presentan una alta recalcitrancia a la transformación estable. Lo que ha limitado los estudios de biología molecular para la generación de nuevos conocimientos o su mejoramiento genético.

La transformación genética transitoria permite el estudio de la función y regulación génica de manera más rápida y sencilla que la transformación estable, evitando la baja eficiencia de regeneración de plantas transgénicas y los laboriosos procedimientos de cultivo de tejidos, que en muchas especies son ineficientes o inviables. Aunque las especies modelo se utilizan comúnmente para estudios de expresión transitoria, la sobreexpresión heteróloga no siempre es apropiada, ya que algunas vías moleculares son únicas de ciertas especies [1]. Por lo tanto, un método fiable de transformación transitoria en tejidos propios de la especie, como las hojas, es valioso.

En este contexto, la transformación transitoria mediada por *Agrobacterium tumefaciens* surge como una alternativa rápida, versátil y de bajo costo para la expresión de genes sin necesidad de la integración genómica permanente, aprovechando la capacidad natural de *Agrobacterium* de transferir genes de manera horizontal [2]. Esta estrategia permite evaluar de manera directa la expresión de genes de interés, realizar estudios de localización subcelular, interacciones proteicas y análisis de promotores, sin requerir regeneración por cultivo *in vitro*. Sin embargo, la eficiencia

de esta metodología puede variar ampliamente entre especies, dependiendo de factores como la edad del tejido, el tipo de infiltración, el uso de fitohormonas, surfactantes, inductores de genes *vir*, o el pretratamiento físico de los tejidos [3].

Nuestro trabajo tiene como propósito contribuir al avance del conocimiento en biotecnología vegetal aplicada a cultivos tropicales mediante la optimización de metodologías de transformación genética transitoria, adaptadas a las características fisiológicas y anatómicas de tres especies frutales de gran relevancia agroindustrial.

A continuación, presentamos la optimización de metodologías para la transformación genética transitoria de hojas mediada por *Agrobacterium*, en aguacate (*Persea americana*), cacao (*Theobroma cacao*) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), superando la recalcitrancia natural de estas especies, para aportar soluciones a los principales retos técnicos que enfrentan estas especies.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de aguacate (*P. americana*), cacao (*T. cacao*) y limón mexicano (*C. aurantifolia*) se cultivaron en invernadero en CIATEJ (Zapopan, Jalisco, México). El vector binario 35S:*RUBY* se usó como reportero para la evaluación de la eficiencia de la sobreexpresión de genes en cada una de las plantas, este vector codifica para las enzimas *CYP76AD1*, *DODA* y una *glucosiltransferasa* necesarias para la biosíntesis del pigmento betalainas a partir de tirosina, lo que permite la visualización directa de la transformación mediante la acumulación de pigmentos rojos. El vector fue una donación del Dr. Yunde Zhao (plásmido Addgene #160908 <https://www.addgene.org/160908/>) [4]. El vector fue clonado mediante choque térmico en bacterias quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α y crecidas en medio Luria-Bertani (LB) con el antibiótico espectinomycin.

Se utilizaron las cepas de *A. tumefaciens* GV3101, AGL1 y LBA4404. El vector 35S:*RUBY* fue introducido en las distintas cepas de *A. tumefaciens* mediante electroporación. Las cepas GV3101 y AGL1 fueron cultivadas en agitación a 28°C en medio LB, y en medio Yeast Malt (YM) LBA4404, esta última para evitar la aglomeración, todos los medios de cultivo fueron suplementados con los respectivos antibióticos como se muestra en la TABLA I.

Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica cercana a 1.6, midiendo su absorbancia por espectrofotómetro a 600nm (OD₆₀₀), las células se cosecharon por centrifugación, removiendo totalmente el medio de cultivo, y se resuspendieron a una densidad óptica de OD₆₀₀ 0.6 en un medio de infiltración (10mM MES, MgCl₂, a pH 5.7), el cual favorece la transferencia de T-DNA de *Agrobacterium* a la planta [5]. Además, se añadió acetosiringona 200 μ M, este compuesto fenólico es reconocido por la bacteria para activar los genes de virulencia. Posteriormente esta suspensión de *Agrobacterium* se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche

previo a la agroinfiltración. En los casos donde se probaron diferentes coadyuvantes como fitohormonas (ácido jásmonico), surfactantes (silwet) e inductores de genes de virulencia como el ditiotreitol (DTT), estos coadyuvantes se agregaron a la suspensión de *Agrobacterium* justo antes de la infiltración.

Las hojas fueron sometidas a agroinfiltración por dos métodos: (i) infiltración por jeringa sin aguja, y (ii) infiltración por vacío. Esta última utilizando un desecador de laboratorio, como cámara de vacío y una bomba de vacío capaz de alcanzar hasta -0.07 MPa. La expresión del gen *RUBY* fue evaluada visualmente por la acumulación del pigmento rojo (betalainas) y con el programa de análisis de imágenes ImageJ y prueba t de Student.

Como control positivo se agroinfiltraron plántulas de tabaco, la cual tiene una alta eficiencia de sobreexpresión de *RUBY*.

TABLA I
CEPAS DE *Agrobacterium tumefaciens* EVALUADAS Y LOS RESPECTIVOS ANTIBIÓTICOS NECESARIOS PARA SU CRECIMIENTO.

Antibiótico	Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
	AGL1	GV3101	LBA4404
Rifampicina	15 μ g/ml	15 μ g/ml	15 μ g/ml
Carbenicilina	50 μ g/ml		
Gentamicina		50 μ g/ml	
Estreptomycin			50 μ g/ml
Espectinomycin	50 μ g/ml	50 μ g/ml	50 μ g/ml

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema reportero *RUBY* fue efectivo para la detección visual de la transformación transitoria en las tres especies como se muestra en la Fig. 1. Este reportero destaca sobre otros reporteros tradicionales como GFP o GUS por no requerir de equipos ni reactivos especializados para su evaluación, ya que se puede apreciar de forma rápida y económica a simple vista. La acumulación de betalainas, parecido en color a las antocianinas pero diferente en su estructura química, es una herramienta de utilidad para la optimización de protocolos de transformación. Aunque no para estudios más detallados de localización subcelular.

Entre las cepas de *Agrobacterium* evaluadas GV3101 mostró mayor eficacia en la transformación de hojas de limón mexicano, mientras que LBA4404 fue más eficiente en aguacate y cacao [6]. Cuando se busca optimizar la transformación genética mediada por *Agrobacterium* es indispensable probar diferentes cepas para encontrar la que sea más virulenta a la planta en cuestión, debido a la dependencia al genotipo.

La infiltración por vacío resultó esencial en cacao y aguacate, en contraste, en limón mexicano la infiltración fue posible mediante la presión ejercida con jeringa, tanto en hojas jóvenes como en hojas maduras. La eficiencia de transformación por vacío fue máxima con -0.07 MPa, con

tres ciclos de 5 minutos de vacío seguido de una lenta represurización. Durante la agroinfiltración por vacío la primera etapa fuerza la salida del aire, presente en el mesófilo de las hojas, a través de los estomas y las heridas, razón por la que se observan burbujas alrededor de las hojas sumergidas; es durante la segunda etapa, de represurización que la suspensión de *Agrobacterium* es forzada a entrar al mesófilo donde anteriormente había aire [7].

En las tres especies, se observó una disminución en la eficiencia de transformación de las hojas maduras. Sin embargo, en limón, la aplicación del pretatamiento con

microheridas, DTT (100 μ M) y Silwet (0.02%) mejoró significativamente la expresión en hojas maduras de cinco semanas [8].

En aguacate la aplicación de la fitohormona ácido jasmónico (AJ) por sí sola no tuvo un efecto significativo al comparar las áreas de betalainas. Sin embargo, la interacción del pretatamiento de microheridas y 250 μ M de AJ actuaron de manera sinérgica para mejorar significativamente la expresión transitoria y por tanto la acumulación de betalainas hasta tres veces más, particularmente alrededor de las microheridas [9].

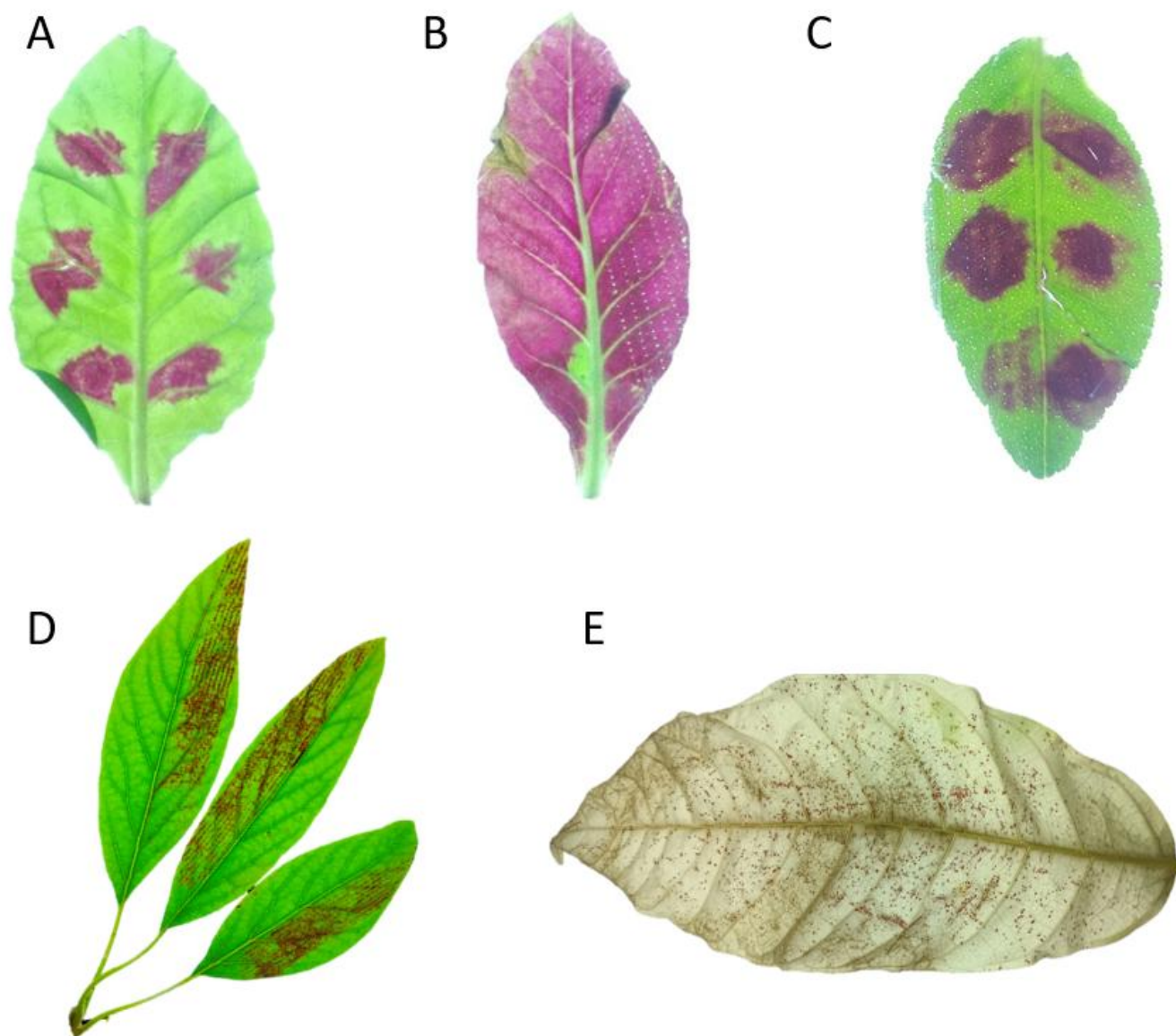


Fig. 1. Acumulación de betalainas en hojas por la sobreexpresión transitoria de 35S:*RUBY*. (A) Hoja de tabaco agroinfiltrada con jeringa. (B) hoja de tabaco agroinfiltrada con vacío. (C) Hoja de limón mexicano agroinfiltrada con jeringa. (D) Hojas de aguacate agroinfiltradas con vacío. (E) Hoja de cacao agroinfiltrada con vacío.

IV. CONCLUSIÓN

La combinación de factores físicos y químicos adecuados, junto con la aplicación de técnicas como la infiltración por vacío, permite obtener altos niveles de expresión transitoria en tejidos tradicionalmente difíciles de transformar.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CIATEJ por el apoyo brindado. N.G.F.J. (CVU: 1165982) agradece la beca de maestría de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI). R.U.L. agradece el apoyo del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL), y de la Secretaría de Innovación Ciencia y Tecnología (SICYT), Jalisco, México (Proyecto 7270-2018).

REFERENCIAS

- [1] P. A. Manavella and R. L. Chan, "Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: Applications for gene expression and silencing studies," *Nature Protocols*, vol. 4, no. 11, pp. 1699–1707, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.178>.
- [2] B. Lacroix and V. Citovsky, "Pathways of DNA Transfer to Plants from *Agrobacterium tumefaciens* and Related Bacterial Species," *Annual Review of Phytopathology*, vol. 57, pp. 231–251, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101>.
- [3] D. V. Cao, R. S. Pamplona, J. Kim, Y. Kyoung Oh, S.-K. Cho, J. Ahn, S.-W. Yang, K.-Z. Riu, and K.-H. Boo, "Optimization of *Agrobacterium* -mediated transient expression of heterologous genes in spinach," *Plant Biotechnology Reports*, vol. 11, no. 6, pp. 397–405, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11816-017-0457-4>.
- [4] Y. He, T. Zhang, H. Sun, H. Zhan, and Y. Zhao, "A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation," *Horticulture Research*, vol. 7, no. 1, pp. 1–6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00390-1>.
- [5] J. A. Lindbo, "TRBO: A high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector," *Plant Physiology*, vol. 145, no. 4, pp. 1232–1240, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>.
- [6] H. E. Hernández-Delgado, J. A. Zamora-Briseño, L. J. Figueroa-Yáñez, and R. Urrea-López, "Vacuum-Forced Agroinfiltration for *In planta* Transformation of Recalcitrant Plants: Cacao as a Case Study," *JoVE*, e66024, pp. 1–16, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3791/66024>.
- [7] I. A. Chincinska, "Leaf infiltration in plant science: old method, new possibilities," *Plant Methods*, vol. 17, no. 83, pp. 1–21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00782-x>.
- [8] J. A. Ramírez-Preciado, M. G. Rodríguez-Gandarilla, E. Tapia-Campos, and R. Urrea-López, "Enhancing transient gene expression in mature leaves of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) through *Agrobacterium*-mediated transformation," *Plant Biotechnology Reports*, Apr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11816-025-00966-0>.
- [9] J. A. Salazar-González, M. Castro-Medina, L. E. Bernardino-Rivera, E. Martínez-Terrazas, S. A. Casson, and R. Urrea-López, "In-planta transient transformation of avocado (*Persea americana*) by vacuum agroinfiltration of aerial plant parts," *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 152, pp. 635–646, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02436-9>.