

Hojas Separadas como Modelo Funcional para Estudios Moleculares en Aguacate: Prueba de Concepto para VIGS

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

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

¹ nafrancoal@ciatej.edu.mx, ² jmassange@ciatej.mx, ³ rurrea@ciatej.mx

Resumen— El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un cultivo de alta relevancia económica en México, pero presenta grandes retos para el estudio de la función génica debido a su naturaleza recalcitrante a la transformación genética y a su propagación vegetativa. Ante la ausencia de reportes sobre silenciamiento génico en esta especie, este estudio propone una estrategia novedosa basada en el uso de hojas separadas como sistema experimental para validar la viabilidad de ensayos de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). El objetivo fue evaluar la supervivencia fisiológica de las hojas separadas bajo distintas condiciones que permitan su uso en ensayos moleculares transitorios. Se evaluaron de forma cualitativa cuatro aspectos: (1) tiempo máximo de supervivencia de hojas separadas; (2) efecto de la suplementación vía pecíolo con agua o benziladenina (BA); (3) viabilidad funcional a través de la desetiolación o enverdecimiento; y (4) respuesta fisiológica a la agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. Los resultados mostraron que las hojas maduras presentan mayor viabilidad que las jóvenes, y que el suministro de BA no tuvo efectos significativos sobre la longevidad del tejido. Se observó enverdecimiento gradual en hojas etioladas, lo que sugiere actividad metabólica en hojas separadas. Asimismo, la agroinfiltración con DO₆₀₀ 0.6 permitió mantener la viabilidad sin inducir necrosis severa, en contraste con DO₆₀₀ 1.2. Estos resultados validan la factibilidad del uso de hojas separadas de aguacate como un sistema alternativo para la evaluación rápida de estrategias de silenciamiento génico en especies difíciles de transformar.

Palabras clave— Hojas separadas, aguacate, VIGS, desetiolación

Abstract— Avocado (*Persea americana* Mill.) is a crop of high economic relevance in Mexico, but it presents significant challenges for gene function studies due to its recalcitrant nature to genetic transformation and its vegetative propagation. In the absence of reports on gene silencing in this species, this study proposes a novel strategy based on the use of detached leaves as an experimental system to assess the feasibility of virus-induced gene silencing (VIGS) assays. The objective was to evaluate the physiological survival of detached avocado leaves under different conditions that could support their use in transient molecular assays. Four aspects were evaluated qualitatively: (1) maximum survival time of detached leaves; (2) the effect of direct supplementation via petiole with water or benzyladenine (BA); (3) functional viability through greening (de-etiolation); and (4) physiological response to agroinfiltration with *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that mature leaves exhibited higher viability than young ones, and that BA supplementation had no significant effect on tissue

longevity. Gradual greening was observed in etiolated leaves, suggesting metabolic activity of detached leaves. Furthermore, agroinfiltration with *A. tumefaciens* at an optical density of DO₆₀₀ 0.6 maintained leaf viability without causing severe necrosis, in contrast to DO₆₀₀ 1.2. These findings validate the feasibility of using detached avocado leaves as an alternative system for the rapid evaluation of gene silencing strategies in genetically recalcitrant plant species.

Keywords— Detached leaves, avocado, VIGS, de-etiolation

I. INTRODUCCIÓN

El aguacate (*P. americana* Mill.) es la estrella del portafolio agrícola de México, con más de \$3,000 millones de dólares en exportación cada año [1]. Sin embargo, a pesar de la importancia económica del cultivo en la actualidad no hay ningún reporte de silenciamiento de genes para esta planta, lo que limita realizar estudios de caracterización funcional de genes [2].

Una de las limitantes para realizar estudios de silenciamiento en aguacate es la naturaleza recalcitrante de la especie a transformación y regeneración. Con el fin de soslayar esas limitantes un enfoque transitorio podría ser una alternativa más rápida y menos complicada que la transformación estable. El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS por sus siglas en Inglés) permite un enfoque transitorio [3], pero se prueba en plantas completas, generalmente plántulas de tamaño pequeño, en las que el silenciamiento de genes reporteros usualmente se observa varias semanas después en los nuevos tejidos. Pero el enfoque tradicional de VIGS no es práctico para frutales tropicales como el aguacate que tiene plantas de gran tamaño, que no se produce por semillas sino por injerto, y con una naturaleza recalcitrante a la transformación y al cultivo *in vitro*. En nuestro grupo de investigación tenemos experiencia exitosa evaluando la sobreexpresión transitoria de genes en hojas separadas de aguacate [4]. Razón por la que proponemos como alternativa un enfoque que no tiene precedentes en VIGS, en el cual la evaluación de la eficiencia del silenciamiento en aguacate se realizará en hojas separadas. Para ello es necesario primero evaluar la viabilidad de las hojas después de cortadas porque se requiere tejido fisiológicamente activo por varios días, incluso semanas, varias veces más que el tiempo en el que evaluamos previamente la sobre-expresión.

Adicionalmente, una opción para evaluar el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en hojas separadas, en menor tiempo, y sin depender del desarrollo de nuevos tejidos en plantas inoculadas, podría ser mediante la desetiología o enverdecimiento [5]. Dado que el silenciamiento del gen endógeno reportero fitoeno desaturasa (PDS por sus siglas en Inglés) interfiere con la síntesis de carotenoides, esenciales para la protección de la clorofila, planteamos la hipótesis de que las hojas silenciadas mantendrán un fenotipo tipo albino, en contraste con las hojas control, que enverdecerán [6]. Lo anterior podría acentuarse exponiendo las hojas a una intensidad luminosa alta en la cual los carotenos son mayormente demandados para proteger la clorofila [7].

Por lo anterior realizamos una evaluación cualitativa de los siguientes objetivos 1. Explorar el tiempo máximo de supervivencia de hojas separadas de aguacate; 2. Evaluar el efecto del suministro directo, vía peciolo, de agua o de una citoquinina sintética sobre la supervivencia de hojas separadas [8]; 3. Observar la desetiología o enverdecimiento en hojas separadas de aguacate; 4. Dado que una de las principales formas de transformación de genes en aguacate es mediada por *Agrobacterium* se determinará el efecto de la suspensión de *Agrobacterium* infiltrado en hojas separadas de aguacate incubadas por varios días. Estos resultados son determinantes para avanzar en una prueba de concepto inédita en la que se podría utilizar hojas separadas para evaluar la viabilidad de silenciamiento VIGS, lo que abriría nuevas oportunidades para la caracterización funcional de especies de importancia agronómica, soslayando su naturaleza recalcitrante.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron hojas de aguacate (*P. americana* Mill.) de cuatro diferentes estadios de desarrollo, siendo las más jóvenes clasificadas como estadio A, hasta las hojas maduras como estadio D, en duplicado por cada estadio. Las hojas se recolectaron de plantas cultivadas en condiciones semicontroladas dentro del invernadero de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Zapopan, Jalisco, México.

Dado que para evaluar el silenciamiento de genes en hojas se requiere que el tejido este fisiológicamente activo primero monitoreamos el tiempo máximo de supervivencia de las hojas separadas (objetivo 1), para ello se muestrearon diferentes hojas, jóvenes y maduras, eligiendo únicamente aquellas sanas, sin presencia de plagas, síntomas de enfermedades o signos visibles de estrés fisiológico, como clorosis, necrosis o deshidratación. Cada hoja fue cortada cuidadosamente en la base del peciolo y colocadas inmediatamente dentro de cajas plásticas transparentes (con tapa), sobre un papel humedecido con agua destilada estéril, manteniendo la orientación del haz de la hoja hacia arriba y evitando el contacto entre hojas. Las cajas fueron selladas con película plástica transparente (VitaFilm) para conservar una

atmósfera húmeda en el interior para ayudar a conservar lo más posible el tejido. Las muestras se llevaron a incubación en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo a 25°C y 16 horas de luz y 8 de oscuridad con una intensidad luminosa de 2.5 Klux. Las hojas fueron monitoreadas diariamente, y aquellas que presentaban signos de deterioro se retiraban, para prevenir la proliferación de esporas y el posible daño de las demás hojas; el papel se volvía a humedecer cuando era necesario, para mantenerlas en condiciones de alta humedad relativa y evitar su deshidratación. Las cajas plásticas transparentes fueron previamente desinfectadas lavándolas con agua y jabón, humedecidas con etanol al 70%, enjuagar con agua destilada, luego con cloro y finalmente con agua destilada luego se dejaron secar en una superficie limpia.

Para evaluar el objetivo 2, se muestrearon hojas de aguacate en invernadero y cada una de ellas se colocó inmediatamente en un micro-tubo de 1.5mL con agua o benziladenina (BA) 0.22 mM [8], sumergiendo una parte del peciolo y sellando con Parafilm para evitar el derrame al colocar la hoja sobre el papel humedecido y se incubaron bajo las condiciones descritas en el anterior objetivo.

Para evaluar el objetivo 3, primero se sometieron a etiolación plantas de aguacate ingresándolas en una cámara completamente oscura durante un periodo de aproximadamente 2 a 3 semanas [5]. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron hojas etioladas, las cuales presentan un fenotipo albino, y se incubaron bajo las mismas condiciones como se describió para el objetivo 1, es decir sin sumergir el peciolo en agua o BA.

Finalmente, para evaluar el objetivo 4, la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 se cultivó en agitación a 28°C en medio Yeast Malt (YM) suplementado con los antibióticos: rifampicina 15 µg/ml, y Estreptomicina 50 µg/ml. Una vez que alcanzó una densidad óptica cercana a 1.6, midiendo su absorbancia a 600nm (DO₆₀₀), las células se cosecharon por centrifugación, removiendo totalmente el medio de cultivo, y resuspendiéndolas a las diferentes densidades ópticas DO₆₀₀ 0.6 y 1.2 en un medio de infiltración 10mM MES, MgCl₂, a pH 5.7, y añadiendo 200 µM de acetosiringona un compuesto fenólico para activar los genes de virulencia, y dejando la suspensión de *Agrobacterium* en oscuridad a temperatura ambiente de un día para otro antes de la agroinfiltración [9]. Las hojas fueron sometidas a agroinfiltración mediante vacío, con una bomba de vacío las hojas se sumergieron en la suspensión de *Agrobacterium* y se aplicó vacío hasta -0.07 MPa, por 5 minutos y luego se represurizó lentamente y se repitió en dos ocasiones más los ciclos de vacío y represurización. Una vez agroinfiltradas las hojas fueron enjuagadas con agua destilada estéril para eliminar el exceso de bacterias superficiales y colocadas inmediatamente sobre papel húmedo en cajas plásticas, y se incubaron bajo las condiciones previamente descritas, sin sumergir el peciolo en

agua o BA. Se evaluaron diariamente signos de necrosis, y las hojas con señales de deterioro se removían para evitar la proliferación de esporas y el posible daño al resto del material. Como blanco se infiltraron las hojas con el mismo buffer pero sin *Agrobacterium*.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el objetivo 1, se exploró el tiempo máximo de supervivencia de las hojas separadas de aguacate colocadas sobre papel húmedo en cajas selladas, estas presentaron variabilidad en su supervivencia según su estadio de desarrollo. Se observó que las hojas más jóvenes comenzaron a mostrar pérdida de turgencia a partir de la primera semana, mientras que las hojas maduras a simple vista no (TABLA I). Posiblemente debido a una menor actividad metabólica, lo que retrasa la senescencia.

TABLA I
TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DE LAS HOJAS SEPARADAS DE AGUACATE
SOMETIDAS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. COLOR VERDE
SUPERVIVENCIA 2 DE 2, ROSADO 1 DE 2, ROJO 0 DE 2

Tratamiento	Estadio de hoja	Días de supervivencia						
		10	15	20	25	30	35	40
Obj. 1	A	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	B	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	C	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosado	Rosado
	D	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Obj. 2	A	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	B	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	C	Verde	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	D	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Obj. 3	A	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	B	Verde	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	C	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosado	Rosado
	D	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde
Obj. 4	A	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	B	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado	Rosado
	C	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosado	Rosado	Rosado
	D	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Rosado

La validación de estas condiciones de viabilidad es fundamental para estudios que requieren tejido fisiológicamente activo por varios días, como los ensayos de silenciamiento génico mediante VIGS. Tal como se señala en *VIGS Goes Viral* [3], el éxito del silenciamiento depende en gran medida del estado fisiológico del tejido, siendo el colapso celular una de las causas más frecuentes de fallos en la expresión del vector. Por ello, establecer un sistema base confiable con hojas separadas es un paso necesario para optimizar herramientas genéticas en especies recalcitrantes como el aguacate.

En el objetivo 2, la evaluación entre hojas suplementadas con agua destilada o benziladenina (BA) no mostró diferencias en términos de duración de la turgencia o preservación del color foliar en comparación con hojas no suplementadas. Las citoquininas como la BA han sido utilizadas para retrasar la senescencia en otros sistemas [10], en nuestro caso no se observaron beneficios claros por su aplicación (TABLA I). Esto podría deberse a diferentes factores como la concentración empleada, o la limitada absorción por el pecíolo cortado.

La supervivencia de hojas separadas etioladas de aguacate fue similar a las no etioladas del objetivo 1 (TABLA I). Sin embargo, nuestra observación de la desetiolación o enverdecimiento para el objetivo 3 resultó prometedora para nuestra propuesta, porque el cambio de coloración en la hoja se da lentamente de forma gradual (Fig. 1), lo que sugiere una reactivación del aparato fotosintético, indicando que las células foliares permanecen metabólicamente activas después de que fueron cortadas. Esta observación respalda el uso de hojas separadas como sistema modelo para estudios de expresión/silenciamiento génico transitorio, especialmente aquellos regulados por luz.

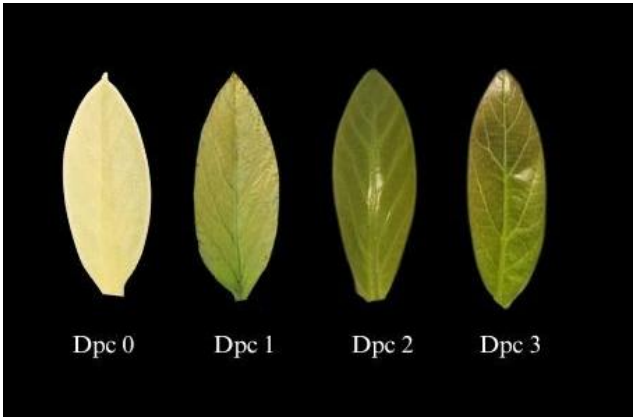


Fig. 1. Ejemplo del proceso de desetiolación o enverdecimiento observado en hojas separadas de aguacate, del día post corte (Dpc) 0 al día 3.

Finalmente, en el objetivo 4 se observó que la suspensión de *Agrobacterium* infiltrado en hojas separadas de aguacate sí tiene un efecto. Particularmente en hojas jóvenes independientemente de la densidad óptica. La respuesta en hojas maduras depende de la DO utilizada. Con DO₆₀₀ de 1.2 se observaron síntomas evidentes de necrosis en zonas infiltradas, particularmente en hojas jóvenes. En cambio, las hojas tratadas con DO₆₀₀ de 0.6 mostraron una mejor conservación de su estructura, con mínima necrosis localizada y turgencia mantenida por un mayor tiempo (TABLA I). Posiblemente la menor DO no es capaz de inducir respuestas de defensa o hipersensibilidad excesiva.

IV. CONCLUSIÓN

El rápido deterioro de las hojas separadas de aguacate en su estadio joven las excluye de pruebas de VIGS que requieren de tiempo para ver el silenciamiento del gen reportero. El mayor potencial del uso de hojas separadas de aguacate para VIGS se observó en hojas etioladas en las que la desetiolación o enverdecimiento se da en un transcurso de 3 días. En ese caso tal vez sea necesario agroinfiltrar los vectores virales varios días antes del corte y exposición a la luz, para que tenga lugar la transferencia del T-DNA y la replicación de las partículas virales. En lugar de hacerlo hasta que se hayan cortado las hojas. Este trabajo constituye un primer paso hacia el desarrollo de una plataforma basada en hojas separadas para estudios funcionales en aguacate, con aplicación futura en herramientas como VIGS.

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 COECYTJAL, y la SICYT, Jalisco (Proyecto 7270-2018).

REFERENCIAS

- [1] SIAP, "Panorama-Agroalimentario 2018-2024", Ciudad de México, 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/dgsiap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>.
- [2] D. I. Tamayo Ramos, J. A. Salazar González, S. A. Casson, and R. Urrea-López, 'Old and new horizons on Persea americana transformation techniques and applications', *Plant Cell Tissue Organ Cult*, vol. 150, no. 2, pp. 253–266, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02268-7>.
- [3] C. Rössner, D. Lotz, and A. Becker, "VIGS Goes Viral: How VIGS Transforms Our Understanding of Plant Science," *Annual Reviews*, vol. 73, pp. 703–728, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-102820-020542>.
- [4] J. A. Salazar González, M. Castro Medina, L. E. Bernardino Rivera, E. Martínez Terrazas, S. A. Casson, and R. Urrea-López, "In-plant transient transformation of avocado (*Persea americana*) by vacuum agroinfiltration of aerial plant parts," *Plant Cell Tissue Organ Cult*, vol. 152, no. 3, pp. 635–646, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02436-9>.
- [5] E. Dinç, S. Z. Tóth, G. Schansker, F. Ayaydin, L. Kovács, D. Dudits, G. Garab, and S. Bottka, "Synthetic antisense oligodeoxynucleotides to transiently suppress different nucleus- and chloroplast-encoded proteins of higher plant chloroplasts," *Plant Physiol*, vol. 157, no. 4, pp. 1628–1641, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.185462>.
- [6] E. V. Garmash, "Role of mitochondrial alternative oxidase in the regulation of cellular homeostasis during development of photosynthetic function in greening leaves," *Plant Biol*, vol. 23, no. 2, pp. 221–228, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/plb.13217>.
- [7] J. Pang, Y. Zhu, Q. Li, J. Liu, Y. Tian, Y. Liu, J. Wu, "Development of Agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing and performance evaluation of four marker genes in *Gossypium barbadense*," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073211>.
- [8] P. Mangena, "Evolving role of synthetic cytokinin 6-benzyl adenine for drought stress tolerance in soybean (*Glycine max* L. Merr.)," *Frontiers in Sustainable Food Systems*, vol. 6, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.992581>.
- [9] J. A. Lindbo, "TRBO: A high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector," *Plant Physiol*, vol. 145, no. 4, pp. 1232–1240, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.106377>.
- [10] N. O. Adedipe and R. A. Fletcher, "Retardation of Bean Leaf Senescence by Benzyladenine and Its Influence on Phosphate Metabolism," *Plant Physiol*, vol. 46, pp. 614–617, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.46.4.614>.