

Universidad de Concepción
Campus Los Ángeles
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



Infiltración al vacío en la transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Benjamín Antonio Sepúlveda Araneda

Memoria de Título para
Optar al Título de Ingeniero
en Biotecnología Vegetal

Los Ángeles – Chile

2025

Infiltración al vacío en la transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Alumno

Benjamín Antonio Sepúlveda Araneda

Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesora Guía

Dra. Marely Cuba Díaz

Profesora Titular

Bióloga

Profesor Co-Guía

Dr. Olman Gómez Espinoza

Ingeniero en Biotecnología

Profesora Comisión

Dra. Daniela Muñoz Baier

Profesora Colaboradora

Ingeniera en Biotecnología Vegetal

Jefe de Carrera

Profesor Pedro Quiroz Hernández

Profesor Instructor

Ingeniero de Ejecución Forestal

Director de Departamento

Dr. Mauricio Rondanelli Reyes

Profesor Asociado

Biólogo

AGRADECIMIENTOS

Como punto a parte, agradezco a la ciencia misma, por permitir acercarme (aunque mínimamente) a dar respuestas a aquellas preguntas existenciales que me maravillan y atormentan día a día, y por entregarme las herramientas necesarias para adquirir un poco de conocimiento sobre este basto universo.

Quiero dar gracias a mi familia, padre, madre, abuelos, tíos y hermano, quienes me han formado en valores y principios, y de manera incondicional, han brindado todo su apoyo en este proceso tan importante de mi vida.

Por otro lado, quiero dar gracias a mis amigos y compañeros, Vicente y Tomás, por ser tan buena compañía y ayudarnos mutuamente cuando fuere necesario. Aprecio y atesoro nuestras conversaciones, desde temas serios y profundos, hasta aquellos banales y efímeros. Esas noches interminables de estudio, donde la cafeína fue nuestra preciada compañía, hoy las aprecio y las recordaré hasta que mi memoria lo permita. Gracias por sus consejos, sus palabras de apoyo, nuestras carcajadas y, nuevamente, por su tan grata compañía.

Agradezco a la Dra. Marely Cuba, por recibirme en su laboratorio y permitirme llevar a cabo esta investigación. Agradezco en demasía la formación científica íntegra que me ha brindado, sus consejos, paciencia y apoyo. Así mismo, agradezco al Dr. Darío Navarrete, por su apoyo en esta investigación y su disponibilidad ante cualquier circunstancia, duda e inconveniente que me haya aquejado, y al Dr. Olman Gómez, por su colaboración y el conocimiento compartido.

Agradezco a mi mascota, *Felis catus* "Molly" por acompañarme día y noche en sesiones de estudio, lectura y escritura, y ser mi contención en momentos de agotamiento.

Finalmente, agradezco a Dante, mi hijo, por alegrar mi vida, inundarme de amor y darle otro sentido y perspectiva a la vida, y a Valeria, mi pareja y compañera de vida, por brindarme su apoyo incondicional en momentos difíciles, en mis aciertos y desaciertos, en la angustia y la alegría, por entenderme, y alegrar mi día a día.

Doy gracias a los millones de años de evolución del universo por hacerme coincidir con cada una de las personas mencionadas, directa e indirectamente, en los párrafos anteriores.

“Esta investigación fue llevada a cabo con material vegetal proveniente de la Colección Activa de Plantas de Vasculares Antárticas del Laboratorio de Biotecnología y Estudios Ambientales, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción. Proyecto VRID: 2023000418ESP”.

ÍNDICE

RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 <i>Colobanthus quitensis</i>	14
2.2 Distribución.....	15
2.3 Mecanismos de Tolerancia al Estrés en <i>Colobanthus quitensis</i>	16
2.3.1 Tolerancia a la Congelación	16
2.3.2 Fotosíntesis en Condiciones de Estrés	16
2.3.3 Mecanismos de Protección contra la Radiación	17
2.4 Transformación Genética	18
2.5 Edición genética mediante CRISPR/Cas.....	21
2.6 Antecedentes de Transformación genética en <i>Colobanthus quitensis</i>	22
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo General	24
4.2 Objetivos Específicos	24
5. METODOLOGÍA	24
5.1 Material Vegetal	24
5.2 Vector Binario, cepa y cultivo de <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	25
5.3 Transformación genética de <i>Colobanthus quitensis</i>	25
5.3.1 Tratamiento 1 (T1): Infiltración al vacío	25
5.3.2 Tratamiento 2 (T2): Transformación sin infiltración al vacío	26
5.4 Pre-selección de explantes	26
5.5 Ensayo Histoquímico GUS	27

5.6 Detección microscópica.....	27
5.7 Selección de transformantes	28
5.8 Regeneración de transformantes	28
5.9 Expresión Estable del gen <i>uidA</i>	29
5.10 Análisis Estadístico	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Ensayo Histoquímico GUS	30
6.2 Detección microscópica.....	31
6.3 Selección de transformantes	32
6.3 Regeneración de transformantes.	33
6.4 Expresión Estable del gen <i>uidA</i>	33
7. DISCUSIÓN.....	35
8. PROYECCIONES Y RECOMENDACIONES PARA FUTURO EXPERIMENTOS	38
9. CONCLUSIONES	41
10. Bibliografía.....	42
11. ANEXO	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la eficiencia de la transformación genética en cuatro especies vegetales.
..... 35

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Representación para la determinación porcentual de expresión transitoria en brotes de <i>Colobanthus quitensis</i> . ©Guillermo Paz (Citado y modificado por Arcos 2015).	28
Fig. 2: Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en explantes de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1) y sin infiltración al vacío (T2), junto a sus respectivos controles.....	30
Fig. 3: Número de explantes de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1) y sin infiltración al vacío (T2), que presentaron expresión transitoria del gen <i>uidA</i>	31
Fig. 4: Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en explantes de <i>Colobanthus quitensis</i> sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1) y sin infiltración al vacío (T2). Tratamientos realizados en quintuplicado. Barras de error indican Error Estándar (SE). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (t-test; $p < 0,05$).	32
Fig. 5: Plantas de <i>Colobanthus quitensis</i> en medio de propagación con adición de Km (550 mg/L), seleccionadas como transformantes, sobrevivientes al antibiótico Km (550 mg/L). A) Plantas provenientes del T1. B) Plantas provenientes del T2.	33
Fig. 6: Escala de la determinación porcentual de la expresión estable del gen <i>uidA</i> en fragmentos foliares de plantas de <i>Colobanthus quitensis</i> sobrevivientes a la selección de transformantes provenientes del tratamiento T1 y T2.	34
Fig. 7: Esquema general y secuencial del protocolo de transformación genética de <i>Colobanthus quitensis</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , llevado a cabo en esta investigación. Realizado utilizando BioRender.com	39
Fig. 8: Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en callos celulares de <i>Colobanthus quitensis</i> , transformados sin infiltración al vacío (A) y con infiltración al vacío (B). Escala de referencia de Burgos (2017).....	52

NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AIA: Ácido indol-3-acético.

ANOVA: Análisis de Varianza.

AS: Acetosiringona.

BAP: 6-Bencilaminopurina.

Cef: Cefotaxima.

cm: centímetro.

CPVA: Colección de Plantas Vasculares Antárticas.

CRISPR/Cas: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas / Proteína asociada a CRISPR.

CaOx: Cristales de Oxalato de Calcio.

D.O: Densidad óptica.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ETR: Tasa transportadora de electrones.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

g_m : Conductancia mesofílica.

hrs: Horas.

Km: Kanamicina.

mg: Miligramo.

mL: Mililitro.

mM: Milimol.

mmHg: Milímetros de mercurio.

MS: Murashige y Skoog.

m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar

nptII: Neomicina fosfotransferasa II.

Sac: Sacarosa.

STS: Tiosulfato de plata.

T1: Tratamiento 1, transformación genética con infiltración al vacío.

T2: Tratamiento 2, transformación genética sin infiltración al vacío.

T-DNA: ADN de transferencia.

μ L: Microlitro.

μ mol: Micromol.

uidA: Gen reportero que codifica la β -glucuronidasa.

v/v: Volumen/Volumen

X-Gluc: Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico.

$^{\circ}$ C: Grados Celsius.

RESUMEN

Colobanthus quitensis, una de las dos plantas vasculares nativas de la Antártica, presenta una notable capacidad de adaptación a ambientes extremos, lo que la convierte en un modelo valioso para estudiar los mecanismos de tolerancia al estrés, así como para investigaciones en genética y genómica funcional. Sin embargo, las herramientas moleculares de edición genética no han sido validadas para la especie. Este estudio tuvo como objetivo optimizar un protocolo de transformación genética para *C. quitensis* mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, cepa LBA4404, enfocándose en la aplicación de la infiltración al vacío como un paso adicional para aumentar la eficiencia de la transformación. La investigación utilizó explantes de *C. quitensis* sometidos a dos tratamientos: T1 (infiltración al vacío durante 3 minutos a 630 mmHg) y T2 (transformación estándar sin infiltración al vacío). La expresión del gen reportero *uidA* se evaluó mediante ensayos histoquímicos GUS para determinar las eficiencias de transformación transitoria y estable. Además, se implementaron pasos de preselección para promover la recuperación de los explantes y garantizar la estabilidad genética. Los resultados mostraron una mejora significativa en la eficiencia de transformación con la infiltración al vacío, mostrando un incremento de un 13% con respecto a estudios anteriores, donde se llevaron a cabo otras técnicas de transformación. En T1, ocho de cincuenta plantas sobrevivieron al proceso de selección, todas con expresión estable del gen *uidA* en distintas proporciones. En contraste, en T2 no se observó expresión estable en las dos plantas sobrevivientes. Este estudio resalta la importancia de incorporar la infiltración al vacío y la recuperación de explantes en los protocolos de transformación, estableciendo una base sólida para estudios genéticos y genómicos funcionales en *C. quitensis*. El protocolo optimizado abre oportunidades para aplicaciones biotecnológicas avanzadas, incluida la edición génica basada en CRISPR/Cas, para explorar mecanismos de adaptación al estrés y mejorar la resiliencia de las plantas en condiciones extremas. Estos hallazgos contribuyen al avance científico en línea con los desafíos globales de sostenibilidad, particularmente en lo relacionado con la conservación ambiental, la resiliencia climática y la innovación tecnológica en biotecnología.

ABSTRACT

Colobanthus quitensis, one of the two vascular plants native to Antarctica, exhibits remarkable adaptability to extreme environments, making it a valuable model for studying stress tolerance mechanisms, as well as for research in genetics and functional genomics. However, molecular tools for genetic editing have not yet been validated in this species. This study aimed to optimize a genetic transformation protocol for *C. quitensis* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain, focusing on the application of vacuum infiltration as an additional step to enhance transformation efficiency. The research utilized explants from *C. quitensis* subjected to two treatments: T1 (vacuum infiltration for 3 minutes at 630 mmHg) and T2 (standard transformation without vacuum infiltration). Expression of the reporter gene *uidA* was evaluated through histochemical GUS assays to determine transient and stable transformation efficiencies. Additionally, pre-selection steps were implemented to promote explant recovery and ensure genetic stability. Results revealed a significant improvement in transformation efficiency with vacuum infiltration, showing a 13% increase compared to previous studies, where others transformation techniques were carried. In T1, eight of fifty plants survived the selection process, all displaying stable expressions of the *uidA* gen in different proportions. In contrast, no stable expression was observed in the two surviving plants from T2. This study highlights the importance of incorporating vacuum infiltration and explant recovery into transformation protocols, establishing a robust foundation for genetic and functional genomic studies in *C. quitensis*. The optimized protocol paves the way for advanced biotechnological applications, including CRISPR/Cas-based genome editing, to further explore stress adaptation mechanisms and improve plant resilience under extreme conditions. These findings contribute to scientific advancements aligned with global sustainability challenges, particularly those related to environmental conservation, climate resilience, and technological innovation in biotechnology.

1. INTRODUCCIÓN

La flora antártica, compuesta principalmente por musgos, líquenes y sólo dos especies de plantas con flores, *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) y *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae), enfrenta condiciones extremas en un entorno caracterizado por bajas temperaturas, fuertes vientos y alta radiación (Convey 2001; Ovstedal y Smith 2001). Diversas investigaciones han resaltado los efectos del estrés hídrico, las temperaturas extremadamente bajas y la radiación solar en las especies vegetales endémicas de la Antártica, evidenciando alteraciones foliares, disminución del rendimiento fisiológico y reducción en la capacidad reproductiva (Pearce 2008; Torres-Díaz et al. 2016; Singh et al. 2018; Clemente-Moreno et al. 2020).

A pesar de estos desafíos, *C. quitensis* y *D. antarctica* han demostrado una notable capacidad de adaptación, siendo las únicas dos plantas vasculares nativas que prosperan en este territorio antártico (Alberdi et al. 2002; Rogers, 2007). *C. quitensis* es una planta dicotiledónea, perenne y de hábito herbáceo, cuya distribución se extiende desde el sur de México hasta la Península Antártica, mostrando una destacada plasticidad morfo-fisiológica y prosperando en condiciones adversas, incluso a altitudes de 4200 m.s.n.m en los Andes (Moore, 1970b; Smith, 2003).

Colobanthus quitensis ha desarrollado diversos mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que le permiten enfrentar las condiciones extremas y asegurar su supervivencia en un entorno tan inhóspito como la Antártica (Cuba-Díaz, 2011; Ramírez et al. 2024). Estos mecanismos de adaptación incluyen la tolerancia a bajas temperaturas, la resistencia a la congelación, la fotosíntesis en condiciones de estrés y mecanismos de protección contra la radiación solar (Sierra-Almeida et al. 2018; Clemente-Moreno et al. 2020; Gómez-Espinoza et al. 2020). La amplia distribución y capacidad de adaptación de *C. quitensis* a diversas condiciones abióticas la convierte en una planta modelo ideal para el estudio de los mecanismos ecofisiológicos y moleculares relacionados con la adaptación al estrés (Cuba-Díaz, 2011), así como en estudios de genética y genómica funcional de genes que regulan estos mecanismos.

La biotecnología ha avanzado significativamente en el desarrollo de nuevas técnicas para obtener variedades vegetales mejoradas mediante herramientas biotecnológicas (Adlak et al. 2019). Una de estas técnicas es la transformación o modificación genética, que permite

introducir características deseables en un organismo en un período de tiempo relativamente corto (Su et al. 2023). Existen diversas metodologías de transformación genética en plantas, siendo una de las más utilizadas la mediada por cepas modificadas de *Agrobacterium tumefaciens*, que emplea la capacidad natural de esta bacteria para transferir genes específicos a células vegetales (Tiwari et al. 2022). La transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es una técnica biotecnológica clave ampliamente utilizada para introducir genes de interés en diversas especies vegetales, gracias al plásmido Ti (“Tumor Inductor”) de esta bacteria, que contiene el ADN de transferencia (T-DNA) y genes de virulencia (vir) esenciales para la integración de genes en el genoma de la planta huésped.

Para llevar a cabo estudios de genética y genómica funcional en especies vegetales, es esencial contar con protocolos de transformación genética eficientes que permitan obtener la mayor cantidad de transformantes posibles. Diversas características del proceso de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* pueden ser manipuladas, como la temperatura (Chakrabarty et al. 2002), el pH del medio de cultivo bacteriano (Mondal et al. 2001) y el uso de inductores químicos como la acetosiringona (Stachel et al. 1985; Chakrabarty et al. 2002). Estudios han demostrado que técnicas como la sonicación y la infiltración al vacío pueden aumentar la eficiencia de la transformación genética en diversas especies vegetales de importancia mundial (Arun et al. 2015, 2016; Vasudevan et al. 2021; Sedaghati et al. 2021; Zhang et al. 2022).

Colobanthus quitensis ha sido objeto de estudios de transformación genética en semillas, brotes y callos (Arcos 2015; Burgos 2017), sin embargo, aún no se ha desarrollado un protocolo eficiente de transformación genética para esta especie ni se cuenta con los datos necesarios para establecerlo. Por esta razón, en esta investigación se evaluará el efecto de la infiltración al vacío en la eficiencia de la transformación genética de *C. quitensis* mediada por *A. tumefaciens*.

En este contexto, este estudio se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en particular con la meta de promover la innovación científica y el desarrollo de tecnologías sostenibles (ODS 9), generar conocimiento relevante para afrontar los efectos del cambio climático en la vegetación de zonas extremas (ODS 13) y fortalecer la resiliencia de los ecosistemas terrestres y la conservación de la biodiversidad (ODS 15).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Colobanthus quitensis*

Colobanthus quitensis (Khunt) Bartl., conocida comúnmente como clavelito antártico, es una de las dos plantas con flores que habitan el continente Antártico, junto con *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) (Rogers 2007), siendo estas las dos únicas plantas vasculares nativas del continente blanco (Alberdi et al. 2002).

Colobanthus quitensis es una planta dicotiledónea, perenne y de hábito herbáceo, perteneciente a la familia Caryophyllaceae. Se distingue por tener hojas largas y extendidas, a veces más largas que las ramillas (Pisano 1976), con un ápice mucronado o entero y un margen membranoso (Moore 1970b). Su tamaño varía de 1,5 a 8 cm de altura, y puede crecer en forma de cojines compactos debido a sus tallos simples o ramificados que miden entre 0,5 a 2 cm, de los cuales brotan ramas distales (Smith et al. 2003).

En su hábitat antártico, *C. quitensis* crece en suelos con buen drenaje, alto contenido de arcillas y moderada retención de humedad (Komárková et al. 1990; Grobe et al. 1997). Sus flores, que aparecen solitarias en los ápices de las ramas, tienen 4 ó 5 sépalos y 4 ó 5 estilos y estambres, siendo estos últimos alternados. Los sépalos son ovados a lanceolados, triangulares ovales u obtusos a agudos y tienen un margen membranoso, mientras que los pétalos están ausentes. La cápsula es de tamaño similar a los sépalos o 1.7 veces más grandes que estos, y contiene numerosas semillas triangular-reniformes de color rojizo o marrón (Moore 1970a).

Colobanthus quitensis es auto-compatible y a menudo se auto-poliniza, siendo consideradas plantas cleistógamas (Moore 1970a; Smith 2003; Klagges et al. 2013). Las características morfológicas pueden variar entre poblaciones debido a factores genéticos y ambientales, lo que sugiere respuestas ecotípicas a diferencias de hábitat (Gianoli et al. 2004; Molina-Montenegro et al. 2012; Klagges et al. 2013; Torres-Díaz et al. 2016). Generalmente se encuentra en suelos desde el nivel del mar hasta los 50 metros, principalmente en la Península Antártica (Greene y Holtom 1971), y puede crecer en suelos arenosos o ripiosos, así como en fisuras con contacto constante con aguas dulces o salobres (Pisano 1976).

La adaptación de *C. quitensis* a condiciones climáticas extremas incluye, por ejemplo, la acumulación de azúcares y otros metabolitos que le permiten resistir a la congelación (Clemente-Moreno et al. 2020); la descomposición de cristales de oxalato de calcio para llevar a cabo la fotosíntesis en condiciones de baja disponibilidad ambiental de CO₂ (Gómez-Espinoza et al. 2020) y presentar una alta capacidad antioxidante constitutiva que le permiten evitar el daño fotoinhibitorio producido por la radiación solar excesiva (Clemente-Moreno et al. 2020). Las poblaciones antárticas presentan características similares a las plantas xerófitas, con hojas gruesas que poseen mesófilo espeso y sin fibras (Mantovani y Vieira 2000) permitiéndole sobrevivir en un entorno con estrés hídrico debido a la escasez de precipitaciones y bajas temperaturas (Smith 2003).

La capacidad de *C. quitensis* para reproducirse en condiciones antárticas extremas se debe a su estrategia de reproducción generativa (Gielwanowska et al. 2011), produciendo flores casi anualmente (Convey 1996). Sin embargo, los veranos cortos y frescos a menudo afectan la viabilidad de las semillas (Convey 1996).

2.2 Distribución

Colobanthus quitensis se extiende desde el sur de México (17° N) hasta el norte de la Península Antártica (68° S). La alta plasticidad morfo-fisiológica le ha permitido una amplia distribución territorial, prosperando al nivel del mar hasta altitudes 4200 metros sobre el nivel del mar en la cordillera de Los Andes (Smith 2003; Cuba-Díaz et al. 2019). Específicamente, Moore (1970a) indica la distribución de *C. quitensis* en México (provincia de Vera Cruz), Ecuador (provincia de Pichincha, Cotopaxi), Perú (provincia de Lima, Junin, Huacavelica, Puno, Tacna), Argentina (provincia de Jujuy, Tucumán, Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza, Neuquén, Chubut, Santa Cruz), Chile (provincias de Antofagasta, Atacama, Coquimbo, Aconcagua, Santiago, Cautín, Osorno, Chiloé, Aysén, Magallanes), Tierra del fuego e islas asociadas, Islas Falkland, Scotia Ridge (Georgia del Sur, Islas Orkney del Sur, Islas Shetland del Sur), y Antártica (costa oeste de la península Antártica y sus Islas adyacentes).

El territorio antártico se caracteriza por mantener bajas temperaturas durante todo el año, así como por la presencia de fuertes vientos y una radiación solar elevada (Convey 1996; Bernhard et al. 2020). Estas condiciones ambientales representan un desafío aún mayor

para las plantas, ya que se enfrentan a un déficit hídrico, la exposición a brisas de agua salada y una baja disponibilidad de nutrientes (Alberdi et al. 2002; Robinson et al. 2003; Chwedorzewska 2009; Sáez et al. 2018).

2.3 Mecanismos de Tolerancia al Estrés en *Colobanthus quitensis*

2.3.1 Tolerancia a la Congelación

Colobanthus quitensis ha desarrollado una notable resistencia a la congelación para sobrevivir en un ambiente extremo como lo es la Antártica. Sierra-Almeida et al. (2018) llevaron a cabo un estudio *in situ* en tres sitios de la Isla Rey Jorge, donde se demostró que *C. quitensis* tiene un umbral de temperatura letal del 50% de los tejidos foliares (LT_{50}) de aproximadamente -15.3°C ; además, se descubrió que la temperatura de nucleación fue superior a la LT_{50} , lo que indica la capacidad de *C. quitensis* para tolerar la formación de hielo dentro de sus tejidos foliares.

Por otro lado, Clemente-Moreno et al. (2020) observaron un aumento significativo de metabolitos relacionados con la osmo-protección y la estabilización de membranas a bajas temperaturas, como prolina, sacarosa, fructosa, galactinol, rafinosa y GABA (ácido gamma-aminobutírico) en *C. quitensis*.

2.3.2 Fotosíntesis en Condiciones de Estrés

Se ha planteado que las características anatómicas de *C. quitensis* que determinan la conductancia mesofílica (g_m) y, por ende, la fotosíntesis neta, como el grosor de la pared celular, los componentes citoplasmáticos y estomáticos, y el tamaño y disposición del cloroplasto (Sáez et al. 2017), se complementan con un mecanismo conocido como fotosíntesis de alarma, a través del cual se asimila CO_2 derivado de la descomposición de cristales de oxalato de calcio (CaOx) (Gómez-Espinoza et al. 2020).

Gómez-Espinoza et al. (2020) hallaron que, al exponer a *C. quitensis* a concentraciones limitadas de CO_2 (11.5 ppm), aumentaba significativamente la actividad de enzima oxalato oxidasa y la descomposición de los cristales de oxalato de calcio en las hojas. Esto sugiere que, en condiciones de estrés, la descomposición de estos cristales podría proporcionar CO_2 al tejido del mesófilo. En paralelo, la tasa de transporte de electrones (ETR) mostró una ligera disminución, pero se mantuvo estable en comparación con el grupo de control.

Adicionalmente, en condiciones no fotorespiratorias, a pesar de la ausencia de CO₂ atmosférico y O₂ como aceptores finales de electrones, *C. quitensis* pudo mantener un valor de ETR estable de alrededor de 20 $\mu\text{mol e m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante unas 10 horas de estrés (Gómez-Espinoza et al. 2020). Es posible la ETR se mantuviera debido al uso del CO₂ proporcionado por los cristales de CaOx como aceptores finales de electrones. En consecuencia, este mecanismo es fundamental para la adaptación de *C. quitensis* a las condiciones climáticas de la Antártica, representando un mecanismo complementario vital que optimiza el suministro de carbono ante las restricciones en la difusión de CO₂ impuestas por sus características anatómicas (Gómez-Espinoza et al. 2020).

2.3.3 Mecanismos de Protección contra la Radiación

La radiación solar excesiva, especialmente en las regiones polares durante los meses de verano, representa un desafío significativo para las plantas antárticas (Casanova-Katny et al. 2006; Sierra-Almeida et al. 2018). *C. quitensis* ha desarrollado mecanismos específicos para gestionar el exceso de irradiación, evitando el daño fotoinhibitorio. En este contexto, se ha demostrado que *C. quitensis* puede exhibir una alta capacidad antioxidante constitutiva, relacionada principalmente con metabolitos que contienen azufre y otros del metabolismo del shikimato, sin variaciones significativas en sus actividades enzimáticas antioxidantes (Clemente-Moreno et al. 2020); además, los mismos investigadores mencionados anteriormente han identificado que *C. quitensis* utiliza la vía de respiración del citocromo y el metabolismo del azufre para mantener la homeostasis energética y la función celular en condiciones de baja temperatura. Por otro lado, una rápida recuperación de la fotoinhibición provocada por bajas temperaturas se ha asociado a que *C. quitensis* puede estabilizar los polipéptidos de la cadena de transporte de electrones dentro de la membrana del tilacoide o mantener su recambio (Bascañán-Godoy et al. 2012).

En respuesta a las condiciones climáticas extremas, las plantas antárticas han desarrollado mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que les permiten sobrevivir en su hábitat extremo (Cuba-Díaz 2011). Estos mecanismos adaptativos le proporcionan las herramientas necesarias para enfrentar las condiciones adversas y garantizar su supervivencia en un entorno tan inhóspito.

Los mecanismos adaptativos antes mencionados le proporcionan a *C. quitensis* las herramientas necesarias para enfrentar las condiciones adversas y garantizar su supervivencia en un entorno tan inhóspito. De esta manera, la amplia distribución y capacidad de adaptación de *C. quitensis* a diversas condiciones abióticas, la convierte en una planta modelo ideal para el estudio de los mecanismos ecofisiológicos y moleculares relacionados con la adaptación al estrés (Cuba-Díaz 2011), así como en estudios de genética y genómica funcional de genes que regulan los mecanismos antes mencionados.

2.4 Transformación Genética

La biotecnología, mediante la utilización de herramientas biotecnológicas, ha avanzado significativamente en el desarrollo de nuevas técnicas que permitan obtener variedades vegetales mejoradas (Adlak et al. 2019). Uno de los métodos para lograr esto, es la transformación o modificación genética, un proceso que consiste en la introducción estable de material genético exógeno en el genoma de un organismo, con el fin de conferirle características de interés agronómico, industrial, ambiental o comercial (Alpeter et al. 2016; Nasti y Voytas et al. 2021). Esta técnica brinda la posibilidad de introducir características deseables en un organismo, en un período de tiempo relativamente corto, en comparación con los métodos tradicionales de mejoramiento genético (Su et al. 2023).

Los avances en biotecnología vegetal han permitido desarrollar varias estrategias para la obtención de plantas transgénicas, es decir, es decir, aquellas plantas que han sido modificadas genéticamente mediante la incorporación de uno o más genes de otras especies u organismos, con el objetivo de conferirles nuevas características o mejorar las existentes (Rahman et al. 2024). Estos métodos abarcan desde técnicas físicas como la electroporación, abrasión con fibras, biobalística o bombardeo de partículas, microinyecciones, utilización de láser y tratamiento con polietilenglicol (PEG), hasta métodos biológicos, empleando bacterias del género *Agrobacterium* (Hodson 2005). Los métodos de transformación genética mediante *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*) (Rahman et al. 2024) se encuentran entre los más utilizados y eficientes, ya que en este tipo de bacterias existen cepas que poseen la capacidad natural de integrar y transferir genes a células vegetales (Tiwari et al. 2022).

Agrobacterium tumefaciens se identifica como el patógeno responsable de la patología conocida como agallas o tumores de cuello en las plantas vasculares. Con el tiempo, se ha vuelto patente que el proceso de transferencia génica de esta bacteria a las plantas puede constituir la base molecular fundamental en el desarrollo del sistema de transferencia genética, lo cual ha permitido su aplicación en la ingeniería genética de organismos vegetales (Hooykaas y Shilperoort 1992).

Las cepas virulentas de *A. tumefaciens* contienen un elemento extracromosómico (plásmido) llamado plásmido Ti (siglas en inglés de “Tumor Inductor”), que hospeda a los genes que participan en la inducción de la enfermedad de la agalla del cuello en plantas (Guo et al. 2019). Para ello, la bacteria infecta al tejido vegetal, transfiriendo ciertos genes del plásmido. Dichos genes originan la multiplicación de células desdiferenciadas, las cuales formarán el tumor. El plásmido Ti posee una porción de ácido nucleico llamada ADN de transferencia (T-DNA) que es transferida a la célula vegetal, donde finalmente puede integrarse de manera estable al genoma (Hodson 2005; Tiwari et al. 2022).

Para llevar a cabo la transferencia exitosa de genes desde *Agrobacterium* hasta las células vegetales se requiere un conjunto de genes de virulencia (*vir*) presentes en el plásmido Ti, que incluyen los genes *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG* y *virH* (Lakroix y Citovsky 2022), los cuales son activados por diversos factores de la planta; el ADN de transferencia (T-DNA); y una serie de genes del cromosoma bacteriano (*chv*) necesarios para la expresión de virulencia (Zupan et al. 2000; Hodson 2005; Lakroix y Citovsky 2019).

El T-DNA codifica varias enzimas involucradas en la síntesis de reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas, los cuales provocan el crecimiento tumoral descontrolado en plantas (Guo et al. 2019). El T-DNA está flanqueado por secuencias específicas denominadas secuencias borde, cruciales para la transferencia genética. Sin embargo, los genes codificados en el T-DNA no son imprescindibles para la transferencia, puesto que la transferencia de ADN ocurre de igual manera, aunque los genes hayan sido modificados (Tiwari et al. 2022). Esta última característica es la que permite usar cepas de *Agrobacterium* modificadas con un gen de interés, gen de selección y/o un gen marcador, integrándolos dentro de la región del T-DNA, permitiendo el uso de cepas modificadas de *Agrobacterium* con genes de interés.

El gen de selección codifica una enzima que inactiva un antibiótico u otro agente de selección añadido al medio de cultivo para la morfogénesis *in vitro*, permitiendo la exclusiva regeneración de plantas transformadas, excluyendo aquellas no transformadas. Entre los genes de selección más utilizados se encuentra el gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (*nptII*), que confiere resistencia a algunos antibióticos aminoglucósidos como la neomicina y la kanamicina. En cuanto al gen marcador o reportero, uno de los más utilizados es el gen *uidA*, que codifica para la enzima hidrolasa β -glucuronidasa (Jefferson et al. 1987), que tiene como uno de sus sustratos histoquímicos el compuesto X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico, sal de ciclohexilamonio). Cuando la enzima β -glucuronidasa se encuentra presente y activa, cataliza la hidrólisis del enlace glucurónico del compuesto X-Gluc. Esta reacción libera un grupo indol que, al oxidarse en presencia de oxígeno, genera el compuesto azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, siendo notable por su estabilidad a altas temperaturas, resistencia a la fijación histoquímica y fácil detección en los tejidos (Xion et al. 2011; Basso et al. 2020).

Para llevar a cabo estudios de genética y genómica funcional en especies vegetales, es esencial contar con protocolos de transformación genética eficiente, que permitan obtener la mayor cantidad de transformantes posibles y que, además, estos se mantengan en el tiempo y produzcan descendencia que exprese los componentes genéticos de interés. Para ello, la eficiencia en la transformación genética puede incrementarse manipulando las técnicas de cultivo de *Agrobacterium* y plantas, conduciendo a un aumento de inoculación en las plantas y la expresión de los genes *vir* (Xu et al 2020) (. En este contexto, se sabe que modificaciones en la temperatura y el pH del medio de cultivo bacteriano, así como el uso de inductores químicos como la acetosiringona cumplen un rol crucial en la eficiencia de un protocolo de transformación genética (Xu et al 2020; Anjanappa y Gruissem 2021; Azizi-Dargahlou y Pouresmaeil 2024).

Se sabe que la acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) es un compuesto fenólico que es liberado por las plantas cuando reciben algún tipo de daño mecánico, la cual, a su vez, funciona como molécula de señalización, en respuesta a la infección por *A. tumefaciens*, activando la expresión de los genes *vir* para transferir el T-DNA a las células objetivo (Peng et al. 1998; Gelvin 2003). Si bien la adición de acetosiringona en los medios

de co-cultivo no es imprescindible para que ocurra la transferencia genética, diversos estudios han demostrado que aumenta la eficiencia de la transformación genética (Mayavan et al. 2013; Manickavasagam et al. 2015; Taak et al. 2020; Bhatt et al. 2021).

Gnasekaran et al., (2014) y Nyaboga et al. (2015), señalan que los mejores resultados para la obtención de una alta inoculación de *Agrobacterium*, se logran mediante el co-cultivo sólido suplementado con acetosiringona 200 μM . No obstante, Rashid et al. (1996); Gould (1997); Henzi et al. (2000); Ali et al. (2006) y Thiruvengadam et al. (2011), sugieren que al utilizar una concentración de 200 μM de acetosiringona en ambos medios de co-cultivo (líquido y sólido) se inhibe la transformación genética.

La aplicación y manipulación de otros factores, como la infiltración al vacío y la sonicación han demostrado aumentar la eficiencia de la transformación genética en diversas especies vegetales de importancia mundial, como el trigo (Amoah et al. 2001), el poroto (Liu et al. 2005), el rábano (Park et al. 2005), la soya (Arun et al. 2015, 2016) y la sandía (Vasudevan et al. 2021). La infiltración al vacío actúa generando una presión atmosférica negativa que expulsa el aire de las cavidades y crea espacios vacíos dentro de los tejidos vegetales, resultando en un mayor ingreso de las células de *Agrobacterium* al tejido objetivo (Tague y Mantis 2006; Lin et al. 2009; Manickavasagam et al. 2015). Sedaghati et al. (2021) reportó que la aplicación combinada de sonicación e infiltración al vacío por 2 minutos en semillas de *Portulaca oleracea* L. aumentó la eficiencia de la transformación genética en dicha especie, obteniendo $39.25 \pm 2.88\%$ de explantes positivos para la expresión estable del gen *uidA*. Por otro lado, Zhang et al. (2022) reportó que al infiltrar al vacío explantes de hojas y pecíolos de *Tripterygium wilfordii* por 3 minutos, obtuvo un 76,36% de explantes sobrevivientes al medio de selección de transformantes.

2.5 Edición genética mediante CRISPR/Cas

El sistema CRISPR/Cas (por sus siglas en inglés “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats y Cas”, proteínas asociadas) ha revolucionado la biotecnología al permitir la edición precisa de genomas en una amplia variedad de organismos, incluidas las plantas (Zhu et al. 2020). Este sistema se basa en una guía de ARN (ARNsg) que dirige la proteína Cas9 hacia secuencias específicas de ADN, donde induce cortes de doble hebra. La célula repara estos cortes mediante mecanismos de unión de extremos no homólogos

(NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR), lo que permite realizar inserciones, deleciones o reemplazos de secuencias genéticas de interés (Jilin et al. 2022; Kumar et al. 2023).

En el ámbito vegetal, CRISPR/Cas ha demostrado ser una herramienta poderosa para mejorar cultivos mediante la introducción de rasgos como tolerancia al estrés abiótico, resistencia a enfermedades y aumento en la productividad (Zhang et al. 2020). Además, su implementación en plantas no modelo, como *Colobanthus quitensis*, ofrece un enfoque innovador para estudiar mecanismos de adaptación en ambientes extremos, como los de la Antártica. La integración de esta tecnología con protocolos eficientes de transformación genética, como los desarrollados en esta investigación, podría facilitar aplicaciones biotecnológicas avanzadas que mejoren la resiliencia y capacidad adaptativa de las plantas (Li et al. 2013; Schindele et al. 2020).

2.6 Antecedentes de Transformación genética en *Colobanthus quitensis*

En *C. quitensis* se han reportado estudios de transformación genética en semillas, brotes y callos de diferentes poblaciones (Arcos 2015; Burgos 2017).

Arcos (2015) reportó que, en semillas, plántulas obtenidas a partir de semillas germinadas (SG) y plantas *in vitro*, el mayor número de explantes que expresaron de manera transitoria el gen *uidA* se obtuvo utilizando la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, portadora del plásmido pBI121. Así mismo, obtuvo un promedio 11,7 transitorios para semillas, un promedio de 10,7 transitorios para plántulas SG y un promedio de 17,7 transitorios para plantas, utilizando una densidad bacteriana con una absorbancia 0,9 a D.O_{600nm} y co-cultivo líquido de 30 minutos. Por otro lado, Burgos (2017) obtuvo el mayor número de brotes y callos de *C. quitensis* que expresaron de manera transitoria el gen *uidA* utilizando 200 µM de acetosiringona en el medio de co-cultivo sólido.

A pesar de los avances en transformación genética de *C. quitensis*, no existen antecedentes bibliográficos suficientes para el establecimiento de un protocolo eficiente de transformación genética para la especie, como, por ejemplo, donde se prueben factores como la infiltración al vacío o la presencia de acetosiringona sólo en el co-cultivo líquido, donde dicho compuesto fenólico es indispensable para aumentar la eficiencia de la transformación genética. Además, el establecimiento de un protocolo eficiente de transformación genética

en *C. quitensis* mediada por *A. tumefaciens* permitirá sentar las bases para establecer sistemas de transformación aún más rápidos, precisos y eficientes como lo son CRISPR/Cas. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo establecer un protocolo de transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

3. HIPÓTESIS

La aplicación de la infiltración al vacío en explantes de *Colobanthus quitensis* aumentará la eficiencia de la transformación genética para dicha especie.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Establecer un protocolo de transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

4.2 Objetivos Específicos

- I. Evaluar el efecto de los métodos de transformación genética con y sin infiltración al vacío en la expresión transitoria del gen *uidA*.
- II. Determinar la eficiencia de la transformación genética mediante el número de plantas sobrevivientes a la selección de transformantes.

5. METODOLOGÍA

5.1 Material Vegetal

Se utilizaron explantes de *C. quitensis*, de aproximadamente 1 cm., incluyendo hojas y parte de la raíz principal, de plantas obtenidas desde la Colección de Plantas Vasculares Antárticas (CPVA- Proyecto VRID 2023000418ESP), de la Universidad de Concepción campus Los Ángeles. Dichos explantes se obtuvieron a partir de plantas de *C. quitensis* previamente establecidas *in vitro* en frascos de vidrio de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo base MS (Murashige & Skoog 1962), al 100% de concentración (4,43g/L), complementado con sacarosa al 3%, 6-Bencilaminopurina (BAP) 0,5 mg/L, Acido indol-3-acético (AIA) 0,25 mg/L, a un pH 5.7, en cámara de crecimiento a 18 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 hr luz/8 hr oscuridad e intensidad lumínica de 45 ± 2 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

5.2 Vector Binario, cepa y cultivo de *Agrobacterium Tumefaciens*

Se utilizó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, que alberga el plásmido pBI121, para la transformación genética de *C. quitensis* (Arcos 2015). Dicha cepa bacteriana se encontraba conservada en tubos crioviales con medio de cultivo YEP (Yeast Extract Peptone) (Extracto de levadura 2%, Peptona 2%, NaCl 2%) y glicerol al 20%, a -80 °C. El vector binario pBI121 codifica los genes *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) y *uidA* que confieren resistencia a kanamicina (Km) y expresión de la enzima β -glucuronidasa (GUS), respectivamente. El gen *nptII* se encuentra bajo el control del promotor y terminador de la nopalina sintetasa (nos), mientras que el gen *uidA*, se encuentra bajo el promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S) y el terminador nos (Hoekema et al. 1983).

Para llevar a cabo el cultivo de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, se tomaron 100 μ L de la suspensión bacteriana almacenada en tubos criogénicos y se cultivaron en 100 mL de medio YEP (Extracto de levadura 2%, Peptona 2%, NaCl 2%) suplementado con estreptomicina (50 mg/L) y kanamicina (50 mg/L). El cultivo se incubó a 28 °C durante 48 horas en un agitador orbital a 150 rpm (Lab. Rotator, modelo DRS-2100V) según el protocolo descrito por Gelvin (2006). Una vez completada la incubación, el cultivo bacteriano fue centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos para obtener el pellet bacteriano, el cual se re-suspendió en un medio de co-cultivo líquido compuesto por 1/10 MS, 3% de sacarosa y 200 μ M de acetosiringona (AS), ajustado a un pH de 7.

A continuación, la densidad óptica de la suspensión bacteriana se ajustó a 600 nm (DO_{600}), alcanzando un valor de absorbancia de 0.8, conforme al promedio de las absorbancias más eficientes establecidas por Arcos (2015), utilizando un espectrofotómetro “Thermo Scientific GENESYS 10UV”. Finalmente, la suspensión bacteriana se activó mediante incubación a 28 °C en agitación constante a 100 rpm durante 4 horas.

5.3 Transformación genética de *Colobanthus quitensis*

5.3.1 Tratamiento 1 (T1): Infiltración al vacío

Bajo cámara de flujo laminar, se prepararon 15 explantes de aproximadamente 1 cm, se dispusieron en medio de co-cultivo líquido y se infiltraron al vacío durante 3 minutos a una presión de 630 mmHg (Zhang et al. 2022), utilizando un Kitasato y una bomba de vacío

(Arquimed, modelo su-660). Tras la infiltración al vacío, se prosiguió con el procedimiento de transformación (Sedaghati et al. 2021) descrito para *C. quitensis* (Arcos 2015). De esta manera, los explantes se sometieron a agitación constante a 100 rpm y temperatura ambiente (20 ± 2 °C) durante 30 minutos en el mismo medio de co-cultivo (Arcos 2015).

Pasados los 30 minutos, se retiraron los explantes del medio de co-cultivo y se eliminó el exceso de solución bacteriana utilizando papel absorbente estéril.

5.3.2 Tratamiento 2 (T2): Transformación sin infiltración al vacío

Bajo cámara de flujo laminar, los explantes se dispusieron en medio de co-cultivo líquido sometiéndolos a agitación constante a 100 rpm y temperatura ambiente (20 ± 2 °C) durante 30 minutos (Arcos 2015). Transcurridos los 30 minutos, se retiraron los explantes del medio de co-cultivo y se eliminó el exceso de solución bacteriana utilizando papel absorbente estéril.

Para ambos tratamientos (T1 y T2), una vez transcurridos los 30 minutos de co-cultivo líquido en agitación, los explantes se colocaron en posición horizontal en placas Petri con medio de co-cultivo sólido ($\frac{1}{4}$ MS, 3% sacarosa, 0.7% agar, pH 5.7) durante 48 horas (Arcos 2015) en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, a 18 ± 2 °C y una intensidad lumínica de 45 ± 2 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$.

En simultáneo a los experimentos de transformación genética de los tratamientos T1 y T2, se llevó a cabo un control negativo para cada tratamiento y en cada repetición, el cual consta en someter a los explantes a las mismas condiciones que en dichos tratamientos, a excepción del contacto con el cultivo de *A. tumefaciens*.

5.4 Pre-selección de explantes

Transcurridas las 48 horas, bajo cámara de flujo laminar, se tomaron 10 explantes del medio de co-cultivo sólido y se trasladaron a frascos de 250 mL con 20 mL de medio de preselección (MS completo, 3% sacarosa, 0.5 mg/L de BAP, 300 mg/L de cefotaxima, 0.7% agar, pH 5.7). Los explantes se colocaron en posición vertical y se incubaron durante 21 días en una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, a 18 ± 2 °C y una intensidad lumínica de 45 ± 2 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$. Este procedimiento se realizó para

estimular el crecimiento y la recuperación de los explantes tras el proceso de transformación y para eliminar el exceso de bacterias.

5.5 Ensayo Histoquímico GUS

Se evaluó la expresión transitoria del gen *uidA* mediante el ensayo histoquímico de la enzima β -glucuronidasa, según la metodología de Vitha et al. (1995), con modificaciones. Transcurridas las 48 horas de co-cultivo sólido, se seleccionaron al azar 5 explantes por tratamiento, se lavaron con una solución de $1/10$ MS y 300 mg/L de cefotaxima para eliminar el exceso de solución bacteriana y se secaron sobre papel absorbente. Posteriormente, los explantes se colocaron en placas de ELISA y se sumergieron completamente en una solución de X-Gluc (Tampón fosfato 0.1M a pH 7, EDTA 10 mM, Tritón X-100 0.1%, Ferricianuro de potasio 100 mM, Ferrocianuro de potasio 100 mM, X-Gluc 100 mM). Los explantes, separados por tratamientos, se incubaron en total oscuridad durante 18 horas a 37 °C.

Después de la incubación, para eliminar la clorofila de los explantes, se utilizaron soluciones de etanol en concentraciones crecientes (70%, 85%, 90%, 96%) durante 30 minutos cada una, repitiendo el procedimiento hasta despigmentar por completo los explantes. Finalmente, se añadió una solución de clareo (etanol: ácido acético en una proporción de 3:1) durante 30 minutos, para mejorar la visualización de los puntos azules que indican la actividad transitoria del gen *uidA*.

Los explantes se conservaron en tubos Eppendorf con glicerol 100% estéril para facilitar su observación sin que se deshidraten.

5.6 Detección microscópica

Para evaluar la expresión transitoria del gen reportero *uidA*, los explantes conservados en glicerol se colocaron en portaobjetos y se analizaron utilizando una lupa OLYMPUS SZ51 y un microscopio óptico OLYMPUS CX31 con un aumento de 10X. Este procedimiento se llevó a cabo para determinar la eficiencia de la transformación transitoria mediante la cuantificación de la cantidad de explantes por tratamiento (1 y 2) que presentaron actividad de la enzima β -glucuronidasa, evidenciada por el precipitado de color azul en los explantes. Por otro lado, los resultados fueron comparados con los datos mostrados en la Fig. 1 para validar y contrastar los niveles de expresión del gen *uidA* en los tratamientos 1 y 2.

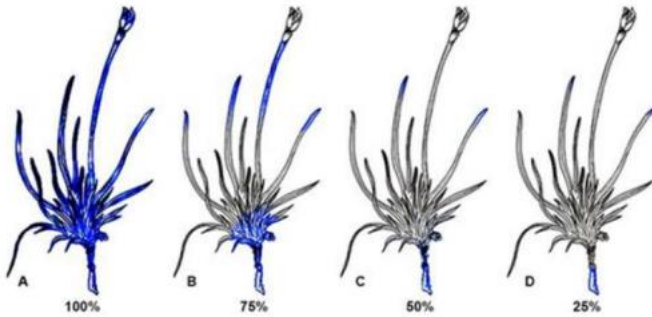


Fig. 1: Representación para la determinación porcentual de expresión transitoria en brotes de *Colobanthus quitensis*. ©Guillermo Paz (Citado y modificado por Arcos 2015).

5.7 Selección de transformantes

Transcurrida la etapa de preselección, los explantes se colocaron en posición horizontal en placas Petri con medios de selección (MS completo, 3% sacarosa, 0.7% agar, 0.5 mg/L de BAP, 0.25 mg/L de AIA, 300 mg/L de Cef y 550 mg/L de Km, pH 5.7) (Arcos 2015; Burgos 2017). Posteriormente, las placas con los explantes se trasladaron a una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad, a una temperatura de 18 ± 2 °C y una intensidad lumínica de 45 ± 2 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$. Los explantes permanecieron en los medios de selección hasta que los controles negativos presentaron necrosis y/o muerte celular. Finalmente, los explantes sometidos a los tratamientos de transformación genética que sobrevivieron al medio de selección fueron cuantificados, obteniendo así el porcentaje de explantes sobrevivientes por cada tratamiento (T1 y T2), en base a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ De Explantes Sobrevivientes} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Explantes Sobrevivientes}}{\text{N}^\circ \text{ Total de Explantes Tratados}} \times 100$$

5.8 Regeneración de transformantes

Luego del período de selección de transformantes, los explantes sobrevivientes fueron transferidos al medio de cultivo empleado en la propagación de *C. quitensis* (MS completo, 3% sacarosa, 0.7% agar, 1 mg/L de BAP, 0.5 mg/L de AIA, 10 μM de STS, pH 5.7), con adición de 550 mg/L de Km para evitar la proliferación de células no transformadas. Esto se realizó con el objetivo de promover el crecimiento y desarrollo de las plantas sobrevivientes, obteniendo así una generación de plantas transformadas estables disponibles para futuros estudios.

5.9 Expresión Estable del gen *uidA*

Un mes después de transferir las plantas sobrevivientes del proceso de selección de transformantes al medio de propagación, se procedió a evaluar la expresión estable del gen *uidA*. Para ello, se obtuvo un fragmento foliar de cada una de las plantas sobrevivientes, y se aplicó el ensayo histoquímico GUS siguiendo la metodología previamente descrita, omitiendo el paso de lavado con la solución de 1/10 MS y 300 mg/L de cefotaxima.

5.10 Análisis Estadístico

Todos los ensayos fueron realizados de manera completamente aleatorios, llevando a cabo 5 repeticiones en el tiempo por cada tratamiento evaluado (T1 y T2), incluyendo sus respectivos controles negativos, con un total de 60 explantes de *C. quitensis* por ensayo.

Para evaluar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizó el análisis estadístico t-test para variables independientes, utilizando el software STADISTICA versión 10.0. La obtención de los gráficos fue desarrollada utilizando el software STADISTICA versión 10.0 y SigmaPlot versión 12.0.

6. RESULTADOS

6.1 Ensayo Histoquímico GUS

Los resultados del ensayo histoquímico en explantes de *Colobanthus quitensis* (Fig. 2) revelaron expresión transitoria del gen *uidA* en ambos tratamientos (T1 y T2), siendo más notable en el T1. En este tratamiento, los 25 explantes sometidos al ensayo histoquímico mostraron tinción azul en distintas intensidades (Fig. 2 y Fig. 3), confirmando la clara expresión transitoria del gen. Por el contrario, en el Tratamiento 2, solo 19 de los 25 explantes analizados presentaron tinción azul (Fig. 2 y Fig. 3), la cual fue menos intensa en comparación con el tratamiento T1. Finalmente, los explantes pertenecientes a los controles negativos de ambos tratamientos no exhibieron tinción azul en sus tejidos, corroborando la ausencia del gen *uidA* en estos casos.

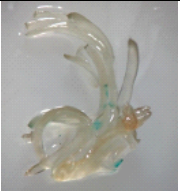
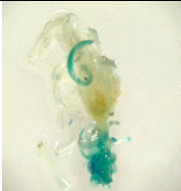
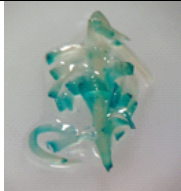
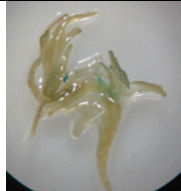



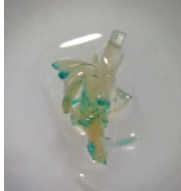
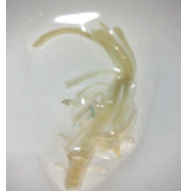




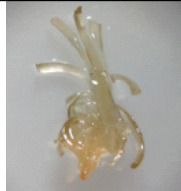






Tratamiento	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4	Repetición 5
T1: Infiltración al Vacío					
T2: Sin Infiltración al Vacío					
Control T1: Infiltración al Vacío					
Control T2: Sin Infiltración al Vacío					

Fig. 2: Expresión transitoria del gen *uidA* en explantes de *Colobanthus quitensis* sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1) y sin infiltración al vacío (T2), junto a sus respectivos controles.

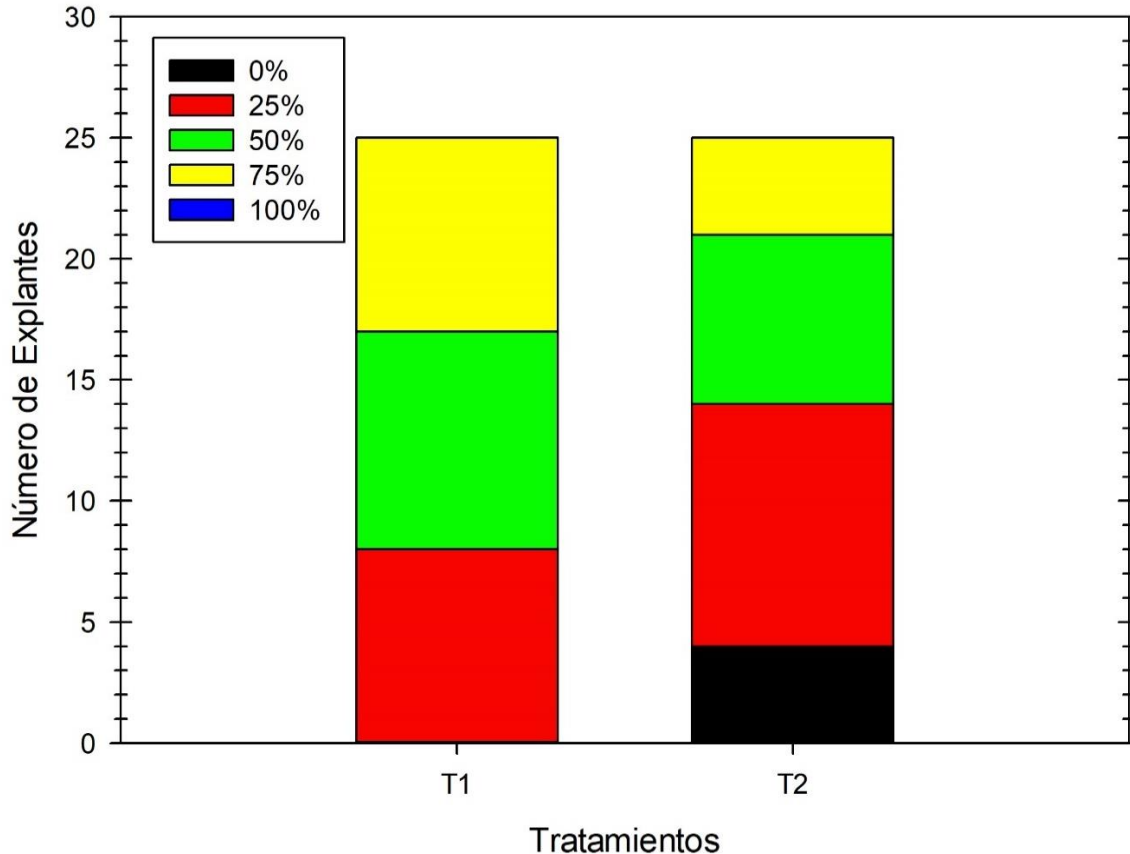


Fig. 3: Número de explantes de *Colobanthus quitensis* sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1) y sin infiltración al vacío (T2), que presentaron expresión transitoria del gen *uidA*.

6.2 Detección microscópica

El porcentaje de expresión transitoria del gen *uidA* en los explantes de *C. quitensis* fue significativamente mayor en los explantes sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1), en comparación con aquellos transformados sin infiltración al vacío (T2) (Fig. 4). En promedio, el T1 mostró un 51% de expresión transitoria, mientras que el T2 alcanzó solo un 36% de expresión transitoria.

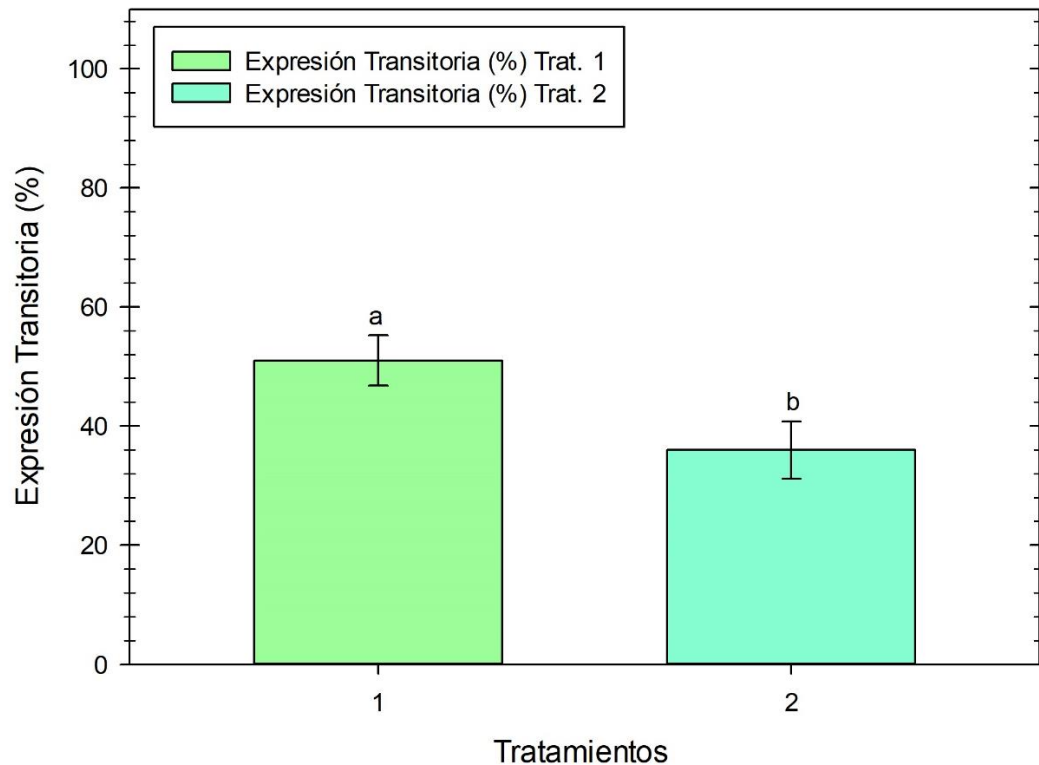


Fig. 4: Expresión transitoria del gen *uidA* en explantes de *Colobanthus quitensis* sometidos a transformación genética mediante infiltración al vacío (T1) y sin infiltración al vacío (T2). Tratamientos realizados en quintuplicado. Barras de error indican Error Estándar (SE). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (t-test; $p < 0,05$).

6.3 Selección de transformantes

Después de que los explantes permanecieran en el medio de pre-selección durante un período de 21 días, fueron transferidos a medios de selección, donde se realizaron subcultivos en intervalos de 30 días mes. Tras aproximadamente tres meses, una vez que los controles negativos de ambos tratamientos (T1 y T2) mostraron necrosis y/o muerte celular, se observaron plantas sobrevivientes en ambos tratamientos. En el tratamiento T1 se obtuvieron 8 plantas sobrevivientes (Fig. 5 A), mientras que en el tratamiento T2 se registraron únicamente 2 individuos sobrevivientes (Fig. 5 B).

Aplicando la fórmula anteriormente descrita (ver Punto 5.7), el porcentaje de sobrevivencia de explantes fue del 16% en el tratamiento T1 y del 4% en el tratamiento T2.

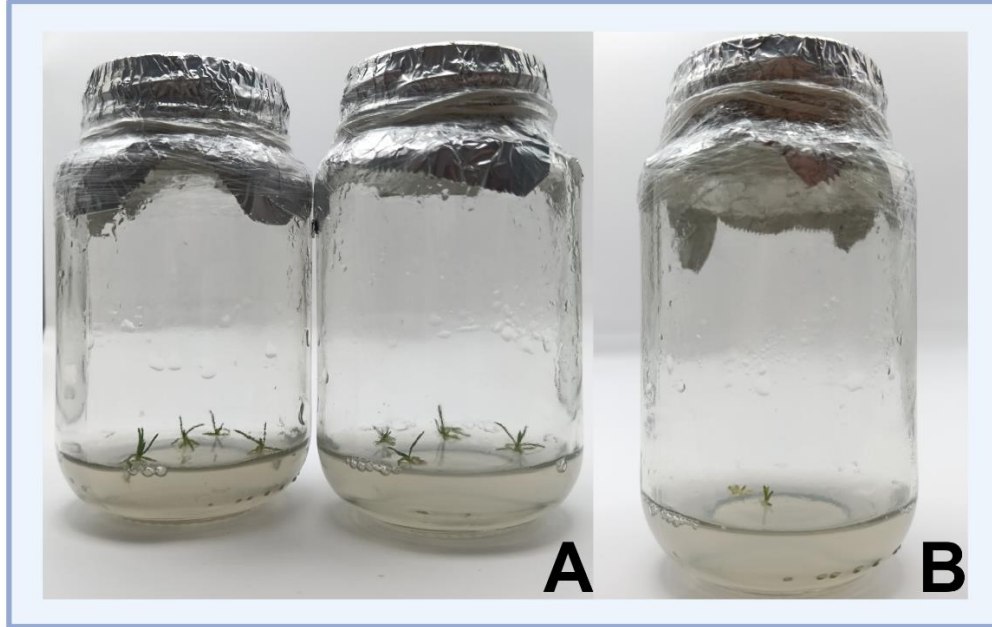


Fig. 5: Plantas de *Colobanthus quitensis* en medio de propagación con adición de Km (550 mg/L), seleccionadas como transformantes, sobrevivientes al antibiótico Km (550 mg/L). A) Plantas provenientes del T1. B) Plantas provenientes del T2.

6.3 Regeneración de transformantes.

Las plantas sobrevivientes al medio de selección de transformantes, correspondientes a ambos tratamientos (T1 y T2), fueron trasladadas a medios de propagación con el objetivo de favorecer su recuperación y permitir su uso en estudios posteriores. Transcurrido un mes en el medio de propagación con adición de Km (550 mg/L), y debido al desarrollo reducido de las plantas, se recolectó un fragmento foliar de cada planta para realizar el experimento de evaluación de la expresión estable del gen *uidA* previamente descrito.

6.4 Expresión Estable del gen *uidA*

Los resultados de la evaluación de la expresión estable del gen *uidA* en las plantas sobrevivientes al medio de selección mostraron que, en el tratamiento T1, las ocho plantas sobrevivientes presentaron expresión estable del gen en distintas proporciones, aplicado la misma escala para estimar el porcentaje de expresión transitoria del gen *uidA* (Fig. 6). Por otro lado, en el tratamiento T2, ninguna de las dos plantas sobrevivientes mostró expresión estable del gen (Fig. 6).

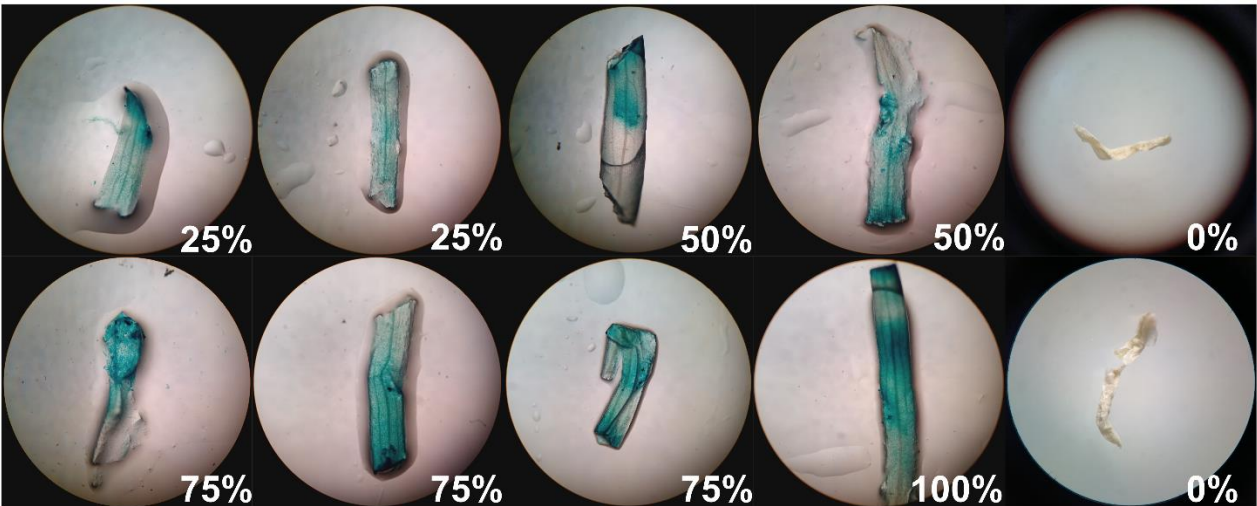


Fig. 6: Escala de la determinación porcentual de la expresión estable del gen uidA en fragmentos foliares de plantas de *Colobanthus quitensis* sobrevivientes a la selección de transformantes provenientes del tratamiento T1 y T2.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, la inclusión de un paso adicional de infiltración al vacío en la transformación genética de *C. quitensis* resultó en un incremento significativo en la eficiencia del proceso. En particular, la aplicación de vacío a 630 mmHg durante 3 minutos permitió aumentar la tasa de explantes sobrevivientes a la selección de transformantes del 3% reportado por Burgos (2017) al 16%.

La mejora en la eficiencia de transformación genética mediante infiltración al vacío puede explicarse desde una perspectiva tanto física como biológica. Este procedimiento facilita la penetración de *A. tumefaciens* en los tejidos vegetales al reducir la presión interna de los espacios intercelulares, permitiendo una mayor difusión de la suspensión bacteriana y favoreciendo el contacto con las células diana (Manickavasagam et al. 2015). Asimismo, la infiltración promueve una absorción más eficiente del medio de cultivo que contiene *A. tumefaciens*, lo que incrementa la probabilidad de interacción entre la bacteria y las células vegetales, optimizando la transferencia del ADN-T. Estudios previos han reportado efectos similares en otras especies vegetales. Por ejemplo, en *Chrysanthemum morifolium*, la infiltración al vacío incrementó la eficiencia de transformación de un 6,25% a un 16% (Xu et al. 2022). De manera análoga, Zhang et al. (2022) observaron que la aplicación de vacío en explantes foliares y peciolares de *T. wilfordii* por 3 minutos resultó en un 76,36% de explantes sobrevivientes al proceso de selección de transformantes. Así mismo, en especies como *Medicago truncatula*, *Dianthus chinensis* y *Oryza sativa*, se han reportado porcentajes de eficiencia de la transformación genética similares a lo obtenido en esta investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de la eficiencia de la transformación genética en cuatro especies vegetales.

Especie	Eficiencia de la Transformación Genética (%)	Autores
<i>Medicago truncatula</i> Cult. A17	15	Wen et al. 2019
<i>Dianthus chinensis</i>	21	Zhang et al. 2021
<i>Oryza sativa</i> Cult. ZS97	10,5	Chen et al. 2023
<i>Colobanthus quitensis</i>	16	Sepúlveda 2025

En este estudio, la transformación genética con infiltración al vacío resultó en la obtención de ocho plantas supervivientes en el tratamiento T1, las cuales evidenciaron expresión estable del gen *uidA*, aunque con variaciones en los niveles de expresión en los distintos tejidos analizados. Estas discrepancias podrían atribuirse a la incorporación diferencial del plásmido pBI121 durante la fase de recuperación y multiplicación celular posterior a la transformación genética. Investigaciones previas han demostrado que factores como la eficiencia en la integración del ADN-T, la actividad diferencial de los promotores y la regeneración desigual de los tejidos transformados pueden generar variabilidad en la expresión génica (Kairuz et al. 2018). Además, el estrés celular inducido por el procedimiento de transformación y la exposición a agentes selectivos, como la kanamicina, pueden afectar la tasa de división celular, impactando tanto la integración como la expresión del transgén. Otros factores determinantes incluyen la localización genómica del transgén y el número de copias insertadas, ya que la transformación genética es un proceso aleatorio que ocurre de manera independiente en cada célula (Anjanappa & Gruissem, 2021).

Los resultados de expresión estable del gen *uidA* son consistentes con los datos de expresión transitoria, donde todos los explantes transformados del tratamiento T1 sometidos al ensayo histoquímico GUS mostraron expresión transitoria del gen *uidA*. En detalle, 8 explantes expresaron el gen en un 25%, 9 alcanzaron un nivel de expresión del 50%, y 8 presentaron una expresión del 75%.

Por el contrario, los explantes transformados del tratamiento T2 mostraron menores porcentajes de expresión transitoria del gen *uidA*. De estos, 4 no presentaron expresión, 10 evidenciaron una expresión del 25%, 7 alcanzaron el 50%, y solo 4 mostraron una expresión del 75%, reflejando diferencias en la eficiencia de transformación y expresión del gen *uidA* entre ambos tratamientos.

El aumento en la eficiencia de la transformación genética puede atribuirse, además de la infiltración al vacío, a la implementación de la pre-selección o recuperación de plantas previo a su exposición al medio de selección. Según Anjanappa y Gruissem (2021) y Zhang et al. (2022), este proceso es crítico para garantizar la estabilidad genética de las plantas

transformadas, ya que permite que las plantas recuperen vigor antes de enfrentarse al estrés generado por los agentes selectivos.

En conjunto, los resultados de este estudio no solo confirman la importancia de optimizar las etapas clave del protocolo de transformación genética, sino que también destacan la necesidad de incorporar estrategias adicionales, como la recuperación previa y la infiltración al vacío, para maximizar la eficiencia del proceso y garantizar la obtención de plantas genéticamente estables.

Por otro lado, la optimización del protocolo de transformación genética de *C. quitensis* mediante la infiltración al vacío no solo permitió mejorar la eficiencia del proceso, sino que también representa un aporte significativo en el ámbito de la biotecnología aplicada a especies vegetales extremófilas. En este sentido, la investigación se alinea con diversos Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), en particular con el ODS 9 (Industria, Innovación e Infraestructura), al desarrollar y perfeccionar una metodología biotecnológica que facilita la manipulación genética de especies no convencionales, abriendo nuevas oportunidades para su estudio y potencial aplicación en la agricultura de ambientes extremos. Asimismo, la capacidad de *C. quitensis* para tolerar condiciones de frío extremo y estrés ambiental hace que este estudio tribute al ODS 13 (Acción por el Clima), ya que el conocimiento generado puede contribuir a la identificación de genes clave involucrados en la adaptación a temperaturas bajas, lo que a futuro podría permitir la ingeniería genética de cultivos más resilientes al cambio climático. Además, este estudio aporta información relevante para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad vegetal, alineándose con el ODS 15 (Vida de Ecosistemas Terrestres). *C. quitensis*, al ser una de las pocas plantas vasculares capaces de sobrevivir en la Antártica, representa un modelo ideal para investigar mecanismos de adaptación en entornos extremos, y su transformación genética eficiente podría facilitar estudios funcionales de genes relacionados con la tolerancia al estrés ambiental, promoviendo estrategias para la protección de especies en peligro por el calentamiento global.

8. PROYECCIONES Y RECOMENDACIONES PARA FUTURO EXPERIMENTOS

En la presente investigación, se logró obtener ocho plantas transformadas genéticamente mediante el método de infiltración al vacío, las cuales mostraron una expresión estable del gen *uidA*. No obstante, es crucial proceder al aislamiento de individuos clonales a partir de los brotes de estas plantas y subcultivarlos periódicamente en un medio de propagación estandarizado (MS completo, 3% sacarosa, 0.7% agar, 0.5 mg/L de BAP, 0.25 mg/L de AIA, 10 μ M de STS, pH 5.7), suplementado con un agente de selección a base de kanamicina (550 mg/L). Este proceso debe realizarse aproximadamente cada 30 días, con el objetivo de garantizar la obtención de líneas clonales con una expresión 100% estable del gen *uidA*, resultando en una planta transgénica completamente aislada y disponible para estudios posteriores.

Adicionalmente, se propone el cultivo de una de las plantas transformadas, en condiciones de jardín común (generación T0) con el propósito de obtener semillas viables. Estas semillas permitirán generar nuevas generaciones sexuales (Tn) de plantas transgénicas, que también estarán disponibles para investigaciones futuras.

El éxito alcanzado en la transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, empleando el método de infiltración al vacío, representa un avance significativo y sienta un precedente fundamental para futuras investigaciones en este campo.

Se propone perfeccionar este método mediante la integración de herramientas avanzadas de edición génica, como CRISPR/Cas, para lograr modificaciones más precisas, rápidas y dirigidas. Asimismo, la combinación de técnicas, como la sonicación de semillas junto con la infiltración al vacío, podría potenciar aún más la eficiencia del proceso de transformación.

Finalmente, la implementación de análisis transcriptómicos en las plantas transgénicas obtenidas permitirá identificar genes clave involucrados en la tolerancia a estrés abiótico, lo que contribuirá a maximizar su potencial biotecnológico. Esto no solo ampliará el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de adaptación a ecosistemas extremos, sino que también abrirá nuevas oportunidades para aplicaciones biotecnológicas en escenarios climáticamente desafiantes.

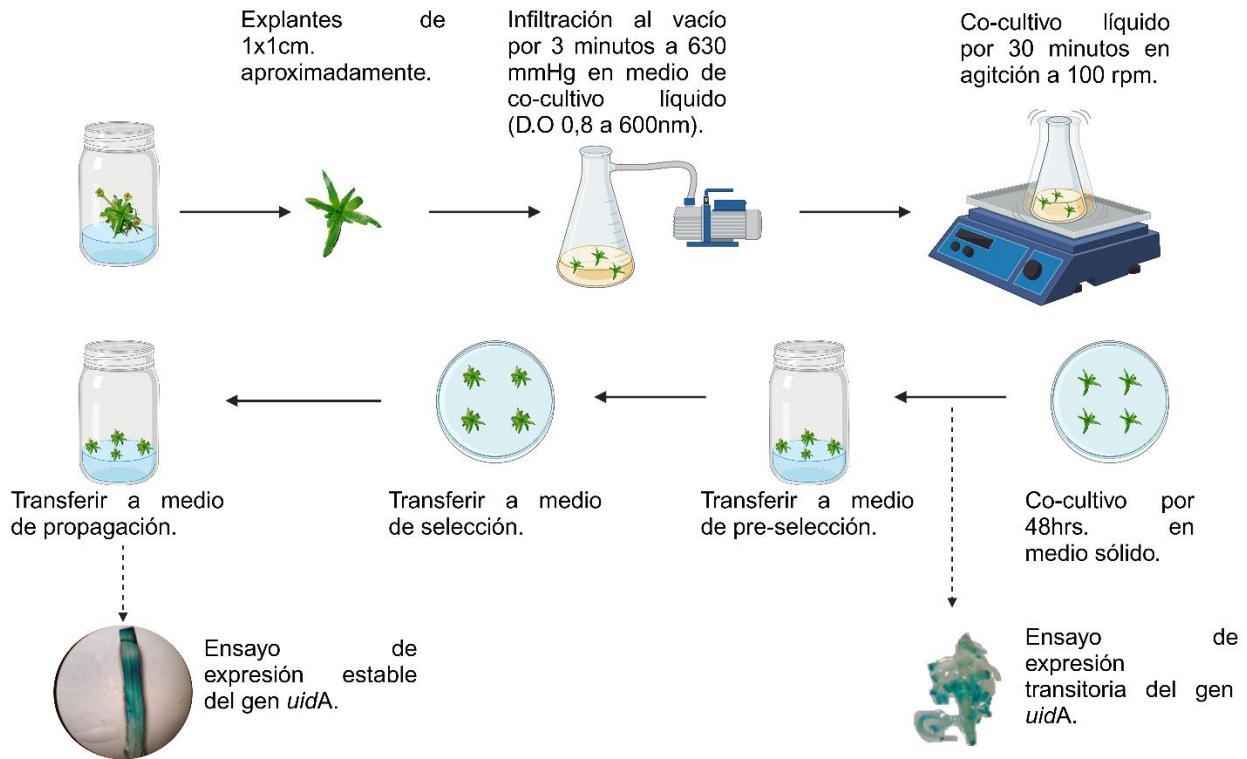


Fig. 7: Esquema general y secuencial del protocolo de transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, llevado a cabo en esta investigación. Realizado utilizando BioRender.com

La Figura 7 sintetiza los pasos fundamentales del protocolo de transformación genética de *C. quitensis* mediada por *A. tumefaciens*. El procedimiento comienza con la preparación de los explantes y su inmersión en un medio de co-cultivo líquido, seguido de la aplicación de infiltración al vacío a 630 mmHg durante 3 minutos, un paso clave que contribuye significativamente a mejorar la eficiencia de la transformación. Posteriormente, los explantes se someten a un co-cultivo en agitación constante durante 30 minutos (sin condiciones de vacío), tras lo cual se transfieren a un medio de co-cultivo sólido, donde se incuban durante 48 horas.

El protocolo continúa con la transferencia de los explantes al medio de preselección, diseñado para facilitar su recuperación y eliminar el exceso de bacterias. A continuación, los explantes son expuestos al medio de selección que contiene kanamicina, permitiendo la identificación y selección de transformantes resistentes. Finalmente, las plantas

seleccionadas son regeneradas en medios de cultivo específicos optimizados para promover su crecimiento.

El proceso concluye con la evaluación de la expresión transitoria y estable del gen reportero uidA mediante ensayos histoquímicos GUS, los cuales permiten confirmar la incorporación y actividad del transgén en las plantas transformadas, identificando así transformantes genéticamente estables.

9. CONCLUSIONES

La hipótesis planteada en esta investigación fue confirmada, ya que la infiltración al vacío demostró ser una estrategia efectiva para incrementar la eficiencia de la transformación genética de *Colobanthus quitensis* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. En específico, este método permitió aumentar la eficiencia del proceso de transformación de un 3% (valor previo reportado) a un 16%, lo que representa un avance significativo en el desarrollo de un protocolo optimizado para esta especie.

El tratamiento con infiltración al vacío (T1) generó un mayor número de plantas sobrevivientes y con expresión estable del gen *uidA* en comparación con el tratamiento sin infiltración al vacío (T2). En T1, ocho plantas sobrevivientes presentaron expresión estable del gen, mientras que en T2, ninguna de las dos plantas sobrevivientes evidenció esta expresión.

La etapa de preselección o recuperación de explantes antes de su exposición al medio de selección fue crucial para mejorar la estabilidad genética y el vigor de las plantas transformadas, destacando la importancia de incluir esta etapa en protocolos futuros de transformación genética.

Los resultados sientan las bases para el desarrollo de protocolos más eficientes de transformación genética en *C. quitensis*. Además, el éxito de este protocolo proporciona herramientas clave para investigaciones futuras en genética y genómica funcional, que pueden enfocarse en mecanismos de adaptación al estrés abiótico y en la mejora de especies vegetales bajo condiciones extremas.

Este trabajo abre oportunidades para explorar técnicas avanzadas, como la edición génica mediante CRISPR/Cas, en combinación con protocolos optimizados de transformación genética, para obtener mejoras más precisas y rápidas en *C. quitensis* y otras especies de interés.

10. BIBLIOGRAFÍA

Altpeter F, Springer N, Bartley L, Blechl A, Brutnell T, Citovsky V, Conrad L, Gelvin S, Jackson D, Kausch A, Lemaux P, Medford J, Orozo-Cardenas M, Tricoli D, VanEck J, Voytas D, Walbot V, Wang K, Zhang Z, Stewart C (2016) Advancing crop transformation in the era of genome editing. *The Plant Cell* tpc.00196.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>

Adlak T, Tiwari S, Tripathi M, Gupta N, Sahu V, Bhawar P, Kandalkar V (2019) Biotechnology: An advanced tool for crop improvement. *Current Journal of Applied Science and Technology* 1–11. <https://doi.org/10.9734/cjast/2019/v33i130081>

Alberdi M, Bravo L, Gutiérrez A, Gidekel M, Corcuera L (2002) Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physiologia Plantarum* 115:479–486. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150401.x>

Ali S, Xianyin Z, Xue Q, Hassan M, Qian H (2006) Investigations for improved genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in two rice cultivars. *Biotechnology* 6:138–147. <https://doi.org/10.3923/biotech.2007.138.147>

Anjanappa R, Gruissem W (2021) Current progress and challenges in crop genetic transformation. *Journal of Plant Physiology* 261:153411. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153411>

Arcos C (2015) Transformación genética de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Memoria para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Los Ángeles. Chile. 62 pp.

Arun M, Chinnathambi A, Subramanyam K, Karthik S, Sivanandhan G, Theboral J, Alharbi S, Kim C, Ganapathi A (2016) Involvement of exogenous polyamines enhances regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in half-seeds of soybean. *Applied Biochemistry and Biotechnology* <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0448-0>

Arun M, Subramanyam K, Mariashibu T, Theboral J, Shivanandhan G, Manickavasagam M, Ganapathi A (2015) Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 175:2266–2287. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1360-x>

Azizi-Dargahlou S, Pouresmaeil M (2024) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation: A Review. *Molecular Biotechnology*. 66:1563–1580. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00788-x>

Bernhard G, Stierle S (2020) Trends of UV radiation in Antarctica. *Atmosphere* 11:795. <https://doi.org/10.3390/atmos11080795>

Basso M, Arraes F, Grossi-de-Sa M, Moreira V, Alves-Ferreira M, Grossi-de-Sa M (2020) Insights into genetic and molecular elements for transgenic crop development. *Frontiers in Plant Science* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00509>

Bascuñán-Godoy L, Sanhueza C, Cuba M, Zuñiga GE, Corcuera L, Bravo L (2012) Cold-acclimation limits low temperature induced photoinhibition by promoting a higher photochemical quantum yield and a more effective PSII restoration in darkness in the Antarctic rather than the Andean ecotype of *Colobanthus quitensis* Kunt Bartl (Cariophyllaceae). *BMC Plant Biology* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-114>

Bhatt R, Asopa P, Jain R, Kothari-Chajer A, Kothari S, Kachhwaha S (2021) Optimization of *Agrobacterium* mediated genetic transformation in *Paspalum scrobiculatum* L. (kodo millet). *Agronomy* 11:1104. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061104>

Burgos Y (2017) Transformación genética de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Memoria para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Vegetal. Universidad de Concepción, Los Ángeles. Chile. 50 pp.

Chen K, Ye C, Guo J, Chen D, Guo T, Liu J, Liu C, Zhou X (2023) *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency and grain phenotypes in six *indica* and *japonica* rice cultivars. *Seed Biology* 2:0–0. <https://doi.org/10.48130/seedbio-2023-0004>

Clemente-Moreno M, Omranian N, Sáez P, Figueroa C, Del-Saz N, Elso M, Poblete L, Orf I, Cuadros-Inostroza A, Cavieres L, Bravo L, Fernie A, Ribas-Carbó M, Flexas J, Nikoloski Z, Brotman Y, Gago J (2020) Cytochrome respiration pathway and sulphur metabolism sustain stress tolerance to low temperature in the Antarctic species *Colobanthus quitensis*. *New Phytologist* 225:754–768. <https://doi.org/10.1111/nph.16167>

Cuba-Díaz M (2011) El clavelito antártico y los mecanismos que lo protegen del frío polar. *Boletín Antártico Chileno* 30: 8-9.

Cuba-Díaz M, Acuña D, Fuentes-Lillo E (2019) Antarctic pearlwort (*Colobanthus quitensis*) populations respond differently to pre-germination treatments. *Polar Biology* 42:1209–1215. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02505-4>

Casanova-Katny M, Bravo L, Molina-Montenegro M, Corcuera L, Cavieres L (2006) Photosynthetic performance of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in a high-elevation site of the Andes of central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 79. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2006000100004>

Chwedorzewska K (2009) Terrestrial Antarctic ecosystems in the changing world: An overview. *Polish Polar Research* 263–276. <https://doi.org/10.4202/ppres.2009.13>

Convey P (1996) The influence of environmental characteristics on life history attributes of antarctic terrestrial Biota. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 71:191–225. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1996.tb00747.x>

Gelvin S (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 67:16–37. <https://doi.org/10.1128/membr.67.1.16-37.2003>

Gianoli E, Inostroza P, Zúñiga-Feest A, Reyes-Díaz M, Cavieres L, Bravo L, Corcuera LJ (2004) Ecotypic differentiation in morphology and cold resistance in populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) from the Andes of central Chile and the maritime antarctic. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 36:484–489. [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(2004\)036\[0484:edimac\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1657/1523-0430(2004)036[0484:edimac]2.0.co;2)

Gielwanowska I, Bochenek A, Gojlo E, Gorecki R, Kelleman W, Pastorczyk M, Szczuka E (2011) Biology of generative reproduction of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. from King George Island. *Polish Polar Research* 32:139–155

Gómez-Espinoza O, González-Ramírez D, Bresta P, Karabourniotis G, Bravo L (2020) Decomposition of calcium oxalate crystals in *Colobanthus quitensis* under CO₂ limiting conditions. *Plants* 9:1307. <https://doi.org/10.3390/plants9101307>

Gnasekaran P, James Antony J, Uddain J, Subramaniam S (2014) *Agrobacterium*-mediated transformation of the recalcitrant Vandakasem’s delight orchid with higher efficiency. *The Scientific World Journal* 2014:1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/583934>

- Gould J (2003) Transformation of the cereals using *Agrobacterium*. En: Recombinant Gene Expression Protocols. Humana Press, New Jersey, pp 491–502
- Greene D, Holtom A (1971) Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. a *Deschampsia Antarctica* Desv.: III. Distribution, habitats and performance in the Antarctic botanical zone. British Antarctic Survey Bulletin 26:1–29
- Grobe C, Ruhland C, Day T (1997) A new population of *Colobanthus quitensis* near Arthur Harbor, Antarctica: correlating recruitment with warmer summer temperatures. Arctic and Alpine Research 29:217–221
- Guo M, Ye J, Gao D, Xu N, Yang J (2019) *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy. Biotechnolgy Advances 37:259–270. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.008>
- Henzi M, Christey M, McNeil D (2000) Factors that influence *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica). Plant Cell Reports 19:994–999. <https://doi.org/10.1007/s002990000221>
- Hodson (2005) Transformación genética de plantas para Resistencia a virus. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias 29:5–24
- Holtom A, Greene S (1967) The growth and reproduction of Antarctic flowering plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 252:323–337. <https://doi.org/10.1098/rstb.1967.0021>
- Hooykaas P, Schilperoort R (1992) *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 19:15–38. <https://doi.org/10.1007/bf00015604>
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6:3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Jilin C, Shaoya L, Yubing H, Jingying L, Lanqin X (2022) An update on precision genome editing by homology-directed repair in plants. Plant Physiology 188:1780–1794. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac037>

Kairuz E, Pérez-Alonso N, Chong-Pérez B (2018). Estrategias para la selección *in vitro* de plantas transgénicas de *Digitalis L.* Biotecnología Vegetal, 18(2). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/577>

Klagges M, Cordero C, Cuba-Díaz M (2013) Las poblaciones de *Colobanthus quitensis* presentan diferenciaciones morfo-fisiológicas que podrían evidenciar la formación de ecotipos en su hábitat. Libro de resúmenes VII Congreso Latinoamericano de Ciencia VII Congreso Latinoamericano de Ciencia Antártica. Publicación del Instituto Antártico Chileno Antártica 49–52

Komarkova V, Poncet S, Poncet J (1990) Additional and revisited localities of vascular plants *Deschampsia antarctica* desv. And *Colobanthus quitensis* (kunth) Bartl. In the antarctic peninsula area. Arctic and Alpine Research 22:108. <https://doi.org/10.2307/1551725>

Kumar M, Prusty M, Pandey M, Singh P, Bohra A, Guo B, Varshney RK (2023) Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing for abiotic stress management in crop plants. Frontiers in Plant Science 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1157678>

Lacroix B, Citovsky V (2022) Genetic factors governing bacterial virulence and host plant susceptibility during *Agrobacterium* infection. En: Advances in Genetics. Elsevier, pp 1–29

Lacroix B, Citovsky V (2019) Pathways of DNA transfer to plants from *Agrobacterium tumefaciens* and related bacterial species. Annual Review of Phytopathology 57:231–251. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100101>

Lin J, Zhou B, Yang Y, Mei J, Zhao X, Guo X, Huang X, Tang D, Liu X (2009) Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. Plant Cell Reports 28:1065–1074. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0706-2>

Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C (2016) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. Nature Plants 2. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.139>

Manickavasagam M, Subramanyam K, Ishwarya R, Elayaraja D, Ganapathi A (2015) Assessment of factors influencing the tissue culture-independent *Agrobacterium*-mediated

in planta genetic transformation of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123:309–320. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0836-x>

Mantovani A, Cardoso R (2000) Leaf micromorphology of Antarctic pearlwort *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. *Polar Biology* 23:531–538. <https://doi.org/10.1007/s003000000117>

Mayavan S, Subramanyam K, Arun M, Rajesh M, Kapil Dev G, Sivanandhan G, Jaganath B, Manickavasagam M, Selvaraj N, Ganapathi A (2013) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. *Plant Cell Reports* 32:1557–1574. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1467-5>

Moore D (1970a) Antarctic terrestrial plants and their ecology. *British Antarctic Survey Bulletin* 23:63–80

Moore D (1970b) Studies in *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. And *Deschampsia antarctica* Desv. II Taxonomy, distribution and relationships. *British Antarctic Survey Bulletin* 23:63–80

Molina-Montenegro A, Torres-Díaz C, Carrasco-Urra F, González-Silvestre L, Gianoli E (2012) Plasticidad fenotípica en dos poblaciones antárticas de *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae) bajo un escenario simulado de cambio global. *Gayana Botánica* 69:152–160. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432012000100015>

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nyaboga E, Njiru J, Tripathi L (2015) Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration, and *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar TME14. *Frontiers in Plant Science* 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00411>

Nasti R, Voytas D (2021) Attaining the promise of plant gene editing at scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004846117>

Øvstedal D, Lewis Smith R. (2001). Lichens of Antarctica and South Georgia. A guide to their identification and ecology. 411 pp. Cambridge: Cambridge University Press. *Annals Of Botany* 88:953–955. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1532>

Pearce D (2008) Climate change and the microbiology of the Antarctic peninsula region. *Science Progress* 91:203–217. <https://doi.org/10.3184/003685008x332534>

Peng W, Lee Y, Nester E (1998) The phenolic recognition profiles of the *Agrobacterium tumefaciens* VirA protein are broadened by a High Level of the sugar binding protein ChvE. *Journal of Bacteriology* 180:5632–5638. <https://doi.org/10.1128/jb.180.21.5632-5638.1998>

Pisano E (1976) Cormófitos acuáticos de Magallanes. *Anales Instituto de la Patagonia. Anales Instituto de la Patagonia Punta Arenas (Chile)* 7:115–136

Ramírez C, Cavieres L, Sanhueza C, Vallejos V, Gómez-Espinoza O, Bravo L, Sáez P (2024) Ecophysiology of Antarctic vascular plants: An update on the extreme environment resistance mechanisms and their importance in facing climate change. *Plants* 13:449. <https://doi.org/10.3390/plants13030449>

Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Reports* 15:727–730. <https://doi.org/10.1007/bf00232216>

Rahman S, Khan M, Ullah R, Ahmad F, Raza G (2024) *Agrobacterium*-mediated transformation for the development of transgenic crops; Present and future prospects. *Molecular Biotechnolgy* 66:1836–1852. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00826-8>

Robinson S, Wasley J, Tobin A (2003) Living on the edge—plants and global change in continental and maritime Antarctica. *Global Change Biology* 9:1681–1717. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2003.00693.x>

Rogers A (2007) Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 362:2191–2214. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1948>

Sáez P, Bravo L, Cavieres L, Vallejos V, Sanhueza C, Font-Carrascosa M, Gil-Pelegrín E, Javier Peguero-Pina J, Galmés J (2017) Photosynthetic limitations in two Antarctic vascular

plants: importance of leaf anatomical traits and Rubisco kinetic parameters. *Journal of Experimental Botany* 68:2871–2883. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx148>

Sáez P, Cavieres L, Galmés J, Gil E, Peguero J, Sancho D, Vivas M, Sanhueza C, Ramírez C, Rivera B, Corcuera L, Bravo L (2018) In situ warming in the Antarctic: effects on growth and photosynthesis in Antarctic vascular plants. *The New Phytologist* 218:1406–1418. <https://doi.org/10.1111/nph.15124>

Schindele A, Dorn A, Puchta H (2020) CRISPR/Cas brings plant biology and breeding into the fast lane. *Current Opinion in Biotechnology* 61:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.08.006>

Sedaghati B, Haddad R, Bandehpour M (2021) Development of an efficient *in-planta Agrobacterium*-mediated transformation method for Iranian purslane (*Portulaca oleracea* L.) using sonication and vacuum infiltration. *Acta Physiologiae Plantarum* 43. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03185-y>

Singh J, Singh R, Khare R (2018) Influence of climate change on Antarctic flora. *Polar Science* 18:94–101. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.05.006>

Sierra-Almeida A, Casanova-Katny M, Bravo L, Corcuera L, Cavieres L (2007) Photosynthetic responses to temperature and light of Antarctic and Andean populations of *Colobanthus quitensis* (Caryophyllaceae). *Revista Chilena de Historia Natural* 80. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2007000300007>

Sierra-Almeida A, Cavieres L, Bravo L (2018) Warmer temperatures affect the in situ freezing resistance of the antarctic vascular plants. *Frontiers in Plant Science* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01456>

Smith R (2003) The enigma of *Colobanthus quitensis* and *Deschampsia antarctica* in Antarctica. *Antarctic Biology*. Antarctic Biology. Backhuys Publishers, Leiden, the Netherlands.

Stachel S, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624–629

- Su W, Xu M, Radani Y, Yang L (2023) Technological development and application of plant genetic transformation. *International Journal Of Molecular Science* 24:10646. <https://doi.org/10.3390/ijms241310646>
- Taak P, Tiwari S, Koul B (2020) Optimization of regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a commercially important natural sweetener plant. *Scientific Reports* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72751-8>
- Tague B, Mantis J (2006) *in planta Agrobacterium*-mediated transformation by vacuum infiltration. En: *Arabidopsis Protocols*. Humana Press, New Jersey, pp 215–224
- Thiruvengadam M, Hsu W-H, Yang C-H (2011) Phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic orchid plants (*Oncidium Gower Ramsey*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104:239–246. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9827-0>
- Tiwari M, Mishra A, Chakrabarty D (2022) *Agrobacterium*-mediated gene transfer: recent advancements and layered immunity in plants. *Planta* 256. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03951-x>
- Torres-Díaz C, Gallardo-Cerda J, Lavin P, Oses R, Carrasco-Urra F, Atala C, Acuña-Rodríguez I, Convey P, Molina-Montenegro M (2016) Biological interactions and simulated climate change modulates the ecophysiological performance of *Colobanthus quitensis* in the antarctic ecosystem. *PLoS One* 11:e0164844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164844>
- Vasudevan V, Sathish D, Ajithan C, Sathish S, Manickavasagam M (2021) Efficient *Agrobacterium*-mediated *in planta* genetic transformation of watermelon [*Citrullus lanatus* Thunb.]. *Plant Biotechnology Reports* 15:447–457. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00691-4>
- Wen L, Chen Y, Schnabel E, Crook A, Frugoli J (2019) Comparison of efficiency and time to regeneration of *Agrobacterium*-mediated transformation methods in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* 15:20. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0404-1>
- Xiong A, Peng R, Zhuang J, Chen J, Zhang B, Zhang J, Yao Q (2011) A thermostable β -glucuronidase obtained by directed evolution as a reporter gene in transgenic plants. *PloS One* 6:e26773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026773>

- Xiong F, Mueller E, Day T (2000) Photosynthetic and respiratory acclimation and growth response of Antarctic vascular plants to contrasting temperature regimes. *American Journal of Botany* 87:700–710. <https://doi.org/10.2307/2656856>
- Xu N, Wang M, Yang X, Xu Y, Guo M (2020) *In silico* analysis of the chemotactic system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbial Genomics* 6. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000460>
- Xu S, Wu Z, Zhao J, Zhang F, Zhang X, Chen F, Teng N (2022) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum via vacuum infiltration of internode. *Ornamental Plant Research* 2:1–7. <https://doi.org/10.48130/opr-2022-0001>
- Zhang B, Zhao X, Zhang L, Liu H, Zhu C, Ma Z (2022) *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Tripterygium wilfordii* and its application to enhance the accumulation of triptolide. *Industrial Crops and Products* 187:115506. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115506>
- Zhu H, Li C, Gao C (2020) Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21:661–677. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00288-9>
- Zupan J, Muth T, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 23:11–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00808.x>
- Zhang X, Wu Q, Lin S, Zhang Z, Wang Z, Wang Q, Yan X, Bendahmane M, Bao M, Fu X (2021) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Dianthus chinensis*. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam) 287:110279. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110279>
- Zhang X, Wu Q, Lin S, Zhang Z, Wang Z, Wang Q, Yan X, Bendahmane M, Bao M, Fu X (2021) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Dianthus chinensis*. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam) 287:110279. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110279>
- Zhang Y, Massel K, Godwin I, Gao C (2018) Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology* 19. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1586-y>

11. ANEXO

De manera paralela a los experimentos principales de esta investigación, se llevó a cabo un ensayo práctico con fines docentes, centrado en la transformación genética de callos celulares de *Colobanthus quitensis*. En este ensayo se utilizó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, portadora del plásmido pBI121, para realizar una comparación preliminar entre la transformación genética mediada por infiltración al vacío y aquella realizada sin infiltración al vacío. Los resultados, basados en la expresión transitoria del gen *uidA*, revelaron una expresión mayor en los callos celulares transformados mediante infiltración al vacío en comparación con los transformados sin este procedimiento. Por tanto, se recomienda que futuros experimentos de transformación genética en callos celulares de *C. quitensis* validen esta observación preliminar, tomando como referencia la metodología descrita en esta investigación.

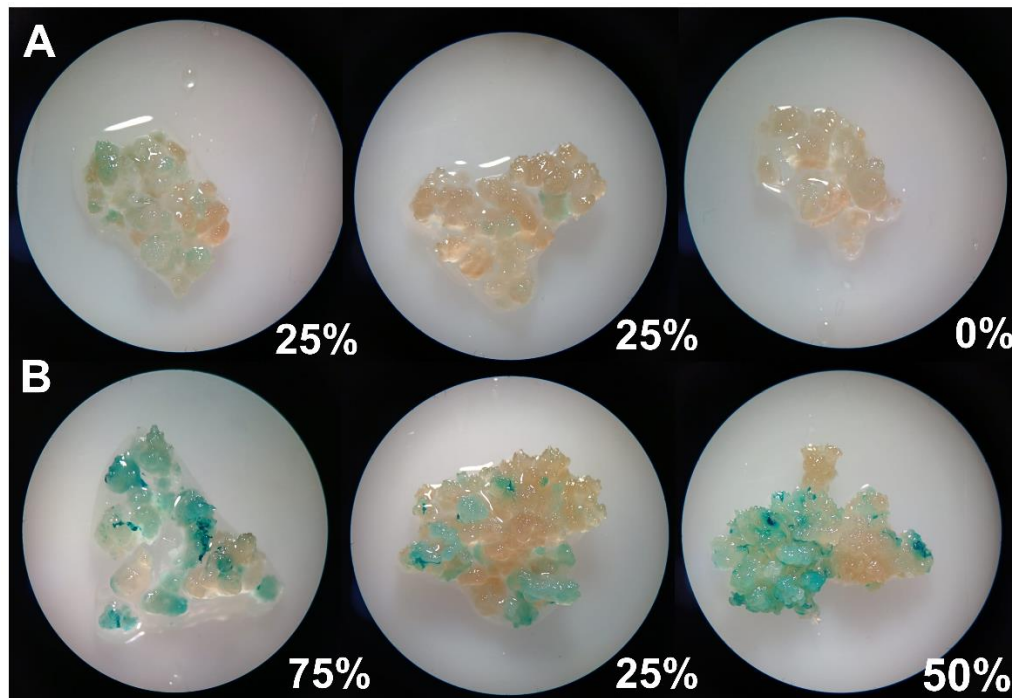


Fig. 8: Expresión transitoria del gen *uidA* en callos celulares de *Colobanthus quitensis*, transformados sin infiltración al vacío (A) y con infiltración al vacío (B). Escala de referencia de Burgos (2017).