



Escuela de Pregrado
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

“Selección de líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa* (kiwi) que expresan el gen *DcAREB3* y estudio preliminar de la tolerancia a estrés salino”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

María Jesús Gutiérrez Serrano

Director de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange

Co-Director de Seminario de Título: Luis Felipe Quiroz

Diciembre, 2019

Santiago de Chile

BIOGRAFÍA



María Jesús Gutiérrez Serrano nació el 21 de Septiembre de 1994 en Coquimbo, IV Región, Chile. Pasó la mayoría de su niñez y adolescencia viviendo con su familia en La Herradura, Coquimbo. Realizó sus estudios básicos y de enseñanza media en el colegio The International School La Serena. En 2013 ingresó al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, graduándose de Bachiller con Mención en Ciencias Naturales y Exactas el año 2015. Ese mismo año se concreta su transferencia interna a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de la misma institución.

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre, mi familia, a mis amigos y amigas, y a los cachorros.

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| BIOGRAFÍA..... | ii |
| DEDICATORIA | iii |
| INDICE DE CONTENIDOS..... | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS..... | vii |
| INDICE DE FIGURAS..... | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1 Genero Actinidia..... | 5 |
| 1.2 <i>Actinidia</i> y estrés abiótico | 6 |
| 1.3 Factores de transcripción AREB..... | 9 |
| 1.3.1 Mecanismo de acción para inducir tolerancia a estrés abiótico..... | 11 |
| 1.4 Estrategia a utilizar | 16 |
| 1.5 Objetivo general | 16 |
| 1.6 Objetivos específicos | 17 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 18 |
| 2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Actinidia deliciosa</i> | 18 |
| 2.2 Extracción de ADN a partir de tejido vegetal | 20 |

| | |
|---|----|
| 2.3 Electroforesis en geles de agarosa | 21 |
| 2.4 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal | 21 |
| 2.5 Reacción en cadena de polimerasa PCR: PCR convencional | 22 |
| 2.6 Síntesis de ADNc | 24 |
| 2.7 RT-PCR cuantitativo: qRTPCR..... | 25 |
| 2.8 Ensayo DAB..... | 27 |
| 2.9 Análisis de imágenes en ImageJ | 28 |
| RESULTADOS | 30 |
| 3.1 Selección de líneas transgénicas para el factor de transcripción <i>DcAREB3</i> de <i>Actinidia deliciosa</i> | 30 |
| 3.2 Determinación de los niveles de expresión del transgén | 32 |
| 3.2.1 Extracción de ARN y determinación de su pureza e integridad..... | 32 |
| 3.2.2 Verificación de partidores <i>in silico</i> | 34 |
| 3.2.3 Verificación de partidores <i>in vitro</i> | 35 |
| 3.2.3 qRTPCR de plantas transgénicas de <i>Actinidia deliciosa</i> | 37 |
| 3.2.4 Determinación de los niveles de transcrito del transgén DcAREB3..... | 43 |
| 3.3 Ensayo semicuantitativo de nivel de peróxido de hidrógeno en hojas de <i>Actinidia deliciosa</i> | 44 |
| DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES | 52 |
| 4.1 Caracterización molecular de líneas transgénicas de <i>Actinidia deliciosa</i> | 52 |
| 4.3 Ensayo de tolerancia a estrés salino | 56 |

CONCLUSIONES 59

BIBLIOGRAFIA..... 60

ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Programas para PCR convencional. | 23 |
| Tabla 2. Partidores utilizados en este Seminario de Título..... | 24 |
| Tabla 3. Programas utilizados para qRTPCR 18S y actina. | 26 |
| Tabla 4. Programa utilizado para qRTPCR AREB3..... | 26 |
| Tabla 5. Datos obtenidos de espectrofotómetro Epoch2..... | 33 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tolerancia a la salinidad de distintos frutales. | 7 |
| Figura 2. Factores de transcripción de tipo bZIP. | 11 |
| Figura 3. Esquema representativo de la señalización por ABA. | 13 |
| Figura 4. Esquema representativo de la biosíntesis de ABA. | 15 |
| Figura 5. Vector de transformación pK7RWG2. | 19 |
| Figura 6. Fenotipo de plántulas transformantes y PCR convencional a partir de ADN genómico de <i>Actinidia deliciosa</i> para determinar y seleccionar las líneas transgénicas. | 31 |
| Figura 7. Extracción de ARN de líneas transgénicas de <i>Actinidia deliciosa</i> | 32 |
| Figura 8. Primer-BLAST de <i>Daucus carota</i> con partidores qAREB3. | 34 |
| Figura 9. Verificación de la especificidad de partidores para amplificar el gen <i>DcAREB3</i> | 35 |
| Figura 10. Presencia de transcrito <i>DcAREB3</i> en líneas transgénicas de <i>Actinidia deliciosa</i> mediante RT-PCR convencional. | 36 |
| Figura 11. Perfil del qRT-PCR del gen 18S. | 39 |
| Figura 12. Perfil del qRT-PCR del gen Actina. | 40 |
| Figura 13. Perfil del qRT-PCR para el gen <i>DcAREB3</i> | 42 |
| Figura 14. Niveles de transcrito relativo a 18S de <i>DcAREB3</i> en líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> | 43 |
| Figura 15. Resultados de ensayo DAB. | 46 |
| Figura 16. Imágenes modificadas para análisis semicuantitativo del ensayo DAB. | 49 |
| Figura 17. Gráfico de área mayormente oxidada para ensayo DAB. | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| 2,4-D | : Ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| ABA | : Acido Abscísico |
| ABF | : ABA-binding factor o factor de unión a elementos de respuesta a ABA |
| ABRE | : Elementos de respuesta a ABA |
| ADN | : Acido desoxirribonucleico |
| ADNc | : Acido desoxirribonucleico complementario |
| ADN-T | : ADN de transferencia |
| ADN-Ti | : ADN inductor de tumores |
| AREB | : Proteínas de unión a elementos de respuesta de ABA |
| ARN | : Ácido ribonucleico |
| BAP | : 6-bencilaminopurina |
| DAB | : 3,3-diaminobencidina |
| dNTP | : Desoxinucleótido trifosfato |
| Kb | : Kilobase |
| MS | : Murashige y Skoog |
| NCED | : 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa |
| Pb | : Pares de bases |
| PCR | : Reacción en Cadena de la Polimerasa |

PSY : Fitoeno Sintasa
RFP : Proteína fluorescente roja
ROS : Especie reactiva de oxígeno
VSI : Vector Sin Inserto
WT : Planta silvestre o wild-type

RESUMEN

Actinidia deliciosa corresponde a una fruta de relevancia económica para Chile y se ha descrito como altamente sensible a la salinidad del suelo, en donde concentraciones cercanas a los 50 mM NaCl requieren que se aplique un fuerte manejo agronómico para mantener su producción. Los factores de transcripción de tipo AREB/ABF o proteínas de respuesta a Acido Abscísico (ABA) descritos en *Arabidopsis thaliana* son factores del tipo bZIP que participan en la respuesta mediada por la hormona vegetal ABA, que modera la tolerancia de plantas a altas concentraciones de sal, frío o sequía. La síntesis de ABA comienza con la de sus precursores carotenoides gracias a la enzima *PSY*. En *Daucus carota*, nuestro modelo de estudio, existen dos copias de *PSY* que presentan tres secuencias de unión para factores AREB/ABF en su promotor. Luego de un estudio de alineación para factores de transcripción de tipo AREB/ABF entre *D. carota* y *A. thaliana*, se obtuvieron tres factores *DcAREB* que fueron caracterizados, dentro de los cuales destaca *DcAREB3*, objeto de estudio en este seminario de título. *DcAREB3* fue previamente transformado en *A. deliciosa* para dilucidar si el gen *DcAREB3* otorga o no protección frente a estrés abiótico y en este trabajo genotificamos las líneas transgénicas y el nivel de expresión relativo del gen *DcAREB3* en ellas, para luego realizar un ensayo de tolerancia a estrés salino en plantas transgénicas. Para llevar a cabo los objetivos, se mantuvieron y propagaron *in vitro* las plantas transgénicas, así como sus respectivos controles. Mediante PCR se obtuvieron 7 líneas transgénicas para *DcAREB3*, de las cuales la línea 1 y 6 tenían el mayor nivel de expresión relativo del transgén y las líneas 4 y 7 no presentaron abundancia de transcrito. Finalmente, se realizó un ensayo DAB semicuantitativo para medir los niveles de peróxido de hidrógeno en hojas de *A. deliciosa* frente a estrés

salino. Debido a la falta de tejido vegetal, el ensayo de tolerancia a estrés salino se realizó con un pool general de hojas de las líneas transgénicas y solo se obtuvo un resultado preliminar, el cual indica que el gen *DcAREB3* no protegería a las plantas transgénicas frente a estrés salino. Sin embargo, para tener conclusiones más confiables se debería repetir el experimento con plantas completas o con un número mayor de hojas por línea transgénica y al menos dos repeticiones por condición.

ABSTRACT

Actinidia deliciosa is a fruit of economic relevance for Chile and has been described as highly sensitive to soil salinity, where it is specifically determined at 50 mM NaCl that a strong agronomic management is required to maintain its production.

AREB/ABF-type transcription factors or Abscisic Acid (ABA) response proteins described in *Arabidopsis thaliana* are bZIP-type transcription factors that participate in the response mediated by ABA plant hormone, which moderates plant tolerance to high amounts of salinity, cold or drought. The synthesis of ABA begins with that of its carotenoid precursors thanks to the *PSY* enzyme. In *Daucus carota*, our study model, there are two copies of *PSY* that present three binding sequences for AREB/ABF factors in its promoter. After an alignment study for transcription factors of AREB/ABF type between *D. carota* and *A. thaliana*, we obtained three *DcAREB* factors that were characterized, among which *DcAREB3* stands out, object of study in this title seminar. *DcAREB3* was previously transformed into *A. deliciosa* to determine whether *DcAREB3* grants protection against salt stress and in this work, we genotyped the transgenic lines and the level of relative expression of the *DcAREB3* gene and performed a salt stress tolerance test in transgenic plants. To achieve the objectives, the transgenic plants, as well as their controls, were maintained and propagated *in vitro*.

By means of PCR, 7 transgenic lines were obtained for *DcAREB3*, of which line 1 and 6 had the highest level of relative expression of the transgene and line 4 and 7 did not. Finally, a semi-quantitative DAB test was performed to measure hydrogen peroxide levels in *A. deliciosa* leaves against saline stress. Due to the lack of sufficient plant tissue, the salt stress tolerance test was performed with a general pool of leaves of the transgenic lines and only a preliminary result was obtained, which indicates that the

DcAREB3 gene does not protect the transgenic plants against saline stress. However, to have more reliable conclusions, the experiment should be repeated with whole plants or with a greater number of leaves per transgenic line and at least two repetitions per condition.

INTRODUCCIÓN

1.1 Genero *Actinidia*

El género *Actinidia* corresponde a especies de enredaderas perennes caducifolias nativas del sur y este de Asia que producen frutos clasificados como bayas de forma esférica o casi esférica (Ferguson, 1984). Se han descrito un total de 76 especies y aproximadamente 120 taxones en total, con un número básico de 29 cromosomas y una inusual variación en la ploidía inter e intrataxal (Ferguson & Huang, 2007).

Especies de *Actinidia* fueron introducidas a Nueva Zelanda, Estados Unidos y Europa entre finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX (Ferguson & Bollard, 1990). Esto deja al kiwi como uno de los cultivos de fruta más recientemente domesticado, donde se destacan las variedades *A. deliciosa* (kiwi de pulpa verde, de genotipo hexaploide) y, más recientemente aún, *A. chinensis* (kiwi de pulpa amarilla, de genotipo diploide). En el caso de *A. deliciosa* ésta fue desarrollada principalmente en Nueva Zelanda, desde donde se logró expandir comercialmente a otros países (Ferguson & Seal, 2008). La producción de kiwi mundialmente se concentra en China, el cual se ubica como el mayor productor mundial, seguido de Italia, Nueva Zelanda, Irán, Grecia y Chile (FAOSTAT & FAO, 2017). En Chile, la exportación de kiwi, preferentemente *A. deliciosa* ocupa el séptimo lugar como fruta fresca exportada. Durante el periodo del año 2017, Chile exportó aproximadamente 174.000 toneladas de fruta fresca, lo que equivale a aproximadamente USD\$188 millones (BANCO CENTRAL DE CHILE, 2017).

El kiwi tiene distintas cualidades que lo hacen atractivo como fruta para consumidores y productores, dentro de ellas su color, textura, sabor y beneficios para la salud, ya que su consumo se ha visto beneficioso para la prevención de enfermedades

cardiovasculares y de ciertos cánceres. Esto gracias a su actividad antioxidante y citotóxica (Guroo et al., 2017).

1.2 Actinidia y estrés abiótico

Uno de los factores importantes para el rendimiento de cualquier cultivo es la adaptación a las condiciones edafoclimáticas de su entorno, como lo son temperatura, cantidad de agua, etc. Un desbalance en esta adaptación o su tolerancia se traduce en lo que se conoce como estrés abiótico. Se ha establecido que el estrés abiótico es una de las causas principales de pérdidas de cosechas a nivel mundial (Mahajan & Tuteja, 2005; Wang, et. al., 2003). Dentro del estrés abiótico destacan la salinidad, la sequía y las temperaturas extremas, las cuales podrían causar la salinización de más del 50% de las tierras cultivables para el año 2050 (Wang et al., 2003). Es por estas razones que la mejora de la tolerancia al estrés abiótico en plantas se establece como un mecanismo para aumentar y mejorar la producción de alimentos.

A. deliciosa o kiwi es susceptible a bajas temperaturas y no pueden soportar temperaturas invernales bajo los 0°C, pero aun así requieren de un periodo frío de invierno para romper la latencia y tener una floración adecuada. A esto se le suma la necesidad de un periodo libre de heladas de aproximadamente 270 a 300 días desde el brote hasta su cosecha comercial. Esto los hace susceptible a heladas de finales de primavera o principios de otoño (Ferguson & Seal, 2008).

Otra característica importante de esta planta es que se ha reportado como sensible a la salinidad, en donde se ve afectado negativamente su crecimiento, lo que se traduce en una reducción de la acumulación de biomasa (Chartzoulakis et al., 1995). Dentro de los frutales de importancia comercial en Chile, se ha descrito al kiwi como uno de los más sensibles (Figura 1), donde una concentración salina de 4,4 mmhos/cm (Merlet &

D'Etigny, 1989), que equivale a aproximadamente 50 mM, ya afecta su crecimiento debiendo aplicar un fuerte manejo agronómico para lograr una producción moderada cercana al 50% del rendimiento potencial (Merlet & D'Etigny, 1989).

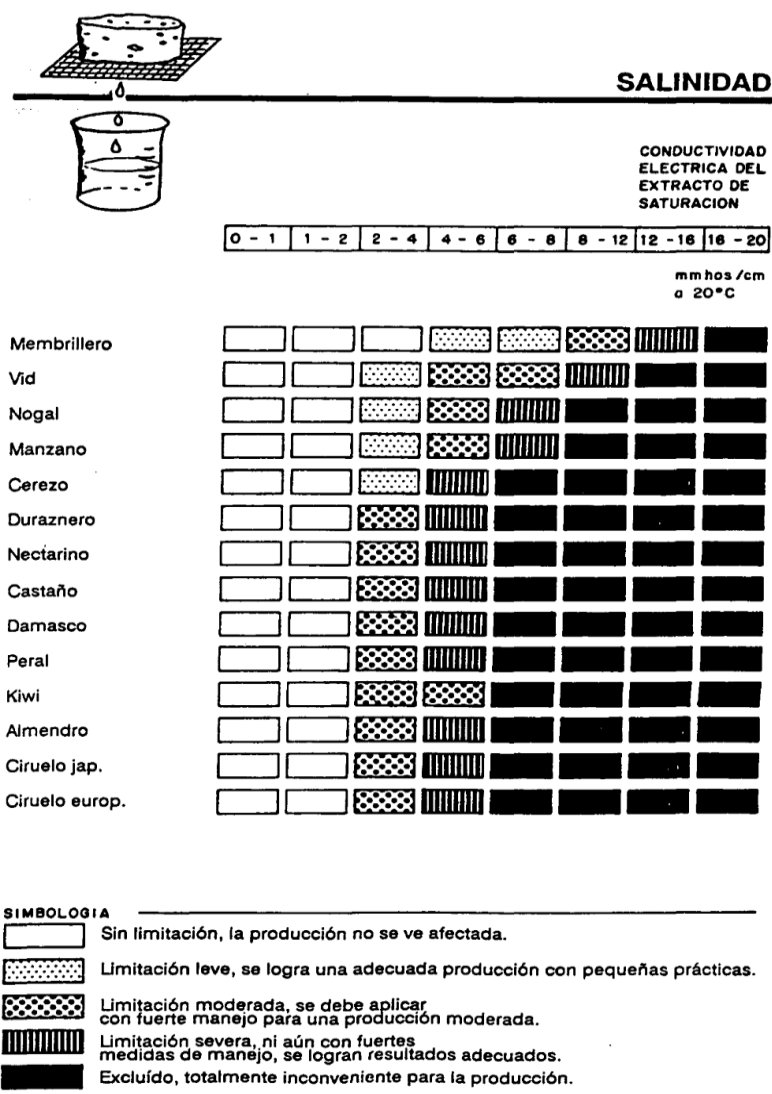


Figura 1. Tolerancia a la salinidad de distintos frutales.

El kiwi, junto a otros frutales, se encuentra en la categoría de alta sensibilidad a salinidad del suelo. Los valores se presentan como rangos aceptados de conductividad eléctrica en suelo, la cual irá en aumento con una mayor concentración de sales presentes en éste. Para el kiwi, el valor crítico de conductividad eléctrica, y de tolerancia a salinidad, corresponde a 4,4 mmhos/cm (Merlet & D'Etigny, 1989).

La importancia del estudio de resistencia a estrés hídrico y estrés salino en Chile es relevante porque se encuentra dentro de los países con “alto estrés hídrico” según el informe publicado por el Instituto de Recursos Mundiales (Forni, 2019). En el informe señala que 17 países se encuentran en peligro “extremadamente alto”, seguido del grupo de 27 países bajo “alto estrés hídrico”, en donde Chile encabeza la lista en el puesto 18 (Hofste et al., 2019). En este informe, se establece que una de las formas más directas de reducir el estrés hídrico al que se enfrenta un país es mejorar la eficiencia de la agricultura.

Tal como se mencionó anteriormente, el crecimiento de las plantas se ve reducido por la salinidad de la tierra (Roy et al., 2014), las cuales desencadenan una respuesta fisiológica y molecular para defenderse frente a este ambiente hostil. A nivel molecular se han identificado cascadas de señalización que culminan en una protección de las células frente a, por ejemplo, la falta de agua. Una de las rutas más conocidas es aquella desencadenada por la hormona ácido abscísico (ABA) para la protección contra la sequía o la salinidad (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Iuchi et al., 2001; Rodríguez-Villalón et al., 2014). Esta hormona induce la expresión de varios genes cuyos productos génicos como deshidrinas y proteínas LEA protegen a la planta bajo estrés hídrico (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). ABA se sintetiza a partir de la ruta de síntesis de carotenoides, siendo la enzima 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED) un punto clave en su síntesis (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Iuchi et al., 2001). Por otro lado, los carotenoides, como β -caroteno, son moléculas antioxidantes que sirven de protectores contra el daño oxidativo generado por estrés por sequía (Krauss et al., 2006). El pigmento β -caroteno actúa como protector al prevenir la

generación de singletes de oxígeno (Farooq et al., 2009) lo que previene la aparición de especies reactivas de oxígeno.

En tomate, concentraciones moderadas de sal aumentan el contenido de licopeno y β -caroteno, mejorando la capacidad antioxidante (De Pascale et al., 2001; Krauss et al., 2006). En lechuga romana con baja tolerancia a estrés salino, la irrigación con concentraciones relativamente bajas de sal, de 5 mM, produjo un aumento en el contenido de carotenoides como luteína y β -caroteno sin producir cambio de color (Kim et al., 2008). Además, se ha reportado que en *Arabidopsis sp.* y tabaco que la ingeniería metabólica de la biosíntesis de carotenoides mejora la tolerancia a estrés lumínico, UV, herbicidas y estrés salino (Chen et al., 2011). Por ejemplo, en el caso de *Arabidopsis thaliana*, se mejoró la tolerancia a estrés salino mediante la sobreexpresión de uno de los genes involucrados en la biosíntesis de carotenoides, lo cual produjo una mejora en la eficiencia de la fotosíntesis y en la capacidad antioxidante (Han et al., 2008). En el caso de *Nicotiana tabacum*, la sobreexpresión de uno de estos genes produjo una fuerte acumulación de carotenoides, además de un aumento de la tolerancia a estrés salino y al estrés por sequía con un aumento en los niveles de ABA (Shi et al., 2015). Esto demuestra la importancia de la ruta de síntesis de los carotenoides, de ABA y sus derivados en la tolerancia de estrés abiótico en plantas, destacando en el caso de los carotenoides su acción antioxidante.

1.3 Factores de transcripción AREB

Las proteínas de respuesta de ABA, corresponden a factores de transcripción conocidos como AREB por sus siglas en inglés (ABA-responsive element binding protein). Estas codifican factores de transcripción de tipo bZIP o basic-domain leucine zipper (Figura 2), las cuales son proteínas que contienen un dominio básico de unión a

ADN unido a un dominio de cremallera de leucina, que interactúan con una secuencia consenso denominada elemento de respuesta a ABA o ABRE por sus siglas en inglés (ABA-responding element). Esta secuencia es un elemento de acción cis que se encuentra en las regiones promotoras de muchos genes inducidos por ABA, formando la secuencia consenso (C/T)ACGTGGC (Choi et al., 2000; S. Kim et al., 2004; Kim, 2005; Uno et al., 2000; Shiota et al., 2008; Simpson et al., 2018; Yoshida et al., 2010).

Los factores de transcripción AREB (Figura 2), también conocidos como ABF por ABA-binding factor o factor de unión a ABA, poseen un dominio bZIP compuesto por α -hélices en la región N-terminal con aminoácidos básicos que pueden interactuar con una secuencia en el surco mayor del ADN de forma específica, y un dominio anfipático de α -hélices en la región C-terminal que es capaz de interactuar con otro dominio bZIP para dimerizar (Llorca et al., 2014; Vinson et al., 2006). La capacidad de dimerización de esta proteína se traduce en que para producir una activación efectiva del factor de transcripción se necesita más de una copia de la secuencia ABRE o un elemento de acoplamiento (Choi et al., 2000; Kim, 2006; Uno et al., 2000), por lo que en este caso los factores AREB caen dentro del grupo A de factores bZIP (Jakoby et al., 2002).

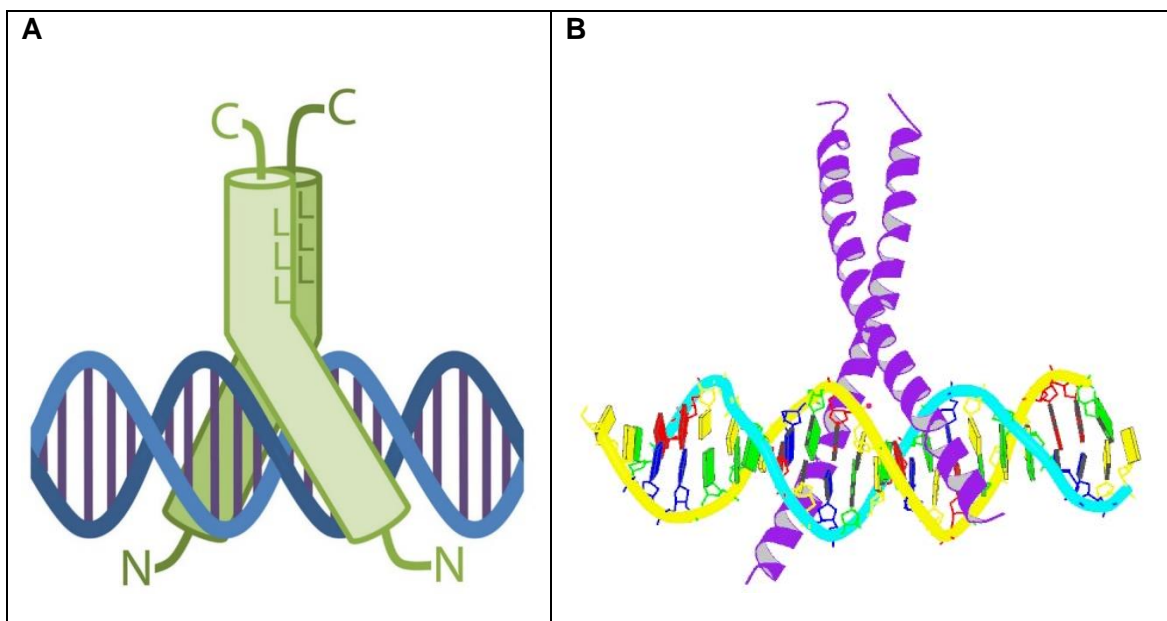


Figura 2. Factores de transcripción de tipo bZIP

La región N-terminal interactúa con el surco mayor del ADN de forma específica mediante el dominio básico de unión, mientras que la región C-terminal interactúa con otro dominio de cremallera de leucina para dimerizar. A) Esquema de un dímero bZIP unido a ADN. Ambas proteínas forman una estructura en forma de Y (Figura 2 Llorca et al., 2014). B) Modelo del factor de transcripción de tipo bZIP AREB3 de *Arabidopsis thaliana* (Jakoby et al., 2002; PlantTFDB, s. f.)

Estos factores de transcripción tienen la capacidad de responder frente a cambios de concentración de la hormona ABA, tal como su nombre lo indica, y son inducidos por ABA, altas concentraciones de sal (250 mM NaCl), frío o sequía (Choi et al., 2000). Es por esto que los ABF o ABRE están involucrados con las respuestas a estrés dependientes de ABA (Kim et al., 2004).

1.3.1 Mecanismo de acción para inducir tolerancia a estrés abiótico

Dentro de los AREB pertenecientes a la ruta de respuesta de ABA, en *Arabidopsis thaliana* se encuentran los ABF1, ABF2/AREB1, ABF3 y ABF4/AREB2 (Choi et al., 2000; Kang et al., 2002; Uno et al., 2000), los cuales son parte de una subfamilia de ABA-INSENSITIVE 5 (ABI5), llamada subfamilia bZIP ABI5 (Kim et al., 2002). ABF1 es

inducido por frío, ABF2 y ABF3 son inducidos por altas concentraciones de sal y ABF4 es inducido por frío, altas concentraciones de sal y estrés hídrico. ABF2 y ABF4 destacan por su rápida respuesta a ABA exógeno (Choi et al., 2000).

En cuanto a la señalización por ABA, ésta comienza con receptores para la hormona, identificados en *Arabidopsis thaliana*, llamados resistencia a pirrabactina 1, PYR1 por sus siglas en inglés; PYR-related o PYL; y receptor del componente regulador de ABA o RCAR por sus siglas en inglés. Estos receptores se pueden unir a proteínas fosfatasa del grupo A, conocidas como PP2C en presencia de ABA (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Esto libera la proteína quinasa 2 (SnRK2) relacionada a la proteína sacarosa no fermentadora 1 (SNF1), las cuales se autofosforilan en un loop de activación. De esta forma la SnRK2 activa puede fosforilar proteínas de sustrato río abajo, como factores de transcripción (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Sah et al., 2016), esto incluye factores ABF o AREB y ABI5 (Fujii et al., 2007). En caso de que no haya presencia de ABA, las proteínas SnRK2 se encuentran inactivadas por PP2C y no hay señalización río abajo (Sah et al., 2016). Un esquema de la señalización por ABA se muestra en la Figura 3. De esta forma, se activa la expresión de genes que generan la respuesta de ABA por estrés, como por ejemplo el cierre de los estomas (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013).

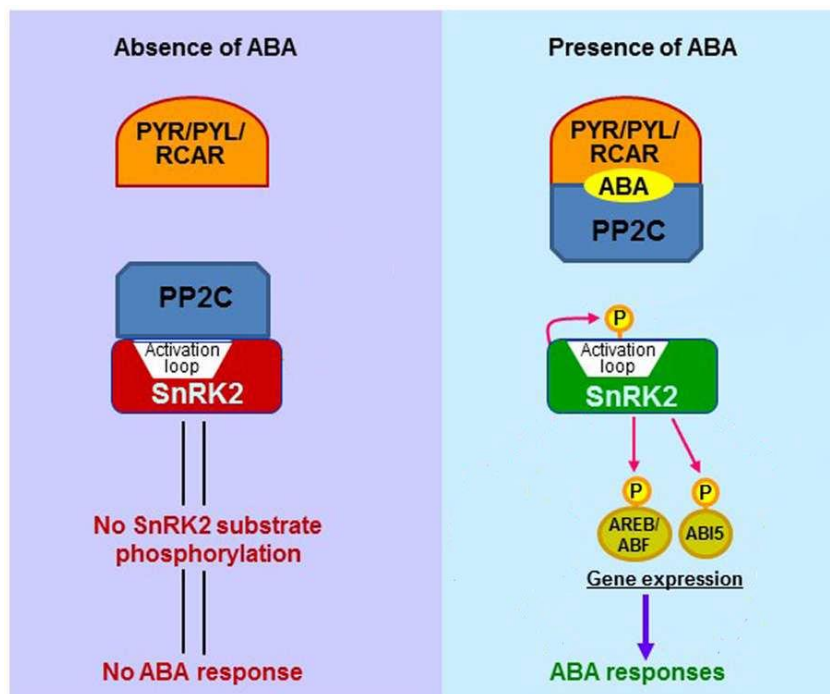


Figura 3. Esquema representativo de la señalización por ABA.

En ausencia de ABA PP2C se asocia con SnRK2 inactivándola e impidiendo la fosforilación río abajo. En presencia de ABA, los receptores PYR/PYL/RCAR se unen a ABA e interactúan con PP2C, liberando a SnRK2. Esto permite que ésta última se autofosforile en su loop de activación y pueda fosforilar factores de transcripción río abajo (Modificado de Figura 2 Sah et al., 2016).

Recientemente, en *Daucus carota*, se determinó que bajo tratamientos de NaCl de 250 mM se produce un aumento de los niveles de expresión de *DcPSY1* y *DcPSY2*, correlacionado con un aumento de ABA en hojas y raíces (Simpson et al., 2018). La fitoeno sintasa (*PSY*) corresponde a la primera enzima en la síntesis de carotenoides (Figura 4), ruta de la cual deriva ABA, y posee dos copias en zanahoria (Simpson et al., 2018). Esta enzima, que se encuentra en el plastidio, es la más regulada en la ruta de síntesis de carotenoides, entre ellos el β -caroteno, y por tanto de vital importancia para generar los precursores de ABA (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012; Sah et al., 2016). Estos precursores continúan el

proceso de síntesis de ABA en el plastidio, donde se lleva a cabo una epoxidación desde zeaxantina y anteraxantina a violaxantina catalizada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP) (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013). Luego de algunas modificaciones, la violaxantina es convertida a 9-cis-violaxantina o 9'-cis-neoxantina. El corte de estas moléculas por la enzima 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) produce la xantoxina (Figura 4). Este paso, junto a la de ZEP, son claves para la producción de ABA (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Sah et al., 2016). La xantoxina es convertida a un aldehído de ABA mediante la enzima alcohol deshidrogenasa/reductasa (SDR) de cadena corta, reacción que ocurre en el citoplasma de la célula (Figura 4). Este último precursor es oxidado a ABA mediante la enzima abscísica aldehído oxidasa (AAO) (Sah et al., 2016).

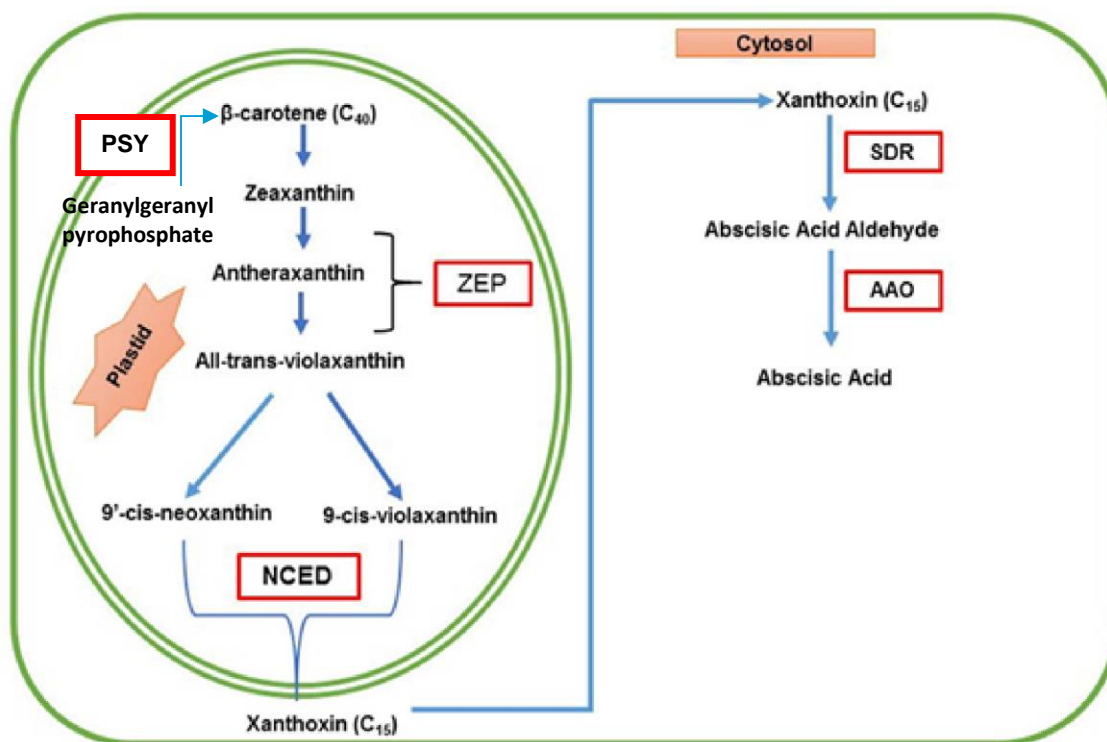


Figura 4. Esquema representativo de la biosíntesis de ABA.

Para la síntesis de ABA se requiere producir los carotenoides como el β -caroteno para lo cual PSY (fitoeno sintasa) es la enzima clave. La síntesis de ABA comienza en el plastidio con la conversión de β -caroteno a zeaxantina y anteraxantina a violaxantina por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP). Esta última molécula es convertida a 9'-cis-violaxantina o 9'-cis-neoxantina por la enzima 9'-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa (NCED), dando un intermediario de 15 carbonos llamado xantoxina. Éste es exportado al citoplasma y convertido a un aldehído de ABA por la enzima alcohol deshidrogenasa/reductasa (SDR) de cadena corta y, finalmente, es oxidado a ABA mediante la enzima abscísica aldehído oxidasa (AAO). (Adaptado de Sah et al., 2016).

Se describió también que ABA induce la síntesis de sus precursores metabólicos, los carotenoides en *Arabidopsis thaliana* y en zanahoria (Simpson et al., 2018). En *D. carota* se identificaron elementos de respuesta cis para hormonas en su promotor, dentro de los cuales se encontraban tres ABREs que respondían a ABA (Simpson et al., 2018). Luego de un estudio de alineación entre el transcriptoma de *D. carota* y la base de datos de factores de transcripción de plantas (PlantTFDB) seleccionando secuencias homologas para la subfamilia de factores de transcripción AREB/ABF, se

obtuvieron tres factores nombrados *DcAREB1*, *DcAREB3* y *DcAREB4*. Todos ellos mostraron localización nuclear y unión directa al promotor *DcPSY2*, además de la transactivación de genes reporteros en sistemas monohíbridos de levadura (Simpson et al., 2018). Sumado a esto, resultados de análisis de expresión indicaron que *DcAREB3* y *DcPSY2* son inducidos en respuesta a ABA y NaCl en órganos vegetativos (Simpson et al., 2018).

A partir de estos datos, actualmente se busca dilucidar el rol de *AREB3* en conferir tolerancia a estrés abiótico, para lo cual se transformaron *Arabidopsis thaliana* y *Actinidia deliciosa* con el vector pK7RWG2-*AREB3* y se utilizó la estrategia detallada a continuación.

1.4 Estrategia a utilizar

En este trabajo se utilizaron plantas de *A. deliciosa* previamente transformadas con el vector pK7RWG2-*AREB3* (Figura 5), para la expresión de *DcAREB3* bajo el promotor constitutivo y fuerte 35ScaMV quedando el factor de transcripción fusionado a RFP (Simpson, 2015).

A partir de las transformantes para *DcAREB3*, se obtuvieron líneas transgénicas, las cuales se comprobaron mediante análisis molecular. Luego, estas líneas fueron utilizadas para determinar el nivel de expresión relativa y un ensayo de salinidad para determinar si se genera un aumento en la tolerancia a estrés en las líneas transgénicas *DcAREB3*.

1.5 Objetivo general

Seleccionar líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa* que expresan el gen *DcAREB3* y determinar la tolerancia a estrés salino.

1.6 Objetivos específicos

- ✓ Seleccionar molecularmente líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa*.
- ✓ Determinar el nivel de expresión relativo del gen *DcAREB3* en las líneas transgénicas de *A. deliciosa*.
- ✓ Determinar la tolerancia a estrés salino en las líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa* para el gen *DcAREB3*.

MATERIALES Y METODOS

2.1 Cultivo *in vitro* de *Actinidia deliciosa*

Al inicio de este seminario de título se contaba con material *in vitro* de *Actinidia deliciosa* silvestre (WT) y transformada con el gen *DcAREB3* (vector pK7RWG2-AREB3, Figura 5) en distintas etapas del desarrollo. A estas se le suman plantas vector sin inserto, con el vector pK7RWG2 vacío. Se mantuvo el cultivo *in vitro* de kiwi durante la realización de este seminario de título, principalmente durante la etapa de elongación de brotes en medio III de selección, en donde se utilizó medio MS (Murashige & Skoog) 0,5X con 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 7g/L de agar y con pH ajustado a 5,8 suplementado con 1 mL/L de PPM, 0,5 mg/L de BAP, 300 mg/L de timentin y 100 mg/L de kanamicina como agente de selección. Los explantes fueron refrescados cada 4 semanas hasta la inducción de brotes y su elongación. Al cabo de aproximadamente 4 meses se contó con suficientes brotes transformantes para ser analizados molecularmente. A partir de esto se obtuvieron siete líneas transformantes.

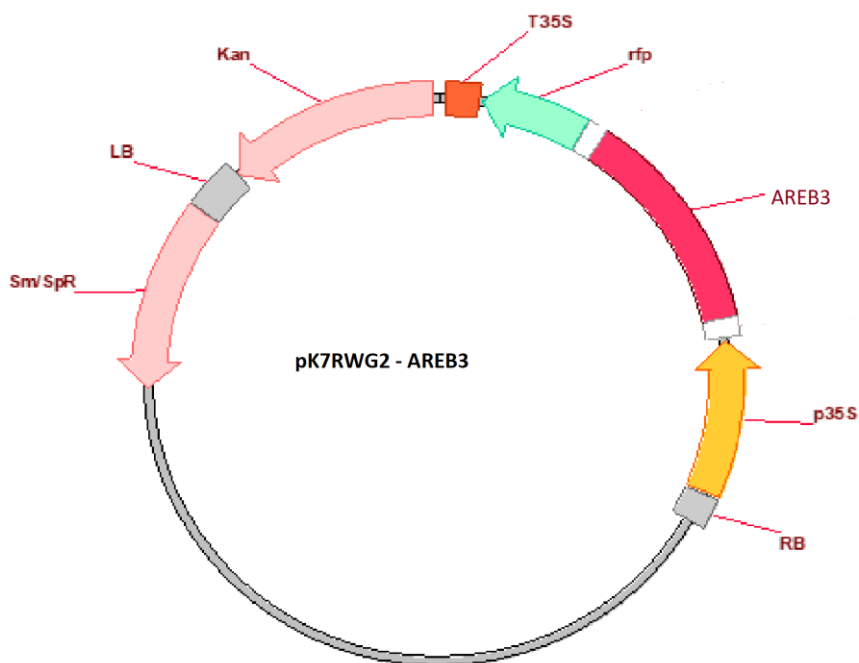


Figura 5. Vector de transformación pK7RWG2.

Vector utilizado para transformar *A. deliciosa*, el cual genera proteínas de fusión entre los factores de transcripción de interés y RFP (Modificado de Simpson, 2015). Originalmente llamado pK7RWG2 – ABRE3, en esta figura se cambió el nombre a pK7RWG2 – AREB3 para aclarar que el vector contiene la secuencia del factor de transcripción *AREB3* de *Daucus carota* y no la secuencia de su sitio de unión en este organismo.

Además, se realizó la propagación de líneas en caso de ser necesario, para lo cual se cortaron explantes de hojas de *A. deliciosa* de aproximadamente 1 cm², los cuales se dejaron en placas Petri con medio I con MS 0,5X con 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 7 g/L de agar con pH ajustado a 5,8 suplementado con 25 mg/L de kanamicina como agente de selección, 2 mg/L de 2,4-D para la inducción de callos, y BAP 0,5 mg/L. En el caso de los callos inducidos, estos fueron transferidos a medio fresco con 0,5X medio MS, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 7 g/L de agar

con pH ajustado a 5,8 suplementado con 5 mg/L de BAP y 40 mg/L de kanamicina como agente de selección (Quiroz, 2014).

Todo el cultivo *in vitro* se realizó bajo condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar. Todos los medios fueron autoclavados durante 40 minutos luego de ajustar el pH y los cultivos fueron mantenidos con un fotoperiodo de 16 horas a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.2 Extracción de ADN a partir de tejido vegetal

La extracción de ADN genómico de *Actinidia deliciosa* se realizó utilizando el tampón de extracción CTAB 2X (2% p/v CTAB, 100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1% p/v PVP 40, 1,4 M NaCl). Para esto se comenzó con 100 mg de tejido, que corresponde aproximadamente a 2 hojas pequeñas de kiwi, las cuales fueron congeladas con nitrógeno líquido antes de ser molidas en morteros, previamente esterilizados y enfriados, en presencia de nitrógeno líquido. Una vez que el tejido fue molido finamente, se agregaron 400 μL del reactivo CTAB 2X, se homogenizó la mezcla y fue traspasada a un tubo Eppendorf. Ésta fue brevemente agitada en vórtex para luego ser incubada a 37°C por al menos 30 minutos. Luego, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos, después de lo cual se agregaron 400 μL de cloroformo y se mezcló en vórtex por 15 segundos para homogenizar por completo. La mezcla fue centrifugada durante 5 minutos a 12500 rpm a temperatura ambiente y, cuidadosamente, se transfirieron aproximadamente 300 μL de la fase superior acuosa a un nuevo tubo Eppendorf. Luego se agregaron 400 μL de cloroformo y se homogenizó la mezcla en vórtex, para luego ser centrifugada nuevamente durante 5 minutos a 12500 rpm. Nuevamente, se transfirió la fase acuosa superior a otro tubo Eppendorf, y luego se agregó 400 μL de isopropanol y, luego de mezclar bien, se dejó incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos

para precipitar el ADN. Al finalizar la incubación, se centrifugó durante 30 minutos a 12500 rpm a 4°C, luego se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 µL de etanol 70% (en agua libre de nucleasas) para lavar el precipitado. Se centrifugó a 12500 rpm a 4°C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante nuevamente. El pellet obtenido se secó dejando los tubos abiertos e invertidos sobre papel limpio por al menos 30 minutos. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 200 µL de agua libre de nucleasas.

2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar la integridad del ADN o ARN se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,5-2%, los cuales fueron preparados en TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM a pH 8). Se cargaron las muestras en los pocillos de los geles, junto con 1 µL de buffer de carga y 5 µL de Ladder GeneRuler (ThermoFisher) para determinar el tamaño de las bandas. La electroforesis se realizó a 90 volts durante aproximadamente una hora para el ADN y a 70 volts durante 20 minutos en el caso del ARN. Finalmente, los geles fueron incubados en una solución de bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador (SYNGENE).

2.4 Extracción de ARN a partir de tejido vegetal

Se molió en un mortero, previamente esterilizado, entre 100 y 200 mg de hojas de kiwi con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, al cual se le agregó 1 mL de reactivo CTAB 2X y se homogenizó la mezcla, la cual luego fue traspasada a un tubo Eppendorf de 2 mL. Los tubos se mantuvieron en hielo durante el resto del protocolo a menos que se indique lo contrario. Luego, se agregó 2% de β-mercaptoetanol (20 µL) al tubo y se homogenizó la muestra en vórtex, para luego ser llevado a un baño caliente a 65°C por 15 minutos, agitando por inversión al menos 4 veces cada 5

minutos. Finalizada la incubación, se agregó 1 mL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 frío y se agitó en vórtex hasta obtener una emulsión completa. Se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C y luego se recuperó la fase acuosa superior a un nuevo tubo Eppendorf de 2 mL. A esto se le agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 frío y nuevamente se homogenizó en vórtex y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego, se recuperó cuidadosamente la fase superior en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se agregó $\frac{1}{4}$ del volumen del sobrenadante en LiCl 10 M, se agitó 6 veces por inversión y se dejó precipitando el ARN a 4°C durante la noche.

Posteriormente, se centrifugó la muestra a 12000 g durante 20 minutos a 4°C, luego se eliminó el sobrenadante por inversión y se agregó 1 mL de etanol 70% DEPC frío para lavar el precipitado. Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado. Luego, se eliminó el etanol 70% DEPC por inversión y se dejaron secar los tubos abiertos e invertidos sobre papel limpio. Finalmente, se resuspendió el pellet en 25 μ L de agua libre de nucleasas.

La concentración y la pureza (mediante las razones 260/280 y 260/230) de ARN extraído se determinó en un espectrofotómetro Epoch 2 y la integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.3).

2.5 Reacción en cadena de polimerasa PCR: PCR convencional

Para amplificar fragmentos de ADN a partir de distintas muestras se utilizó la mezcla SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara Bio Inc., USA), la cual incluye la enzima de PCR, buffer optimizado y mezcla de dNTP. En este caso, por cada reacción de PCR se utilizaron 10 μ L de SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara Bio Inc., USA), 0,5 μ L de partidor forward (DcABRE3 F), 0,5 μ L de partidor reverse (DcABRE3 R), 8 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de templado, en un volumen total de 20 μ L por reacción.

Cada vez que se realizó un PCR se utilizó un control negativo al cual no se le agregó templado. De ser necesario se agregó un control positivo, el cual corresponde a una muestra de ADN previamente verificada. Los programas utilizados (Tabla 1) en cada experimento varían dependiendo del tiempo de extensión requerido y de la temperatura de disociación de los partidores utilizados (Tabla 2). Finalmente, los productos del PCR se visualizaron en un gel de agarosa mediante electroforesis.

Tabla 1. Programas para PCR convencional.

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Número de ciclos |
|----------------------|------------------|------------|------------------|
| Denaturación inicial | 98 | 2 minutos | 1 |
| Denaturación | 94 | 5 segundos | 34 |
| Hibridación | Tm | 5 segundos | |
| Extensión | 72 | 10 seg/kb | |
| Extensión final | 72 | 1 minuto | 1 |

Tabla 2. Partidores utilizados en este Seminario de Título.

En el caso de los partidores qABRE3, a partir de este momento se les llamará qAREB3 para evitar confusiones sobre su relación al factor de transcripción estudiado, ya que los partidores se unen a la secuencia de éste y no a la secuencia de su sitio de unión.

| Partidor | Secuencia | Tm | Tamaño aproximado amplicón (pb) | Uso |
|-----------|---|--------|---------------------------------|------------------|
| DcABRE3 F | 5'- GGC TTG TCT GGA TCA GGA TCA GGA TCA GC -3' | 59,7°C | 1300 | PCR convencional |
| DcABRE3 R | 5'- CCA AGG TCC GGT CAG GGT CC -3' | 62,5°C | 1300 | PCR convencional |
| qABRE3 F | 5'- GCC AGT TTA GCA CCT CGT GTT GC -3' | 60,9°C | 200 | qRTPCR |
| qABRE3 R | 5'- CGC CTT CTC TCC ACC ACT TTC TC -3' | 59,5°C | 200 | qRTPCR |
| q18S F | 5'- CTG TGA AAC TGC GAA TGG CTC -3' | 56,7°C | 100 | qRTPCR |
| q18S R | 5'- TTC CAG AAG TCG GGG TTT GT -3' | 56,5°C | 100 | qRTPCR |
| qActina F | 5'- GCA GGA ATC CAT GAG ACT ACC -3' | 54,9°C | 100 | qRTPCR |
| qActina R | 5'- GTC TGC GAT ACC AGG GAA CAT -3' | 56,8°C | 100 | qRTPCR |

2.6 Síntesis de ADNc

Para sintetizar ADNc a partir de ARN extraído desde tejido vegetal se realizó una reacción de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima RT ImProm II (Promega, USA). En primer lugar, se eliminó el ADN genómico de la muestra mediante la enzima

DNasa I, para lo cual se preparó un mix de DNasa I que contenía 1 μL de enzima DNasa I, 2 μL de buffer para DNasa I y 1 μL de Ribolock, correspondiente a un inhibidor de ARNasa, sumando un total de 4 μL por reacción. A esto se le agregó el volumen correspondiente a 3 μg de ARN extraído y se llevó a un volumen total de 20 μL por reacción, para luego dejar el tratamiento con DNasa I a 37°C por 45 minutos. Al terminar el tiempo de incubación se detuvo la reacción agregando 1 μL de EDTA 50 mM e incubando durante 10 minutos a 65°C.

Para comenzar la síntesis de ADNc se preparó un mix RT-PCR con 4 μL de buffer RT 5X, 3 μL de MgCl 25 mM, 0,5 μL de Ribolock, 1 μL de dNTPs 10 mM y 1 μL de agua libre de nucleasas, sumando un total de 9,5 μL por reacción. A cada reacción se le agrega 1,5 μL de oligo AP 10 μM y 8 μL de ARN tratado con DNasa I, sumando un total de 19 μL por reacción. Esto se incubó en el termociclador a 70°C durante 5 minutos, para luego pasar rápidamente los tubos a hielo, incubar aproximadamente 3 minutos y luego agregar 1 μL de enzima RT ImProm II (Promega, USA), la cual no es termoestable, sumando un total de 20 μL por reacción. Luego de esto se continúa con el programa de la reacción en el termociclador, donde luego de la primera incubación le siguen 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 10 minutos a 70°C. Al terminar el programa, se obtuvo una concentración teórica de 60 ng/ μL de ADNc.

2.7 RT-PCR cuantitativo: qRTPCR

Se utilizó la técnica de qRTPCR para cuantificar la cantidad de transcrito presente en las líneas de *A. deliciosa* transgénicas. Para ello se utilizó el ADNc previamente generado a una concentración de 10 ng/ μL . Para llevar a cabo la reacción se utilizaron 6,5 μL de Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix (2-color tracking) (Biotium, USA), 0,2 μL de partidor forward, 0,2 μL de partidor reverse, 3,1 μL de agua libre de

nucleasas y 3 μ L de templado, sumando un total de 13 μ L por reacción. Los programas usados para llevar a cabo la reacción varían respecto a la temperatura de disociación de los partidores utilizados (**Tabla 3** y **Tabla 4**). Los partidores utilizados para genes housekeeping (control) corresponden al gen ARN ribosomal 18S y Actina, mientras que se evaluó la presencia del transcrito de interés con los partidores qAREB3 (Tabla 2).

Tabla 3. Programas utilizados para qRT-PCR 18S y actina.

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Número de ciclos |
|----------------------|------------------|-------------|------------------|
| Denaturación inicial | 95 | 10 minutos | 1 |
| Denaturación | 95 | 15 segundos | 40 |
| Hibridación | 55 | 15 segundos | |
| Extensión | 72 | 15 segundos | |
| Denaturación | 95 | 1 minuto | 1 |
| Hibridación final | 55 | 30 segundos | 1 |
| Denaturación final | 95 | 30 segundos | 1 |

Tabla 4. Programa utilizado para qRT-PCR AREB3.

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Número de ciclos |
|----------------------|------------------|-------------|------------------|
| Denaturación inicial | 95 | 10 minutos | 1 |
| Denaturación | 95 | 15 segundos | 50 |
| Hibridación | 60 | 15 segundos | |
| Extensión | 72 | 15 segundos | |
| Denaturación | 95 | 1 minuto | 1 |
| Hibridación final | 60 | 30 segundos | 1 |
| Denaturación final | 95 | 30 segundos | 1 |

En el caso de los partidores qAREB3 F y qAREB3 R se utilizó la herramienta Primer-BLAST de NCBI con los organismos *Daucus carota* y *Actinidia deliciosa* para verificar las posibles regiones de unión y el tamaño del amplicón esperado.

Finalmente, para analizar los datos obtenidos se utilizó la ecuación correspondiente al método matemático delta-delta para comparar la expresión relativa entre resultados (Pfaffl, 2001) y los datos fueron graficados en GraphPad.

2.8 Ensayo DAB

Se realizó un ensayo preliminar de DAB para medir de forma cualitativa y semicuantitativa la tolerancia a estrés medido como cantidad de peróxido de hidrógeno inducido por estrés salino en plantas transgénicas *DcAREB3* a tiempo 0, 24 horas y 48 horas. Para esto se comenzó cortando hojas de *Actinidia deliciosa* transgénica, además de plantas WT y vector sin inserto (VSI), y se preparó una solución de NaCl 200 mM para realizar el tratamiento. La solución se vertió en una placa Petri de vidrio y luego se agregaron entre una y tres hojas de cada grupo (7 líneas transgénicas, VSI y WT), se realizó un control del tratamiento con agua.

Luego de la incubación de 0, 24 y 48 horas en NaCl o agua como control, se tomaron las hojas y se sometieron a tinción con DAB. Para realizar la tinción, se comenzó preparando una solución DAB 1 mg/mL en una botella cubierta con papel aluminio. Se agregaron 300 mg de DAB y 270 mL de agua estéril y la solución fue llevada a pH 3 con HCl 0,1 M en agitación para disolver el DAB. Luego, se agregaron 150 µL de Tween 20, además de 15 mL de Na₂HPO₄ 200 mM, para obtener una solución 0,05% v/v Tween 20 y 10 mM de Na₂HPO₄. Las hojas fueron sumergidas en 25 mL aproximadamente de solución de tinción DAB en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio y se les aplicó vacío leve durante 5 minutos. Luego se dejó el vaso

incubando en agitación, asegurándose de que la solución cubriera por completo las hojas, durante 4 horas. Al terminar el tiempo, se pasaron las hojas a tubos falcon de 50 mL con solución de blanqueamiento (etanol:ácido acético:glicerol = 3:1:1) para eliminar la clorofila y se dejaron en un baño caliente a 85°C durante 20 minutos. Luego se cambió la solución de blanqueamiento y se dejó reposando nuevamente por 30 minutos (Daudi & O'Brien, 2012) hasta que las hojas hayan eliminado toda la clorofila. Finalmente, se observaron y se fotografiaron las hojas. La tinción DAB fue cuantificada utilizando el programa ImageJ.

2.9 Análisis de imágenes en ImageJ

El programa ImageJ permite cuantificar los píxeles dentro de un área de la imagen. Para obtener una lectura más clara de los píxeles se aplicó un filtro (Royal invertido) luego de transformar la imagen a 8-bit rgb, que permitió delimitar el borde de la hoja para obtener el área total de la hoja en píxeles y luego poder definir un rango de color para delimitar el área mayormente oxidada.

Luego se modificó el umbral de color, que en formato 8-bit rgb muestra un rango máximo de 256 colores, cuantificado en píxeles en primer lugar para delimitar el área total de la hoja y luego se usó un rango de color desde el 0 al 75 para definir el área mayormente oxidada. De esta forma se obtuvo el área en píxeles en cada caso, lo que permitió calcular un porcentaje de área mayormente oxidada en cada hoja y de esta forma hacer en análisis semicuantitativo.

Esto se realizó para tres hojas por condición en dos ensayos (repetición) con plantas silvestres, en donde una de ellas tuvo cuatro hojas en la condición de 48 horas en agua. En el caso del ensayo con plantas VSI se usaron tres hojas a las 0 horas y dos hojas para las 24 y 48 horas con solución salina cada una. En el caso de las plantas

transformadas con DcAREB3 se usaron tres hojas para las 0 horas, una hoja para las 24 horas en agua, tres hojas para las 24 horas en solución salina, una hoja para las 48 horas en agua y tres hojas para las 48 horas en solución salina. Luego, se promediaron los valores obtenidos en caso de haber más de una hoja por ensayo y finalmente se calculó el porcentaje correspondiente al área mayormente oxidada a partir del área total de la hoja.

En el caso de las plantas silvestres se sacó un promedio de área entre ambas para realizar el análisis. De esta forma, se promediaron las áreas de las hojas en cada caso, área total y mayormente oxidada, y luego se calculó el porcentaje correspondiente al área mayormente oxidada del área total de la hoja. Esto se realizó para los controles en agua y los ensayos en solución salina con 200 mM NaCl.

RESULTADOS

3.1 Selección de líneas transgénicas para el factor de transcripción *DcAREB3* de *Actinidia deliciosa*

Para comenzar con los experimentos se determinaron las líneas de *Actinidia deliciosa* que poseían el gen de interés *DcAREB3* mediante PCR de ADN genómico extraído a partir de hojas de plántulas de 2 y 4 meses en cultivo in vitro (Figura 6A), tal como se describió en Materiales y Métodos (secciones 2.2 y 2.3). El PCR mostró que todas las líneas, exceptuando la línea 3, presentaron la amplificación de una banda de aproximadamente 1300 pb correspondiente al gen *DcAREB3*, confirmando que 6 de las 7 plantas son transgénicas para el gen *DcAREB3* (Figura 6B). A pesar de esto, se siguieron utilizando todas las líneas para los análisis posteriores.

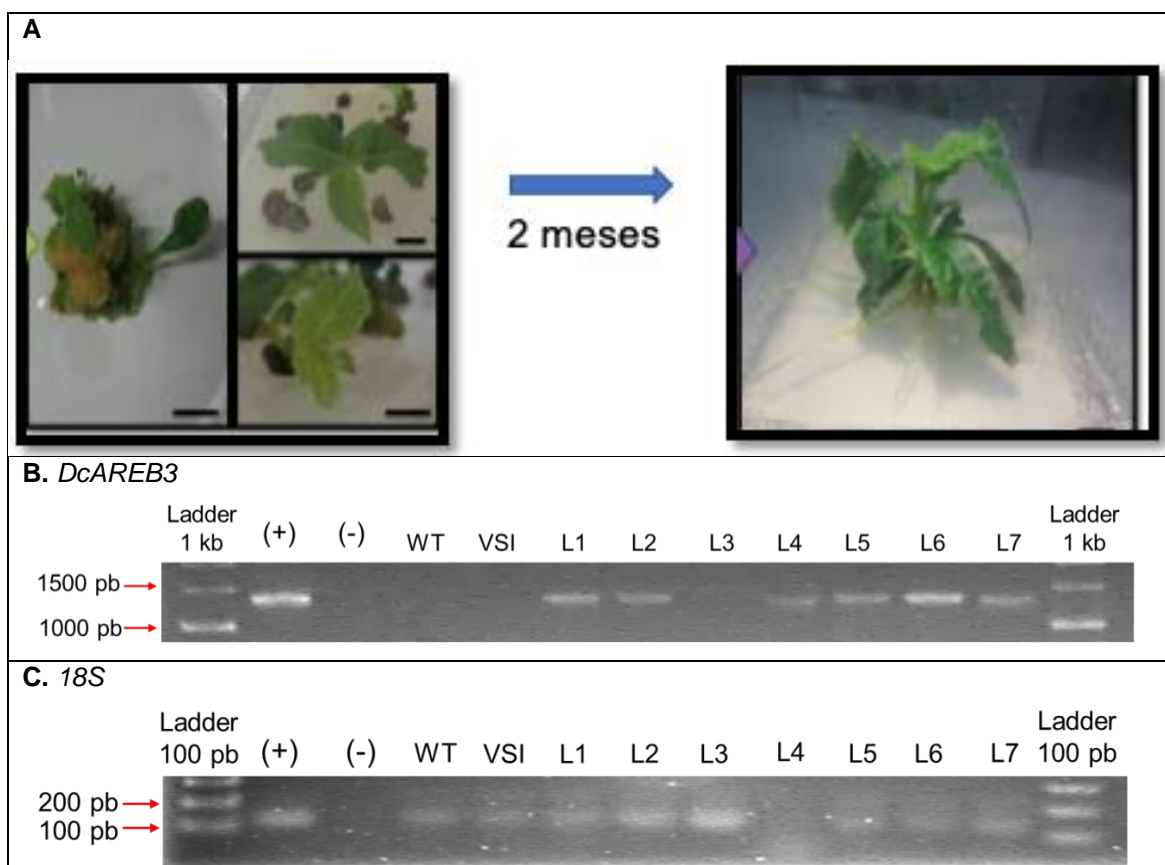


Figura 6. Fenotipo de plántulas transformantes y PCR convencional a partir de ADN genómico de *Actinidia deliciosa* para determinar y seleccionar las líneas transgénicas.

A) Se muestran plántulas transformantes de kiwi *in vitro* en etapa II a los dos meses post transformación y el fenotipo en etapa III a los cuatro meses post transformación. Se seleccionaron hojas de plántulas de ambos estadios para el análisis molecular. B) Resultados obtenidos del PCR para el transgén *DcAREB3* (aproximadamente 1400 pb). Se observa que en el caso de L3 no se obtuvo amplificado del gen *DcAREB3*. C) PCR obtenido para el gen *18S* (aproximadamente 100 pb), utilizado como control. En este caso no se observó amplificado en L4. (+): control positivo, línea previamente comprobada con vector pK7RWG2-ABRE3; (-): control negativo, reacción sin ADN; WT: wild type, línea silvestre; VSI: línea transformada con vector pK7RWG2 sin inserto; L1-L7: línea numerada.

En el caso del PCR obtenido para el gen *18S* se observó la banda esperada en todas las plantas, incluidas la planta silvestre (WT) y la vector sin inserto (VSI), excepto la línea 4, lo que pudo ser resultado de contaminación presente en la reacción más que una mala extracción de ADN genómico, ya que en el PCR para el transgén si se

observó una banda a pesar de ser tenue (Figura 6B). Se destaca además que los partidores usados son específicos; no hibridan en otro gen endógeno de kiwi ya que no se aprecia la amplificación de una banda en la planta silvestre (WT) ni en la vector sin inserto (VSI).

3.2 Determinación de los niveles de expresión del transgén

Se mantuvo el cultivo *in vitro* de las líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa* hasta que presentaran suficiente tejido vegetal para realizar los análisis posteriores (Figura 6A).

3.2.1 Extracción de ARN y determinación de su pureza e integridad.

Luego de extraer ARN de hojas de plantas transgénicas (sección 2.4), se obtuvo el ARN en triplicado para las líneas L1 a L4 y en duplicado para las líneas L5 a L7 de acuerdo con la disponibilidad de material vegetal para cada línea transgénica. Se obtuvo un ARN íntegro ya que se observaron las bandas y perfil correspondientes de los ARN ribosomales (Figura 7).

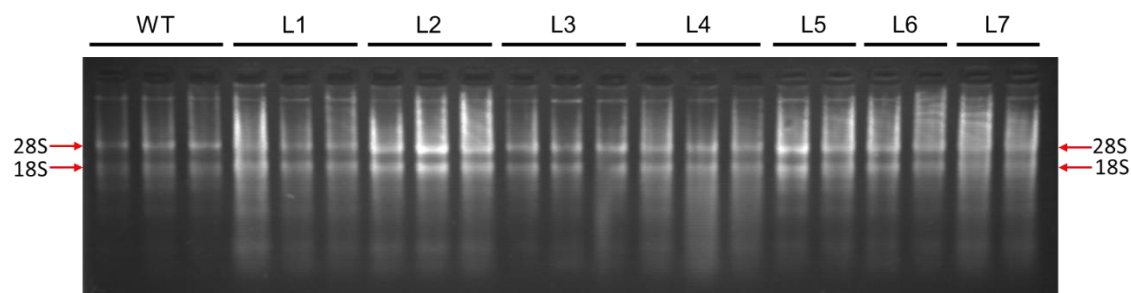


Figura 7. Extracción de ARN de líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa*.

Análisis de integridad del ARN extraído a partir de hojas de *Actinidia deliciosa* mediante electroforesis en gel. WT: línea silvestre o wild type; L1-L7: líneas transgénicas de kiwi con el gen *DcAREB3*. Se aprecian las bandas representativas de ARN ribosomal 28S y 18S. El ARN de la línea VSI también se obtuvo en buena calidad, pero no se muestra.

También se verificaron las razones 260/280 y 260/230 del ARN en un espectrofotómetro Epoch 2, donde se observó que el ARN extraído era puro y de una calidad que permitió ser usado para los ensayos de qRT-PCR (Tabla 5).

Tabla 5. Datos obtenidos de espectrofotómetro Epoch2.

Se señalan triplicados o duplicados en cada caso luego de la puntuación en la tabla, es decir, WT.2 corresponde al duplicado y WT.3 al triplicado y así sucesivamente para el resto de las muestras. WT: línea sin modificar o wild type; L: línea numerada. El ARN de la línea VSI también se obtuvo en buena calidad, pero no se muestra.

| Muestra | Absorbancia 260/280 | Absorbancia 260/230 | Concentración (ng/uL) |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| WT.1 | 2,201 | 2,33 | 353 |
| WT.2 | 2,308 | 2,398 | 398 |
| WT.3 | 2,284 | 2,248 | 276 |
| L1.1 | 2,203 | 2,357 | 755 |
| L1.2 | 2,281 | 2,369 | 603 |
| L1.3 | 2,262 | 2,409 | 605 |
| L2.1 | 2,228 | 2,355 | 1112 |
| L2.2 | 2,251 | 2,394 | 1042 |
| L2.3 | 2,217 | 2,389 | 1045 |
| L3.1 | 2,212 | 2,377 | 412 |
| L3.2 | 2,197 | 2,433 | 415 |
| L3.3 | 2,24 | 2,324 | 383 |
| L4.1 | 2,249 | 2,288 | 648 |
| L4.2 | 2,264 | 2,387 | 634 |
| L4.3 | 2,262 | 2,396 | 613 |
| L5.1 | 2,16 | 1,916 | 366 |
| L5.2 | 2,25 | 2,446 | 831 |
| L6.1 | 2,306 | 2,302 | 767 |
| L6.2 | 2,254 | 2,437 | 725 |
| L7.1 | 2,209 | 2,243 | 953 |
| L7.2 | 2,276 | 2,452 | 1230 |

La concentración obtenida de ARN en las muestras fue baja, pero éstas presentaban un buen grado de pureza en el caso del índice 260/280 (indicativo de presencia de proteínas), con razones entre 1,8 y 2,3. En el caso de índice 260/230, indicativo de

contaminación con azúcares y fenoles, en varios casos se obtuvieron razones mayores a 2,3, por lo cual fueron considerados para la síntesis de ADNc (sección 2.6).

3.2.2 Verificación de partidores *in silico*

Se verificaron los partidores de qPCR para el transgén *DcAREB3* mediante un Primer-BLAST (sección 2.7) y luego mediante una reacción de PCR convencional. En el caso del Primer-BLAST, se usaron las secuencias forward (F) y reverse (R) del partidor qAREB3 para buscar secuencias de unión en *Daucus carota* y en *Actinidia deliciosa*. En zanahoria se predijeron tres secuencias de unión, correspondientes ARN mensajero de tres variantes de transcripción para Abscisic Acid-Insensitive 5-like protein 7 o ABI5-like protein 7 (LOC108225746), correspondiente a AREB3, los que se encontraban dentro de la región codificante y que en todos los casos amplificarían un fragmento de 179 pb. En kiwi no se encontraron sitios de unión a templado.

Products on target templates

>[XM_017400688.1](#) PREDICTED: *Daucus carota* subsp. *sativus* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 7 (LOC108225746), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 179
Forward primer 1  GCCAGTTTAGCACCTCGTGTTC 23
Template       1103  .....T..... 1125

Reverse primer 1  CGCCTTCTCTCCACCACTTTCTC 23
Template       1281  ..... 1259
```

>[XM_017400687.1](#) PREDICTED: *Daucus carota* subsp. *sativus* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 7 (LOC108225746), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 179
Forward primer 1  GCCAGTTTAGCACCTCGTGTTC 23
Template       1098  .....T..... 1120

Reverse primer 1  CGCCTTCTCTCCACCACTTTCTC 23
Template       1276  ..... 1254
```

>[XM_017400685.1](#) PREDICTED: *Daucus carota* subsp. *sativus* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 7 (LOC108225746), transcript variant X1, mRNA

```
product length = 179
Forward primer 1  GCCAGTTTAGCACCTCGTGTTC 23
Template       1274  .....T..... 1296

Reverse primer 1  CGCCTTCTCTCCACCACTTTCTC 23
Template       1452  ..... 1430
```

Figura 8. Primer-BLAST de *Daucus carota* con partidores qAREB3.

Se predijeron tres variantes de transcripción de Abscisic Acid-Insensitive 5-like protein 7 o ABI5-like protein 7 (*DcAREB3*). Se señala el número de acceso subrayado en morado, el largo del producto y el lugar de unión al templado.

3.2.3 Verificación de partidores *in vitro*

Además, se realizó un RT-PCR convencional para verificar que los partidores qAREB3 hibridaran en ADNc de *D. carota* y no en *A. deliciosa* (Figura 9). En el caso del ADNc de zanahoria se observa una banda de aproximadamente 200 pb para ambas muestras. En el caso del kiwi no se observan bandas, demostrando que las plantas transgénicas VSI y otra línea transgénica control, que expresa el gen Alfin4 de tolerancia a estrés abiótico, no presentan el gen AREB de *D. carota*.

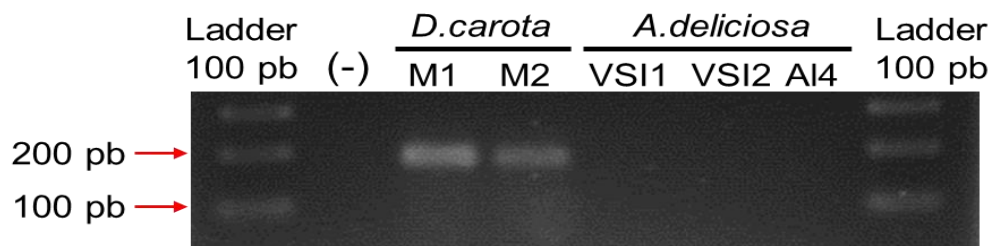


Figura 9. Verificación de la especificidad de partidores para amplificar el gen *DcAREB3*.

Amplificación por RT-PCR de un fragmento de 179 pb usando partidores diseñados para *DcAREB3* y ADNc de *D. carota* y *A. deliciosa*. (-): control negativo, reacción sin material genético; M1 y M2: dos réplicas de ADNc de *D. carota*; VSI: línea transgénica VSI de kiwi; AI4: línea transgénica de kiwi transformada con el gen Alfin4.

Con estos resultados se confirma que los partidores no poseen sitios de unión inespecíficos en *Actinidia deliciosa*, y que solo se unen en el gen de *Daucus carota*, por lo cual se pueden utilizar para determinar la expresión del transgén *DcAREB3* en líneas transgénicas de kiwi.

Luego, se realizó un RT-PCR convencional con los partidores q18S, qActina y qAREB3 (Figura 9; Tabla 2) determinando que todas las líneas transgénicas presentaban el

amplicón de tamaño esperado en cada caso (Figura 10), lo que aseguraba su utilización para un qRT-PCR.

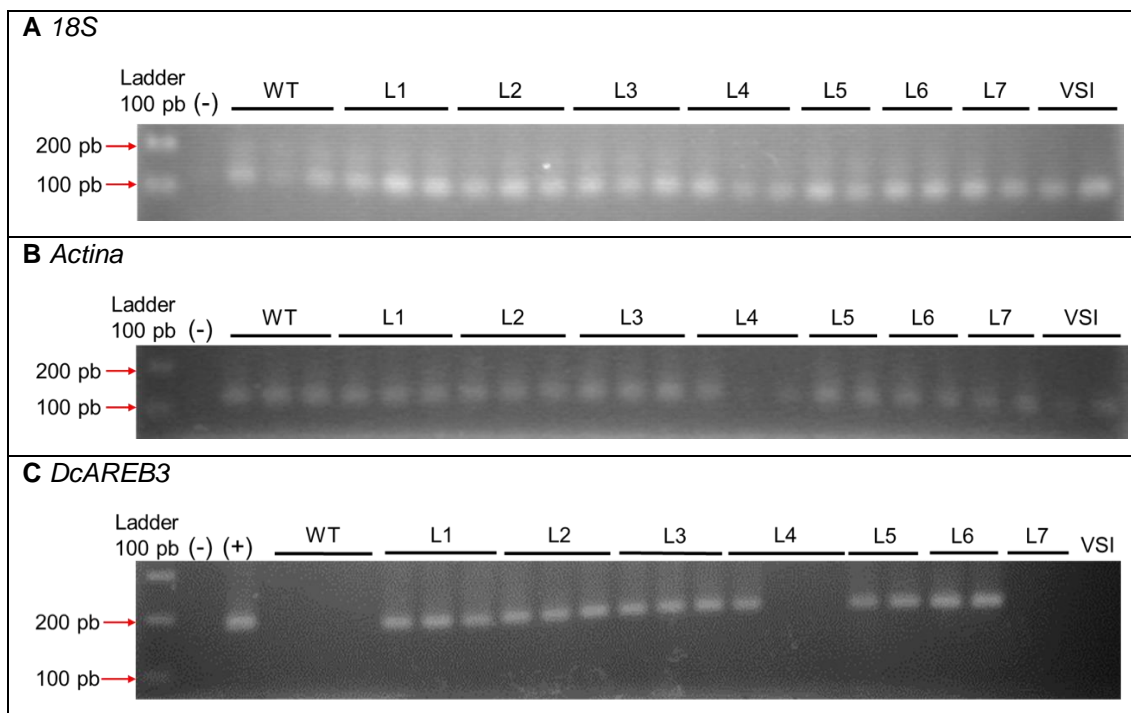


Figura 10. Presencia de transcrito *DcAREB3* en líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa* mediante RT-PCR convencional.

RT-PCR convencional con partidores de qRT-PCR para el gen A) ARN ribosomal 18S, B) Actina y para C) el transgén *DcAREB3*. En los tres casos debió incluirse un segundo pocillo con ladder al extremo final para asegurar el tamaño de las bandas. Aun así, podemos asegurar el tamaño de las bandas dado que los partidores utilizados son específicos. (-): control negativo sin material genético; (+): control positivo, ADN genómico de una muestra previamente comprobada como transgénica; WT: línea silvestre o wild type; VSI: línea transformada con vector pK7RWG2 sin inserto; L1-L7: líneas transgénicas de kiwi con el gen *DcAREB3*.

Se observó que en el caso de las reacciones con los partidores q18S, éstos generaron producto de amplificación de aproximadamente 100 pb en todas las muestras, lo que se condice con el uso de partidores para un gen de housekeeping e indica la óptima calidad de los ADNc. En el caso de los partidores para actina, un gen de expresión constitutiva, al igual que el ARN ribosomal 18S, se observaron bandas en todas las

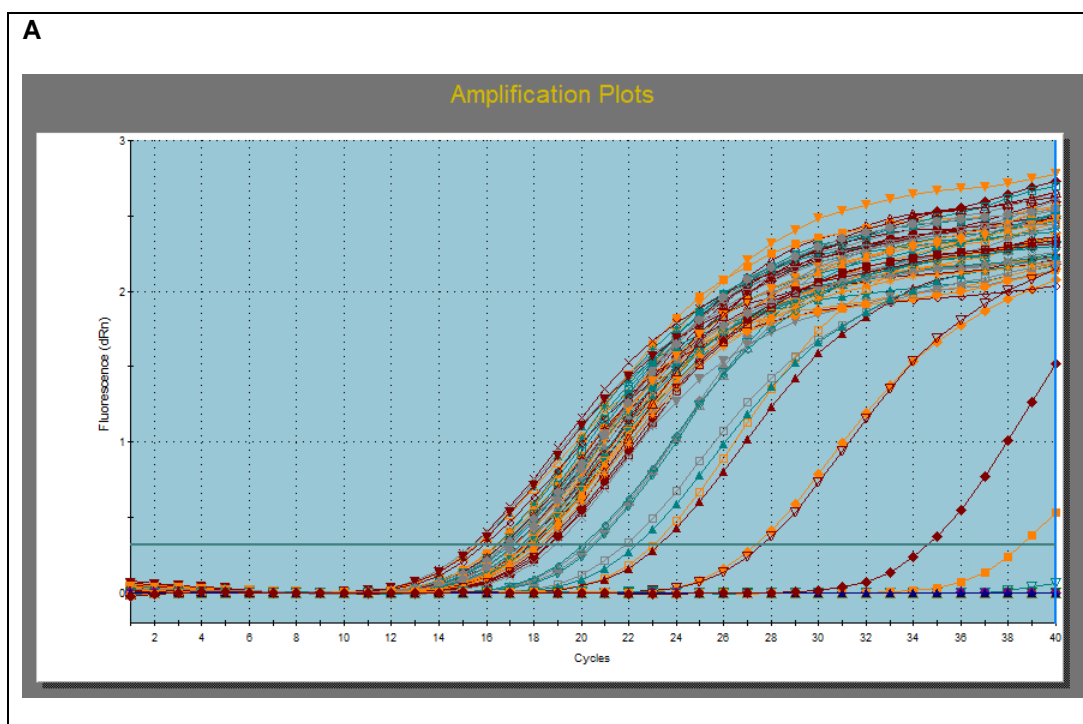
líneas, pero con bandas muy tenues en dos de las repeticiones de la línea 4 y en el VSI. Para los partidores qAREB3 no se observaron bandas en la línea WT ni en el VSI ya que éstos no poseen el transgén de interés. Para las líneas restantes se observaron bandas bien definidas, excepto en las dos repeticiones de la línea 4, que tampoco amplificó para actina, y en la línea 7. En el caso de la línea 4 puede deberse a un error en la reacción o una baja abundancia de templado, teniendo en cuenta que esta línea sí presentó el transgén al momento de realizar el PCR (Figura 6). También hay que destacar que la línea 3 si presentó transcrito del gen *DcAREB3* (Figura 10C) cuando no había presentado inserto en el PCR (Figura 6B), lo que puede indicar un posible error durante la primera reacción de PCR. Por otro lado, en la línea 7 esto puede haber ocurrido porque el gen no se expresa, sobre todo si se compara con las amplificaciones con 18S y actina (Figura 10A y B). Por ello, para tener un resultado más preciso se realizó un qRT-PCR.

3.2.3 qRT-PCR de plantas transgénicas de *Actinidia deliciosa*

Luego de verificar que los partidores funcionaran correctamente se procedió a realizar la cuantificación de transcrito para el gen de interés mediante un RT-PCR cuantitativo (sección 2.7). A partir de esto se obtuvieron gráficos de amplificación, donde se pudo observar el número de ciclos a partir del cual se amplifica la muestra al superar el umbral de ciclos, y curvas de disociación, donde se pueden identificar los fragmentos de ADNc amplificados. De esta forma, en un gráfico de amplificación se espera que las curvas se encuentren agrupadas y en una curva de disociación se espera que se encuentre solo un pico, el cual es específico para el fragmento de ADN de interés.

En el caso del gen 18S se obtuvo un gráfico de amplificación (Figura 11A) donde la mayoría de las curvas se encuentran agrupadas, comenzando entre los ciclos 16 y 24.

Las curvas que comienzan a partir del ciclo 28 corresponden a repeticiones de la muestra correspondiente a la línea 4, mostrando la baja abundancia de ADNc en esta línea. El resto de las curvas corresponden a controles negativos. En el caso de las curvas de disociación (Figura 11B) se obtuvo solo un pico, lo que correspondería solo a un fragmento dentro de las muestras. Cabe hacer notar que para cada línea se consideraron tres mediciones (a menos que se señale lo contrario), que se presentan como tres líneas de colores en los gráficos.



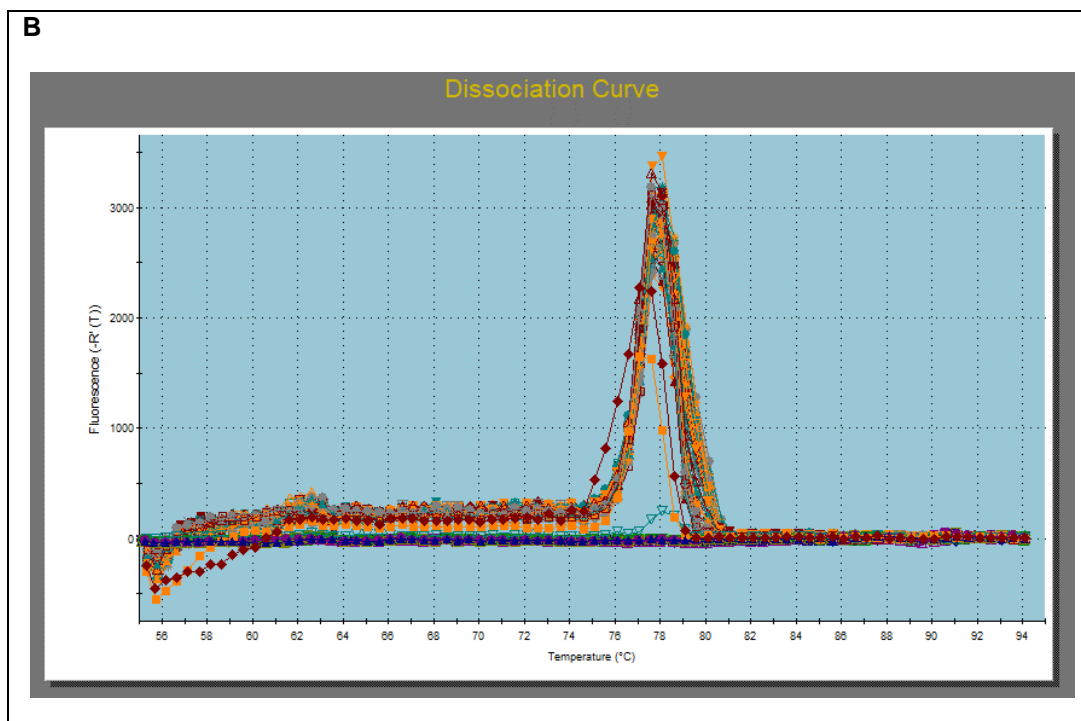


Figura 11. Perfil del qRT-PCR del gen 18S.

Se muestran en el panel A) Gráfico de amplificación del gen 18S obtenido con línea umbral y B) Curva de disociación para el gen 18S obtenidas del qRT-PCR.

En el caso del qRT-PCR para el gen de actina, cuyos resultados obtenidos se muestran en la Figura 12, en el panel A se muestra el gráfico de amplificación, donde la mayoría de las curvas se encuentran agrupadas entre los ciclos 22 y 28. Entre los ciclos 32 y 34 se encuentran amplificaciones correspondientes a VSI y la línea 4, a partir del ciclo 36 se amplifican muestras correspondientes a línea 4 y controles negativos. Esto permite concluir que la cantidad de ADNc de L4 es menor a la del resto de las líneas transgénicas. En el caso de la curva de disociación (Figura 12B) se obtuvo un pico principal antecedido por un “hombro” que se señala encerrado en rojo, lo que indica que podrían estar amplificándose más de un fragmento de ADN. Cabe hacer notar que para cada línea se consideraron tres mediciones, a menos que se señale lo contrario, que se presentan como tres líneas de colores en los gráficos.

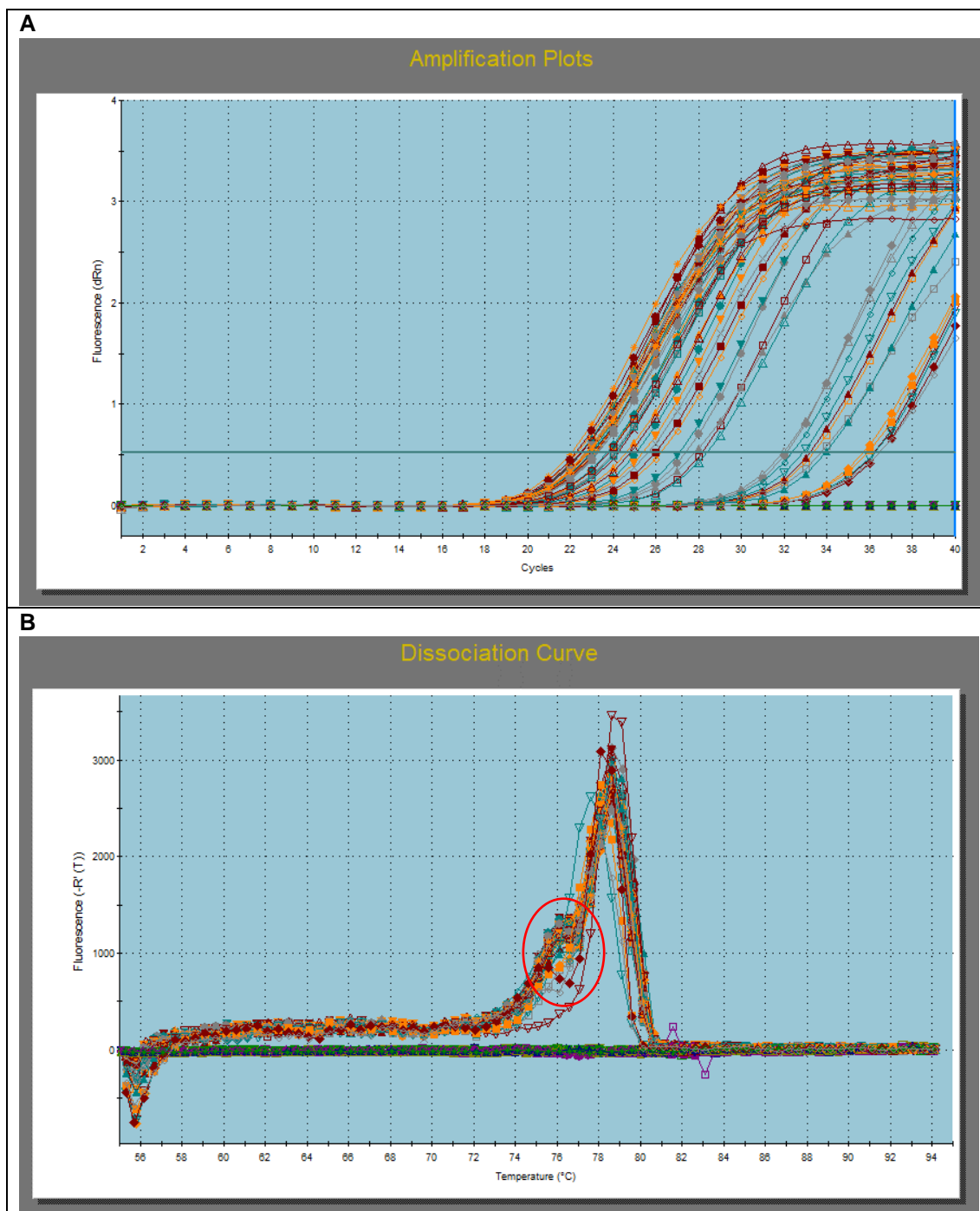


Figura 12. Perfil del qRT-PCR del gen Actina.

Se muestran en el panel A) Gráfico de amplificación obtenido para el gen Actina con línea umbral y en B) Curva de disociación obtenido para el gen Actina, encerrado en rojo se señala un “hombro” dentro de la curva.

Es por ello que, para los siguientes análisis del qRT-PCR, se utilizó como gen normalizador el gen 18S y no de actina para la cuantificación de expresión relativa.

Para el gen de interés DcAREB3 se obtuvieron los resultados observados en la Figura 13. En el panel del gráfico de amplificación (Figura 13A) no se obtuvieron curvas agrupadas como en los casos anteriores para 18S (Figura 11A) y actina (Figura 12A), lo que era de esperar dado que cada línea puede tener un nivel de abundancia de transcrito diferente, por lo que se decidió considerar amplificaciones ocurridas dentro de los ciclos 29 y 34 como aceptables, ya que la mayoría de las muestras correspondientes a líneas transgénicas presentaban un umbral de ciclo dentro de este rango. Las muestras que se escapan de este rango corresponden a WT y líneas 4 (que era esperable por el menor contenido de ADNc) y 7. En cuanto a la curva de disociación obtenida (Figura 13B) se obtuvo un pico principal en donde se agrupan la mayoría de las muestras y se señalan picos secundarios obtenidos en muestras correspondientes a WT encerrado en rojo, y a la línea 7 encerrado en negro. Esto indica que en estos casos hubo amplificación de fragmentos inespecíficos ocurridos a ciclos muy tardíos (Figura 13A, ver líneas de colores rojas, grises, celeste y anaranjado).

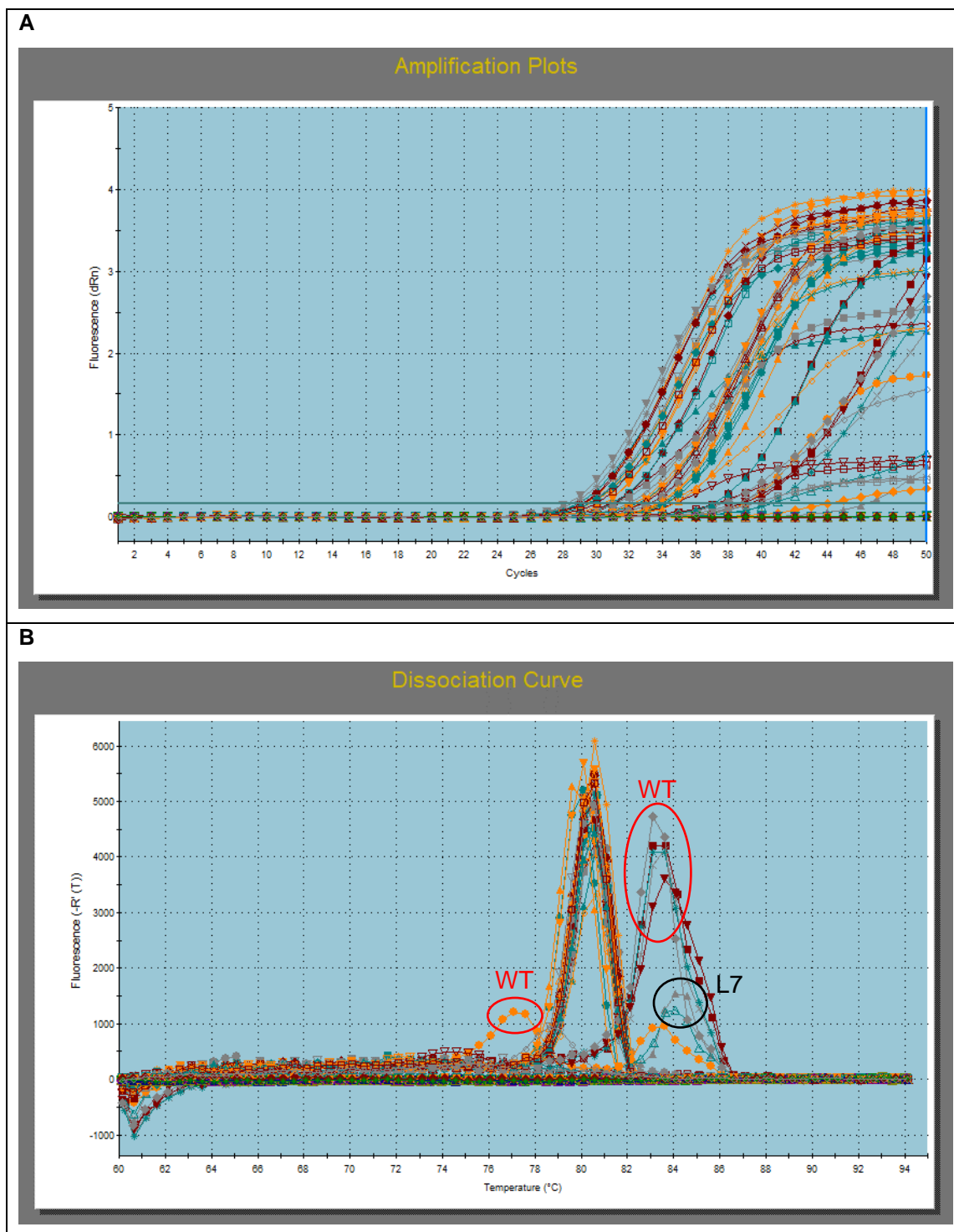


Figura 13. Perfil del qRT-PCR para el gen DcAREB3.

Se muestran en el panel A) Gráfico de amplificación obtenido para el gen DcAREB3 de interés con línea umbral y en B) Curva de disociación obtenida para el gen DcAREB3, se señala encerrado en rojo un pico correspondiente a muestras WT y encerrado en negro picos correspondientes a la línea 7.

3.2.4 Determinación de los niveles de transcritos del transgén DcAREB3

Con los datos obtenidos a partir del qRT-PCR se analizó la abundancia de transcritos relativa del gen DcAREB3 en las líneas transgénicas seleccionadas mediante el método delta-delta (Pfaffl, 2001).

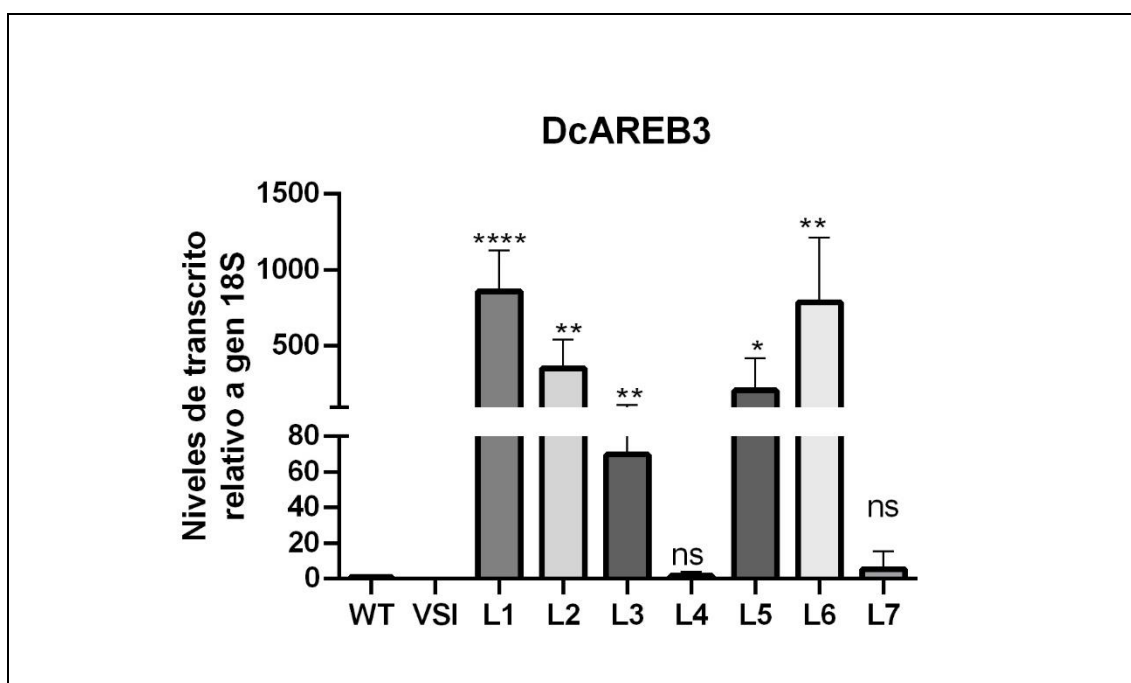


Figura 14. Niveles de transcritos relativo a 18S de DcAREB3 en líneas transgénicas de *A. deliciosa*.

Niveles de expresión de transcritos *DcAREB3* en las hojas de 7 líneas transgénicas de *A. deliciosa* a partir de ADNc. Se utilizó el gen 18S como normalizador, mientras que como calibrador se usaron los datos de las plantas silvestres (WT). WT: niveles de expresión en plantas silvestres; VSI: línea transformada con vector pK7RWG2 sin inserto; L1-L7: líneas transgénicas de kiwi con el gen *DcAREB3*. Se contó con triplicados biológicos y duplicados técnicos en todas las líneas, excepto en líneas L5, L6 y L7, donde se contó con duplicados biológicos y triplicado técnico. Las columnas y barras representan el promedio y la desviación estándar respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y la línea silvestre, y fueron determinadas mediante Test de Student (T test) no pareado de dos colas. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

En el gráfico (Figura 14), se destaca que, de las 7 plantas analizadas, 5 presentan una significativa abundancia de transcrito, destacándose la línea 1 y 6 con la más alta abundancia de transcrito del gen. Las líneas 4 y 7 no mostraron una diferencia significativa de abundancia de transcrito al compararlas con la línea silvestre. Para la línea 4 puede deberse a la baja cantidad de ADNc dado que para 18S y actina la línea 4 mostró menos abundancia de transcrito, por lo que se concluye que en este caso es necesario repetir el ensayo con más ADNc. En el caso de la línea 7, ésta no presenta expresión del gen. Ya que se trata de la expresión de un transgén de zanahoria en kiwi, la expresión se evalúa respecto de una línea silvestre que no posee el gen, y ello genera que se observen altos promedios de expresión relativas en las líneas analizadas.

3.3 Ensayo semicuantitativo de nivel de peróxido de hidrógeno en hojas de *Actinidia deliciosa*

Luego de determinar los niveles relativos de transcrito de *DcAREB3* en las distintas líneas transgénicas de *A. deliciosa*, se realizó un ensayo DAB (sección 2.8) para determinar de forma semicuantitativa cómo se comportaban estas líneas frente a estrés. En este caso, se realizó un ensayo preliminar de estrés salino tratando hojas de kiwi con 200 mM de NaCl por 0, 24 y 48 horas. Se espera que plantas más susceptibles a estrés salino produzcan mayor cantidad de H₂O₂. El nivel de H₂O₂ fue semicuantificado usando la tinción con 3,3-diaminobencidina (DAB) para teñir y poder detectar visualmente las zonas con presencia de peróxido de hidrógeno, uno de las principales especies reactivas de oxígeno (Daudi & O'Brien, 2012). Debido a que no se produjo crecimiento suficiente de tejido vegetal (hojas) en las líneas transgénicas, el ensayo se realizó con entre 2 a 4 hojas pequeñas del grupo completo de plantas

transformadas con *DcAREB3* que se encontraban en medio III de selección, por lo cual es un resultado preliminar que hay que repetir con más tejido vegetal y con cada línea transgénica por separado.

Luego de realizar el ensayo se fotografiaron las hojas teñidas como se muestra en la Figura 15, donde se puede visualizar en un color café oscuro las zonas con más H_2O_2 . Se observa una coloración tenue a tiempos 0, 24 y 48 horas en agua, sobre todo en WT, indicativo de la baja producción de H_2O_2 (Figura 15 A y B). Un aumento progresivo del color café oscuro se aprecia a medida que las hojas pasan más tiempo en la solución con 200 mM NaCl, indicativo de mayor daño oxidativo a mayor tiempo en solución (Figura 15 C y E). En los controles con agua respectivos para 24 horas y 48 horas (Figura 15 B y D) se notó una diferencia leve de coloración respecto a la condición inicial a las 0 horas (Figura 15 A), pero en el caso de las plantas transformadas con *DcAREB3* se observó una coloración café mayor, especialmente a las 48 horas en agua (Figura 15 A y D). Esto implica que las plantas transformadas con *DcAREB3* poseen más H_2O_2 que las plantas silvestres al estar en agua por 48 horas, lo que también se ve en el caso de las hojas en solución salina (Figura 15 E). Sin embargo, como se puede apreciar, el ensayo fue realizado en algunos casos con tan solo una hoja por situación, lo cual no permite concluir, y solo sugerir una tendencia en los resultados.














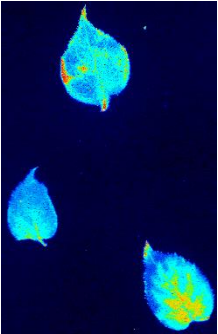
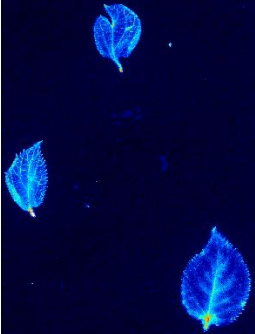
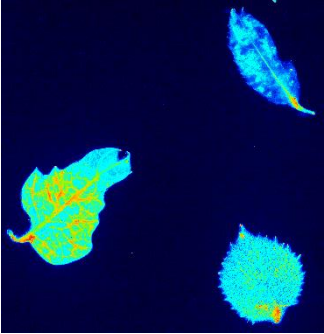
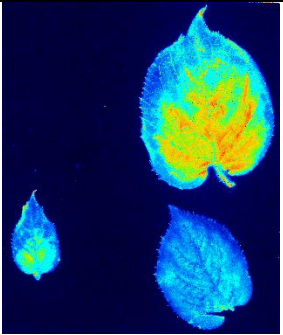
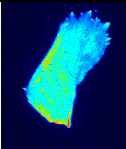
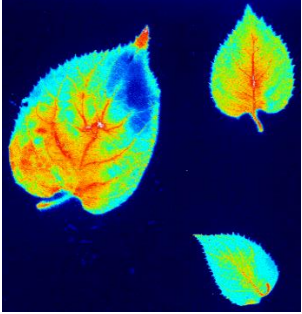
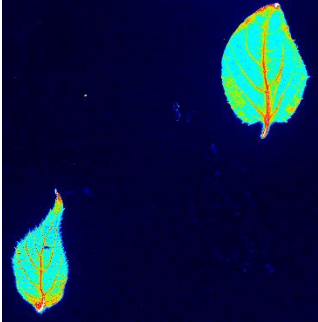
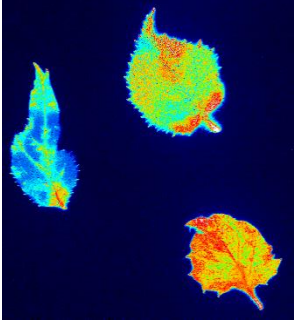
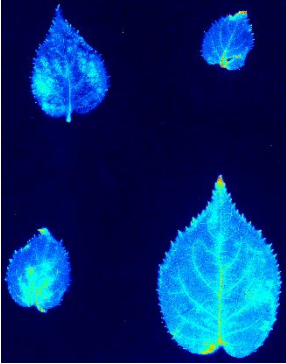
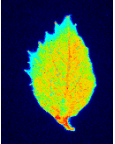
| | WT | VSI | <i>DcAREB3</i> |
|---------------------------------|---|--|---|
| A 0 hrs |  |  |  |
| B 24 hrs H ₂ O |  | N. A |  |
| C 24 hrs 200 mM NaCl |  |  |  |
| D 48 hrs H ₂ O |  | N. A |  |
| E 48 hrs 200 mM NaCl |  |  |  |

Figura 15. Resultados de ensayo DAB

Se muestran las hojas resultantes de cada tinción con DAB luego de A) 0 horas, es decir, al inicio del experimento, B) 24 horas en agua, C) 24 horas en una solución con 200 mM NaCl, D) 48 horas en agua y E) 48 horas en una solución de 200 mM de NaCl. Esto para plantas silvestres o wild type (WT), líneas transformadas con vector pK7RWG2 sin inserto (VSI) y

plantas transgénicas que expresan *DcAREB3*. No se realizaron controles en agua en el caso de la línea VSI ya que no se tenía suficiente tejido vegetal. N. A: no aplica, no se contó con tejido suficiente para realizar el ensayo.

Debido a que los resultados señalados fueron cualitativos, se buscó profundizar el análisis para hacerlo semicuantitativo, para lo cual se midió el porcentaje del área mayormente oxidada de las hojas a partir del área total. Para esto se analizaron las imágenes mediante el programa ImageJ, el que permite cuantificar los píxeles dentro de un área de la imagen. Esto permitió visualizar de mejor manera las áreas oxidadas de las hojas, las cuales se destacan en colores verde, anaranjado, rojo y blanco según la calibración de este caso, la cual esta invertida. De esta forma, las hojas con menos daño se observan mayoritariamente azules o celestes (Figura 16 A) al comienzo del tratamiento, mientras que las hojas más dañadas, correspondientes a las que pasaron 24 y 48 horas en tratamiento con solución salina, se observan más anaranjadas y rojas (Figura 16 C y E), llegando al blanco en el caso de las plantas transformadas con *DcAREB3* a las 48 horas (Figura 16 E). En el caso de los controles con agua, se observa más anaranjado y rojo en el caso de las 24 horas para las plantas silvestres (Figura 16 B) y las 48 horas en el caso de las plantas transformadas con *DcAREB3* (Figura 16 D).

| | WT | VSI | <i>DcAREB3</i> |
|---------------------------------|---|--|---|
| A 0 hrs H ₂ O |  |  |  |
| B 24 hrs H ₂ O |  | N. A |  |
| C 24 hrs 200 mM NaCl |  |  |  |
| D 48 hrs H ₂ O |  | N. A |  |

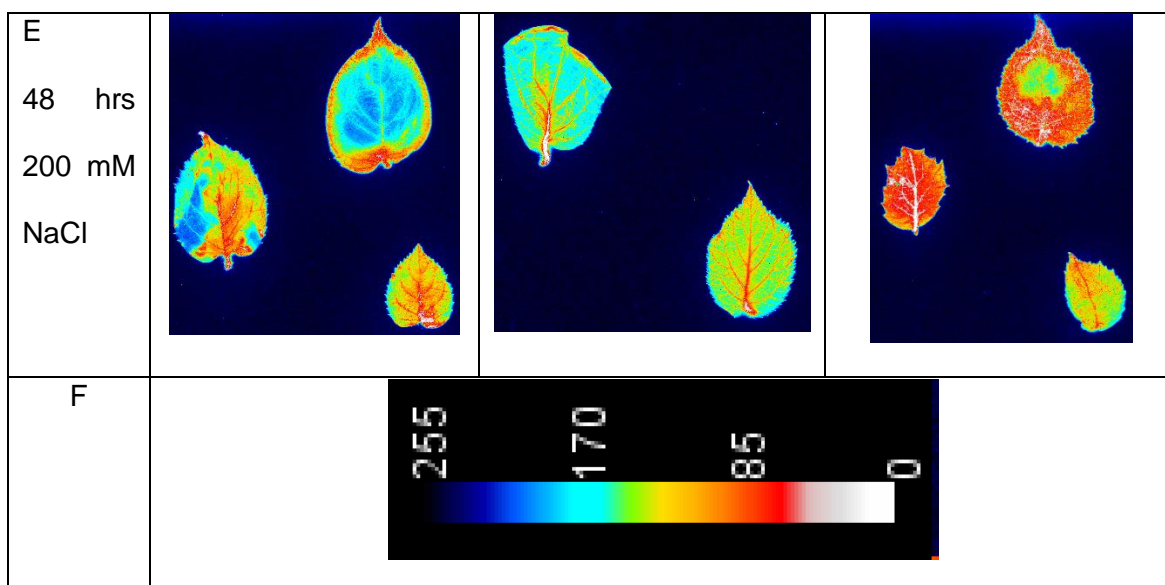


Figura 16. Imágenes modificadas para análisis semicuantitativo del ensayo DAB

Se muestran las hojas resultantes luego de modificar las imágenes de cada tinción con DAB luego de A) 0 horas, es decir, al inicio del experimento, B) 24 horas en agua, C) 24 horas en una solución con 200 mM NaCl, D) 48 horas en agua y E) 48 horas en una solución de 200 mM de NaCl. Se aplicó el filtro Royal invertido a imágenes 8-bit para poder visualizar las áreas oxidadas. Esto para plantas silvestres o wild type (WT), donde se muestran hojas representativas, líneas transformadas con vector pK7RWG2 sin inserto (VSI) y plantas transformadas con *DcAREB3*. No se realizaron controles en agua en el caso de la línea VSI ya que no se tenía suficiente tejido vegetal. La F) calibración normal para el filtro royal, la cual se debe observar de forma invertida para este caso, es decir, el 0 corresponde a alta oxidación y el 255 corresponde al nivel base de color, es decir, sin oxidación. Es por esto que en la figura las zonas oxidadas se ven desde el color verde al color blanco. N. A: no aplica, no se contó con tejido suficiente para realizar el ensayo.

Posteriormente se calculó el porcentaje de área mayormente oxidada en cada hoja, con lo que se generó el grafico de la Figura 17, donde en el caso de las plantas silvestres se comienza con un 23,63% de área oxidada al tiempo 0, lo cual aumenta a un 54,49% a las 24 horas en solución salina 200 mM NaCl y se mantiene muy cercano con 54,08% a las 48 horas en tratamiento. Por otro lado, en el caso de las hojas de la línea VSI se inicia con un porcentaje mucho menor de área oxidada, equivalente a un 1,97% y el porcentaje de área mayormente oxidada va aumentando progresivamente. A las 24 horas en tratamiento se tiene un 30,14% de área oxidada y a las 48 horas un

52,84%. Esta diferencia entre plantas silvestres y la línea VSI puede deberse al menor número de hojas para el ensayo con VSI, que equivale al 66,6% y puede reflejar una mayor dispersión en los resultados. Dentro de todo hay que destacar que plantas silvestres y la línea VSI alcanzan un porcentaje similar de área mayormente oxidada a las 48 horas de tratamiento.

En cuanto a las hojas de plantas de kiwi transformadas con *DcAREB3*, se observó un aumento progresivo del área mayormente oxidada, tal como sucedió en el caso de las VSI, pero en mayor medida. Comienzan con un 17,16% de área mayormente oxidada en el tiempo 0, la cual luego aumenta a 57,50% a las 24 horas en tratamiento salino y termina con 87,67% de área oxidada a las 48 horas con tratamiento salino. Esto implica que a pesar de que se esperaba una capacidad protectora de *DcAREB3* frente a estrés salino, se observó una mayor cantidad de H_2O_2 en comparación a plantas silvestres y la línea VSI, por lo que a modo preliminar no habría capacidad protectora. Hay que destacar que para obtener resultados concluyentes es necesario repetir el experimento con un número mayor de hojas por condición.

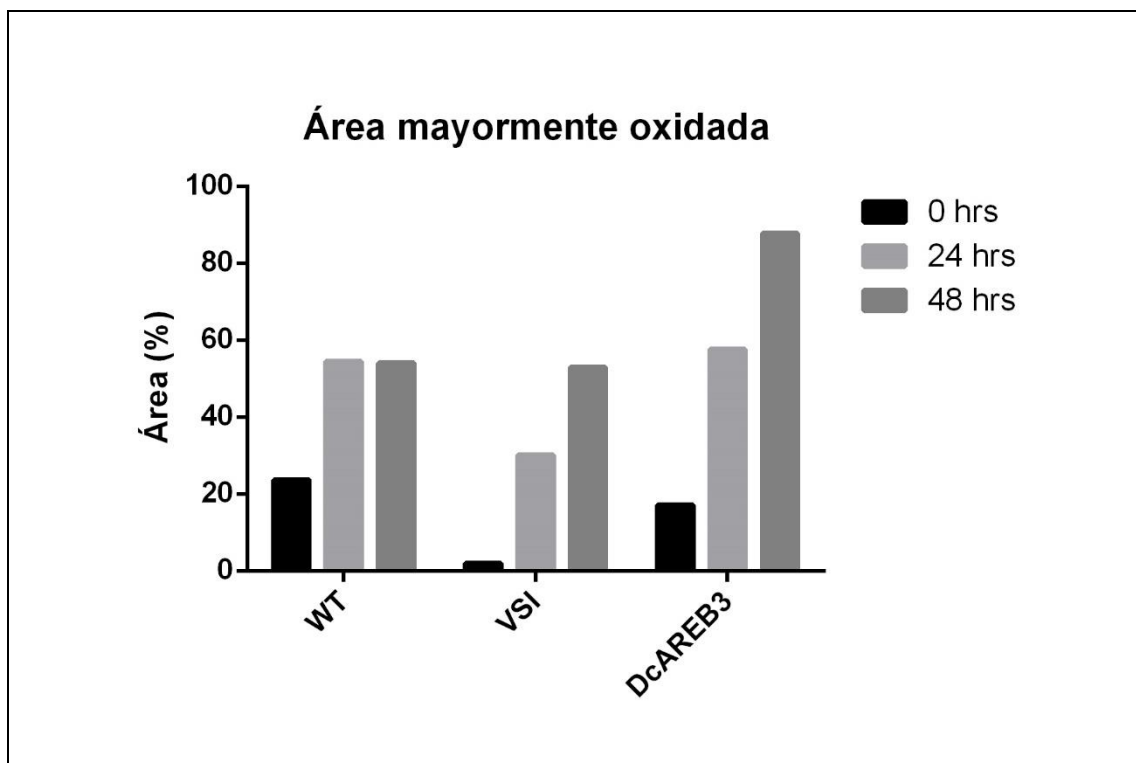


Figura 17. Gráfico de área mayormente oxidada para ensayo DAB

La cuantificación del área mayormente oxidada se realizó usando el programa ImageJ, donde se midió la cantidad total de píxeles de la hoja y luego se aplicó un rango de 75 píxeles para medir la zona más oxidada a partir de las imágenes previamente modificadas. WT: planta silvestre o wild type; VSI: línea transformada con vector pK7RWG2 sin inserto; DcAREB3: plantas transformadas con *DcAREB3*.

DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES

4.1 Caracterización molecular de líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa*

En 6 de las 7 líneas caracterizadas se obtuvo el tamaño esperado de aproximadamente 1300 pb para DcAREB3, que corresponde a la región codificante del gen determinado mediante análisis bioinformático (Simpson, 2015). En este caso, el gen de interés tiene un tamaño de 1311 pb, el cual fue aislado a partir de ADNc de *D. carota* y posee una alta identidad con el factor de transcripción ABF1 (AT1G49720.1) de *Arabidopsis thaliana* (Simpson, 2015). En este organismo, los ABF corresponden a una familia de proteínas de tipo bZIP que puede ser inducida por ABA y que tiene actividad transcripcional en *Arabidopsis thaliana* (Choi et al., 2000). Este factor ABF1/AtbZIP35 se encuentra dentro del grupo A de factores de transcripción de tipo bZIP, grupo que comparte con las proteínas AREB2/ABF4/AtbZIP38 y ABI5/AtbZIP39, las cuales responden a ABA y estrés abiótico como sequía o alta salinidad en tejidos vegetativos (Jakoby et al., 2002).

Luego de seleccionar las líneas transgénicas de *A. deliciosa*, se mantuvieron en cultivo *in vitro* por 1 mes para poder tener suficiente tejido vegetal para comenzar los análisis de RTPCR. Se destaca que la extracción de ARN fue óptima, resultando un ARN íntegro y con pureza suficiente como para continuar con los ensayos (Figura 7; Tabla 5).

La verificación *in silico* de los partidores a usar en el análisis molecular de las líneas transgénicas predijeron tres secuencias de unión correspondientes ARN mensajero de tres variantes de transcripción para Abscisic Acid-Insensitive 5-like protein 7 o ABI5-like protein 7 (LOC108225746), perteneciente a la subfamilia de ABI5 y correspondiente a una secuencia predicha para el factor denominado ABRE3 en Simpson, 2015.

Posteriormente este factor fue denominado DcAREB3 en Simpson et al., 2018 dada su homología a factores de transcripción de tipo bZIP pertenecientes al grupo A, específicamente los llamados AREB/ABF en *A. thaliana*. Los partidores utilizados se encontraban dentro de la región codificante para amplificar un fragmento pequeño de 179 pb de las tres variantes de transcripción (Figura 8). Generalmente, las variantes de transcripción producen fragmentos de distintos tamaños por splicing alternativo, pero en este caso todas las variantes presentaron el mismo tamaño porque la región amplificada por los partidores qAREB3 corresponde a una región común entre las variantes. Es importante destacar que descartamos que en *A. deliciosa* silvestre los partidores hibridaran con algún templado, sugiriendo que los AREB de kiwi tienen otras secuencias en la región donde hibridan los partidores usados.

Los genes 18S y Actina corresponden a genes constitutivos y son utilizados como controles positivos, *housekeeping*, en las reacciones de qRT-PCR, ya que se expresan en todas las células de un organismo al ser requeridas para el funcionamiento basal de la célula. En el caso de la reacción con los partidores q18S (Figura 11), se observó un producto único, mientras que los partidores de qActina (Figura 12) se generaron dos productos: el producto esperado y otro adicional. Esto demuestra la importancia de que previo a un qRT hay que evaluar más de un gen *housekeeping* y que no basta con evaluarlo en un RT-PCR convencional (Figura 10) porque la sensibilidad de este método no permite ver más de una banda como en nuestro caso.

Para las líneas transgénicas se observó una abundancia de transcrito diferente entre ellas dado generalmente por un efecto insercional del transgén. Este efecto consiste en alteraciones en el ADN de la planta inducido por el proceso de transformación de ella. En este caso, la transformación de las plantas de *A. deliciosa* fue realizada mediante

Agrobacterium tumefaciens (Quiroz, 2014), donde la transformación se produce por la inserción aleatoria de la región de ADN-T o ADN transferible desde el plásmido binario facilitado por los factores VIR codificados en el plásmido inductor de tumores o Ti. Esto implica que la inserción puede ocurrir en cualquier segmento del genoma, por lo que se puede producir expresión diferencial del transgén. En este sentido, el transgén puede ser insertado en una región cercana o lejana a potenciadores de transcripción, provocando que el transgén se active o no respectivamente. Lo mismo sucede en el caso de que el transgén se inserte en regiones transcripcionales activas o silenciadas (Gelvin, 2003).

En las líneas 4 y 7 no se obtuvo abundancia de transcrito de DcAREB3 (Figura 14), lo que puede deberse a una baja abundancia de templado, como para el caso de línea 4 dado que en RTPCR convencional tampoco presentó bandas al amplificar actina (Figura 10). En este caso habría que repetir el ensayo con una mayor cantidad de ADNc. En el caso de línea 7 no hubo amplificación (Figura 10; Figura 14) lo cual podría ser porque el gen de interés no se está expresando y no debido a menor cantidad de ADNc. En este caso, al amplificar los genes 18S y actina (Figura 10; Figura 11; Figura 12) se descarta que haya una cantidad reducida de templado ya que se puede observar producto. También hay que destacar que la línea 3 si presentó expresión relativa de transcrito del gen *DcAREB3* (Figura 10C; Figura 14) a pesar de que no había presentado amplificado en el PCR convencional (Figura 6), lo que puede indicar un posible error durante la primera reacción de PCR.

Respecto de los gráficos de amplificación para los genes *housekeeping* se espera que las curvas se encuentren agrupadas, cercanas a un umbral de número de ciclos similar, y que en una curva de disociación se encuentre solo un pico, el cual es específico para

el fragmento de ADN de interés. Cuando se obtiene más de un pico en la curva de disociación, esto indica que se está produciendo algún producto inespecífico.

En el caso de ARNr18S (*housekeeping*) las curvas se encuentran agrupadas entre los ciclos 16 y 24, en el caso de actina, entre 22 y 28, porque al ser genes constitutivos presentan la misma abundancia en todas las muestras. Las curvas que comienzan a partir del ciclo 28 corresponden a réplicas de la muestra correspondiente a la línea 4, mostrando la baja abundancia de ADNc en esta línea. El resto de las curvas corresponden a controles negativos. En el caso de las curvas de disociación (Figura 11B) se obtuvo solo un pico para gen 18S, pero un “hombro” para actina lo que indica que se amplifica más de un fragmento de ADN, es decir, podrían estar produciéndose reacciones inespecíficas. Es por esta razón que este gen fue descartado en los ensayos futuros donde solo se normalizó la abundancia del transcrito *DcAREB3* respecto al gen 18S.

Para el gen de interés *DcAREB3*, en el gráfico de amplificación (Figura 13A) no se obtuvieron curvas agrupadas como en los casos anteriores para 18S (Figura 11A) y actina (Figura 12A) debido a que cada línea transgénica produce diferentes tasas esperables de abundancia de transcrito por el efecto insercional mencionado anteriormente. En cuanto a la curva de disociación obtenida (Figura 13B) se obtuvieron picos inespecíficos en muestras correspondientes a WT y a la línea 7, demostrando que no presentan el transcrito de *DcAREB3*.

En cuanto a la expresión en las líneas transgénicas, se obtuvieron 5 líneas con diferente abundancia de transcrito (Figura 14). Se espera que las líneas con más abundancia de transcrito tengan más proteína del factor de transcripción y con ello

induzcan una mayor tolerancia a estrés mediado por ABA en las plantas transgénicas (J.-B. Kim et al., 2004; S. Kim et al., 2004; S. Y. Kim, 2006).

A pesar de que los resultados fueron analizados contra la planta silvestre (WT), utilizado como control, también se muestran los resultados obtenidos para VSI que es una planta transgénica pero que no posee el transgén. Generalmente estas líneas transgénicas se usan como control (debe tener mismo resultado que WT) porque permite concluir que los resultados obtenidos son por la presencia del transgén y no por el hecho de que la planta sea transgénica en sí. Esto es importante de recalcar porque el vector utilizado pK7RWG2-AREB3 (Simpson, 2015) posee otros elementos como marcadores de selección (Figura 5), que podrían tener un efecto indeseado en el ensayo. Aun así, se utilizó como control la línea WT ya que corresponde al estado silvestre de *A. deliciosa*.

Cabe destacar que los análisis comparativos entre PCR, RT-PCR y qRT son valiosos y permiten proponer que al momento de genotipificar y determinar expresión relativa, es importante tomar todas estas precauciones para no descartar plantas falsas negativas como la L3. También permiten asegurar tener suficiente cantidad de ADNc de todas las líneas a analizar y usar un buen gen *housekeeping* como el *18S*, lo que también depende de cada planta en estudio. Estas consideraciones son indispensables para tener resultados confiables.

4.3 Ensayo de tolerancia a estrés salino

Luego de determinar los niveles relativos de expresión de *DcAREB3*, y debido a que no se produjo crecimiento suficiente de tejido vegetal (hojas) en las líneas transgénicas, el ensayo de DAB para determinar el nivel de peróxido de hidrógeno, uno de las principales especies reactivas de oxígeno (Daudi & O'Brien, 2012), se realizó solo con

2 a 4 hojas pequeñas del pool completo de plantas transgénicas que expresan *DcAREB3* (se excluyeron las líneas 4 y 7 por no expresar el transgén).

Por ello, los resultados donde las plantas transgénicas *DcAREB3* poseen más H_2O_2 que las plantas silvestres al estar en agua y NaCl por 48 horas puede deberse a un efecto técnico dado por el bajo número de hojas o réplicas del ensayo o que el gen no es requerido para conferir tolerancia a salinidad en hojas de plantas transgénicas.

Podemos mencionar que la semicuantificación usando el programa ImageJ, permitió visualizar de mejor manera las áreas oxidadas, calculando el área y porcentaje de oxidación (Figura 16; Figura 17). La menor tasa de oxidación de VSI respecto a WT fue inesperada y puede deberse a que las plantas VSI se encontraban bajo una presión selectiva (medio con antibióticos al igual que las *DcAREB3*), mientras que las plantas silvestres no, por lo que las primeras pueden estar mejor preparadas para responder frente al estrés salino. Dentro de todo hay que destacar que plantas silvestres y la línea VSI alcanzan un porcentaje similar de área mayormente oxidada a las 48 horas de tratamiento (Figura 17).

En cuanto a las hojas de plantas de kiwi transformadas con *DcAREB3*, se observó un aumento progresivo del área mayormente oxidada, llegando a un 87,67% de área oxidada a las 48 horas con tratamiento salino de 200 mM NaCl. Se esperaba una capacidad protectora de *DcAREB3* frente a estrés salino por la relación que tienen los factores de transcripción AREB con la resistencia a estrés hídrico, salino y osmótico, en donde bajo estrés se activan estos factores de transcripción para generar una respuesta protectora (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013; Iuchi et al., 2001; Simpson et al., 2018; Uno et al., 2000; Yoshida et al., 2010). En cambio, se observó una mayor cantidad de H_2O_2 en comparación a plantas silvestres y la línea VSI, por lo que a modo

preliminar no habría capacidad protectora. Esto teniendo en cuenta que la concentración de la solución salina representa un estrés agudo en situaciones controladas de laboratorio y que *A. deliciosa* en estado silvestre presenta una alta sensibilidad a la salinidad, de aproximadamente 50 mM (Merlet & D'Etigny, 1989).

También hay que tener en cuenta que existe la posibilidad de que la mayor cantidad de H_2O_2 generado en las hojas puede deberse a la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la cual es la primera línea de defensa frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) al dismutar $O_2^{\cdot-}$ en O_2 y H_2O_2 (Das & Roychoudhury, 2014). Esto significaría que el aumento de la cantidad de peróxido en las hojas de las plantas transformadas con *DcAREB3* podría deberse a una mayor eliminación de radicales. A pesar de esto, hay que tener en cuenta que el tiempo transcurrido en los experimentos (24 y 48 hrs) son muy largos, por lo que debería haberse producido acción de enzimas peroxidadasas que eliminaran el peróxido en esos tiempos.

De todas formas, hay que destacar que para obtener resultados más confiables es necesario repetir el experimento con un mayor número de hojas por línea y condición evaluando de manera independiente cada línea transgénica. En este punto también se podría incluir un cambio en los tiempos transcurridos bajo estrés salino, disminuyéndolos a 3, 6 y 12 horas. También es necesario realizar un ensayo en planta completa lo que daría resultados más concluyentes, considerando que el estrés salino es sentido en las raíces de las plantas.

CONCLUSIONES

Se seleccionaron molecularmente las líneas transgénicas para *DcAREB3* de plantas de *Actinidia deliciosa* previamente transformadas, obteniéndose un total de 5 líneas transgénicas con expresión diferencial del transgén.

En cuanto a la tolerancia a estrés salino en las líneas transgénicas, se concluye preliminarmente que la presencia del transgén *DcAREB3* no otorga capacidad protectora debido al elevado nivel de H_2O_2 en las hojas transcurrido el tiempo del ensayo. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que éste no fue realizado de manera óptima, por lo que habría que repetirlo en condiciones que permitan obtener una conclusión más robusta.

BIBLIOGRAFIA

- BANCO CENTRAL DE CHILE. (2017). *Indicadores de Comercio Exterior Cuarto trimestre 2017*. Recuperado de <https://www.bcentral.cl/documents/20143/935480/icelV2017.pdf/08f2cee3-552d-43a6-4021-000b5716421c>
- Chartzoulakis, K. S., Therios, I. N., Misopolinos, N. D., & Noitsakis, B. I. (1995). Growth, ion content and photosynthetic performance of salt-stressed kiwifruit plants. *Irrigation Science*, *16*(1), 23–28. <https://doi.org/10.1007/BF00208392>
- Chen, X., Han, H., Jiang, P., Nie, L., Bao, H., Fan, P., ... Li, Y. (2011). Transformation of β -Lycopene Cyclase Genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* Conferred Salt Tolerance in *Arabidopsis* and Tobacco. *Plant and Cell Physiology*, *52*(5), 909–921. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr043>
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., & Kim, S. Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of biological chemistry*, *275*(3), 1723–1730. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.3.1723>
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, *2*, 53. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2013). The Molecular Basis of ABA-Mediated Plant Response to Drought. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. <https://doi.org/10.5772/53128>
- Daudi, A., & O'Brien, J. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *BIO-PROTOCOL*, *2*(18). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.263>
- De Pascale, S., Maggio, A., Fogliano, V., Ambrosino, P., & Ritieni, A. (2001). Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *76*(4), 447–453. <https://doi.org/10.1080/14620316.2001.11511392>
- FAOSTAT, & FAO. (s. f.). UNdata | record view | Kiwi fruit. Recuperado 11 de abril de 2019, de <http://data.un.org/Data.aspx?d=FAO&f=itemCode%3A592>
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. En *Sustainable Agriculture* (pp. 153–188). https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_12
- Ferguson, A. R. (1984). Kiwifruit: A Botanical Review. *Horticultural Reviews*, 1–64. <https://doi.org/10.1002/9781118060797.ch1>
- Ferguson, A. R., & Bollard, E. G. (1990). Domestication of the Kiwifruit. En *Kiwifruit: Science and Management* (pp. 165–246). Recuperado de https://books.google.cl/books?redir_esc=y&id=ong_AAAAYAAJ&focus=searchwithinvolume&q=domestication+of+the+kiwifruit
- Ferguson, A. R., & Seal, A. G. (2008). Kiwifruit. En *Temperate Fruit Crop Breeding* (pp.

- 235–264). https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6907-9_8
- Ferguson, R. A., & Huang, H. (2007). Genetic Resources of Kiwifruit: Domestication and Breeding. En *Horticultural Reviews* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1002/9780470168011.ch1>
- Forni, F. (2019). Informe señala que Chile enfrenta alto estrés hídrico. Recuperado 8 de enero de 2020, de La Tercera website: <https://www.latercera.com/mundo/noticia/informe-senala-chile-enfrenta-alto-estres-hidrico/771526/#>
- Fujii, H., Verslues, P. E., & Zhu, J.-K. (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(2), 485–494. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048538>
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 67(1), 16–37, table of contents. <https://doi.org/10.1128/mmbr.67.1.16-37.2003>
- Guroo, I., Wani, S. A., Wani, S. M., Ahmad, M., Mir, S. A., & Masoodi, F. A. (2017). A Review of Production and Processing of Kiwifruit. *Journal of Food Processing & Technology*, 8(10). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000699>
- Han, H., Li, Y., & Zhou, S. (2008). Overexpression of phytoene synthase gene from *Salicornia europaea* alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology Letters*, 30(8), 1501–1507. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9705-6>
- Hofste, R., Reig, P., & Schleifer, L. (2019). 17 Countries, Home to One-Quarter of the World's Population, Face Extremely High Water Stress. Recuperado 8 de enero de 2020, de World Resources Institute website: <https://www.wri.org/blog/2019/08/17-countries-home-one-quarter-world-population-face-extremely-high-water-stress>
- Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27(4), 325–333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01096.x>
- Jakoby, M., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedman, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science*, 7(3), 106–111.
- Kang, J.-Y., Choi, H.-I., Im, M.-Y., & Kim, S. Y. (2002). *Arabidopsis* Basic Leucine Zipper Proteins That Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell*, 14, 343–357. <https://doi.org/10.1105/tpc.010362>
- Kim, H. J., Fonseca, J. M., Choi, J. H., Kubota, C., & Dae, Y. K. (2008). Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3772–3776. <https://doi.org/10.1021/jf0733719>

- Kim, J.-B., Kang, J.-Y., & Kim, S. Y. (2004). Over-expression of a transcription factor regulating ABA-responsive gene expression confers multiple stress tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 2(5), 459–466. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00090.x>
- Kim, S., Kang, J. Y., Cho, D. I., Park, J. H., & Soo, Y. K. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant Journal*, 40(1), 75–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02192.x>
- Kim, S. Y. (2006). The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiologia Plantarum*, 126(4), 519–527. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2005.10.007>
- Kim, S. Y., Ma, J., Perret, P., Li, Z., & Thomas, T. L. (2002). Arabidopsis AB15 Subfamily Members Have Distinct DNA-Binding and Transcriptional Activities. *PLANT PHYSIOLOGY*, 130(2), 688–697. <https://doi.org/10.1104/pp.003566>
- Krauss, S., Schnitzler, W. H., Grassmann, J., & Voitke, M. (2006). The influence of different electrical conductivity values in a simplified recirculating soilless system on inner and outer fruit quality characteristics of tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 441–448. <https://doi.org/10.1021/jf051930a>
- Llorca, C. M., Potschin, M., & Zentgraf, U. (2014). bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in Plant Science*, 5, 169. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00169>
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1064–1068. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139–158. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>
- Merlet, H., & D'Etigny, M. (1989). *Requerimientos de clima y suelo: Frutales de hoja caduca. (Pub. IREN N°83)*. Recuperado de CIREN website: <http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/22808>
- Park, S.-Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1068–1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- PlantTFDB. (s. f.). Details for gene AT3G56850.1 - Plant Transcription Factor database - Universitaet Potsdam. Recuperado 7 de enero de 2020, de http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/gene_details.php?pep_id=AT3G56850.1&sp_id=ATH

- Quiroz, L. F. (2014). *Estandarización del cultivo in-vitro de Actinidia deliciosa (Kiwi) y su transformación sobreexpresando un gen carotenogénico de Daucus carota (Zanahoria)*. Universidad de Chile.
- Rodríguez-Villalón, A., Ruiz-Sola, M. Á., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A., & Rodríguez-Concepción, M. (2014). A Root Specific Induction of Carotenoid Biosynthesis Contributes to ABA Production upon Salt Stress in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 9(3), e90765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090765>
- Roy, S. J., Negrão, S., & Tester, M. (2014). Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 115–124. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2013.12.004>
- Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book*, 10, e0158. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 571. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>
- Shi, Y., Guo, J., Zhang, W., Jin, L., Liu, P., Chen, X., ... Wang, R. (2015). Cloning of the Lycopene β -cyclase Gene in Nicotiana tabacum and Its Overexpression Confers Salt and Drought Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 30438–30457. <https://doi.org/10.3390/ijms161226243>
- Shiota, H., Ko, S., Wada, S., Otsu, C. T., Tanaka, I., & Kamada, H. (2008). A carrot G-box binding factor-type basic region/leucine zipper factor DcBZ1 is involved in abscisic acid signal transduction in somatic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(5–6), 550–558. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.02.010>
- Simpson Alfaro, K. M. (2015). *Identificación de factores de transcripción capaces de unirse y regular al promotor del gen PSY2 de D. carota*. Universidad de Chile.
- Simpson, K., Fuentes, P., Quiroz-Iturra, L. F., Flores-Ortiz, C., Contreras, R., Handford, M., & Stange, C. (2018). Unraveling the induction of phytoene synthase 2 expression by salt stress and abscisic acid in Daucus carota. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 4113–4126. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery207>
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11632–11637. <https://doi.org/10.1073/pnas.190309197>
- Vinson, C., Acharya, A., & Taparowsky, E. J. (2006). Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1759(1–2), 4–12. <https://doi.org/10.1016/J.BBAEXP.2005.12.005>
- Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>

Yoshida, T., Fujita, Y., Sayama, H., Kidokoro, S., Maruyama, K., Mizoi, J., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*, 61(4), 672–685. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04092.x>