



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización funcional de los factores de transcripción DcAlfin4 y DcAlfin7 de *Daucus carota* (zanahoria) y su aplicación biotecnológica.”

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Biotecnología Molecular

Facultad de Ciencias

Por

Luis Felipe Quiroz Iturra

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.

Marzo 2019

Santiago - Chile

FACULTAD DE CIENCIAS

Índice de contenidos

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Cambio climático y estrés abiótico.	5
1.1.1. Cambio Climático.	5
1.1.2. Estrés abiótico en plantas.	6
1.1.2.1. Mecanismos de resistencia frente a EA.	6
1.1.2.2. Estrés abiótico en plantas y perspectivas biotecnológica.....	7
1.2. Actinidia deliciosa (Kiwi).	8
1.2.1. Características e importancia comercial.....	8
1.2.2. Biotecnología en Actinidia.	9
1.2.3. Condiciones de cultivo de <i>A. deliciosa</i>	10
1.3. Factores de transcripción involucrados en la respuesta a EA.....	11
1.3.1. Factores de transcripción ALFIN en tolerancia a EA.	13
1.3.2. Factores de transcripción ALFIN en <i>Daucus carota</i>	16
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE).....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	20
2.1. Reactivos.....	20
2.2. Cultivo de cepas bacterianas.	20
2.3. Preparación de células de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetente.....	21
2.4. Transformación de células bacterianas quimiocompetentes.....	21
2.4.1. Vectores utilizados.....	21
2.4.2. Transformación de <i>A. tumefaciens</i> quimiocompetentes.....	22
2.5. Esterilización de semillas mediante gas Clorín.	22
2.6. Generación de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> que expresen los genes genes DcAlfin4 y DcAlfin7.....	23
2.6.1. Transformación de <i>A. thaliana</i> con las construcciones pKAlfin4 y pKAlfin7.	23
2.6.2. Selección de líneas transgénicas y T3 homocigotas de <i>A. thaliana</i>	24
2.7. Tratamiento con NaCl en plantas de <i>D. carota</i>	26

2.8.	Ensayos de tolerancia a salinidad y sequía en plantas de <i>A. thaliana</i>	26
2.9.	Generación de líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> que expresen los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.....	27
2.9.1.	Regeneración <i>in vitro</i> de plantas transformantes de <i>A. deliciosa</i> mediante organogénesis somática.	27
2.9.2.	Transformación de <i>A. deliciosa</i> con las construcciones pKAlfin4, pKAlfin7 y pK7.....	29
2.10.	Extracción de ácidos nucleicos.....	30
2.10.1.	Extracción de ADN.	30
2.10.1.1.	Extracción de ADN genómico a partir de hojas de <i>A. thaliana</i>	30
2.10.1.2.	Extracción de ADN genómico a partir de hojas de <i>A. deliciosa</i>	31
2.10.2.	Extracción de ARN y síntesis de ADNc.	32
2.10.2.1.	Extracción de ARN total a partir de tejido vegetal de <i>A. deliciosa</i> , <i>A. thaliana</i> y <i>D.carota</i>	32
2.10.2.2.	Cuantificación y Análisis de la calidad del ARN Total.....	33
2.10.2.3.	Síntesis del ADNc.....	33
2.10.2.3.1.	Tratamiento del RNA total con DNasa I.	33
2.10.2.3.2.	Síntesis de ADNc mediante RT-PCR.	34
2.11.	PCR y qRT-PCR.....	34
2.11.1.	PCR Convencional utilizando ADNg o ADNc como molde.	34
2.11.2.	PCR de colonias bacterianas.	35
2.11.3.	qRT-PCR.....	35
2.12.	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.....	36
2.13.	Cuantificación de clorofilas y carotenoides totales.	37
2.13.1.	Extracción de pigmentos.....	37
2.13.2.	Cuantificación de pigmentos.	37
2.14.	Detección de la producción de peróxido de hidrógeno en hojas de <i>A. deliciosa</i> sometidas a tratamiento con NaCl.	39
2.14.1.	Tratamiento de hojas de <i>A. deliciosa</i> con NaCl.....	39
2.14.2.	Tinción de hojas de <i>A. deliciosa</i> con DAB.....	40
2.15.	Diseño de partidores.....	40
3.	RESULTADOS.....	41
3.1.	Niveles de expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en plantas de <i>D. carota</i> sometidas a tratamiento agudo por sal.	41

3.2. Generación, análisis moleculares y ensayos de tolerancia a estrés salino y sequía de líneas de <i>A. thaliana</i> que expresen los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	43
3.2.1. Transformación de <i>A. thaliana</i> con los factores de transcripción DcAlfin4 y DcAlfin7 y obtención de líneas T3 homocigotas.	43
3.2.2. Niveles de transcrito de los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y AtPsy en las líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> Al4 y Al7.	47
3.2.3. Contenido de clorofilas y carotenoides totales de las líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	49
3.2.4. Ensayo de tolerancia a salinidad de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	50
3.2.5. Ensayo de tolerancia a sequía de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> que expresan DcAlfin4 y DcAlfin7.	53
3.3. Generación, análisis moleculares y ensayos de tolerancia a estrés salino de líneas de <i>A. deliciosa</i> que expresen los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	59
3.3.1. Transformación de <i>A. deliciosa</i> y regeneración <i>in vitro</i> de plantas transformantes que para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	60
3.3.2. Análisis moleculares de líneas transformantes de <i>A. deliciosa</i> para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	62
3.3.2.1. PCR a partir de ADNg de plantas transformantes de <i>A. deliciosa</i> para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	62
3.3.2.2. RT-PCR de los genes DcAlfin4 y DcAlfin3 de líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	63
3.3.2.3. Análisis de niveles de transcrito mediante qRT-PCR de los genes DcAlfin4 y DcAlfin3 de líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i>	65
3.3.3. Líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> que expresan los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	67
3.3.3.1. Cuantificación de carotenoides totales y clorofilas de líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> transgénicas para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	67
3.3.3.2. Tratamiento NaCl y tinción con DAB de hojas <i>A. deliciosa</i> transgénicas para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.	72
4. DISCUSIÓN.	77
4.1. Los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 responde transcripcionalmente en plantas de <i>D. carota</i> sometidas a tratamiento agudo por sal.	77
4.2. La expresión heteróloga de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en <i>A. thaliana</i> genera un aumento en los niveles relativos de transcrito del gen AtPsy y en el contenido de carotenoides y clorofilas.	79

4.3. Las líneas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para el gen DcAlfin4 presentan una mayor tolerancia a tratamientos de salinidad y sequía que líneas transgénicas para el gen DcAlfin7. .	82
4.4. La expresión heteróloga de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en <i>A. deliciosa</i> genera un aumento en los niveles de carotenoides totales y clorofilas, así como una reducción parcial de especies reactivas de oxígeno en tratamiento agudo con NaCl.	87
CONCLUSIONES.	93
REFERENCIAS.	95
ANEXOS.	103

Índice de Figuras

Figura 1. Principales exportadores de kiwi en el mundo en toneladas fruto por año.....	9
Figura 2. Tolerancia a salinidad de distintos frutales.....	12
Figura 3. Respuesta del gen DcPsy2 de <i>D. carota</i> bajo tratamiento con NaCl.	18
Figura 4. Esquema de selección de líneas transgénicas homocigotas en <i>A. thaliana</i>	25
Figura 5. Esquema de los tratamientos de salinidad y sequía en plantas de <i>A. thaliana</i>	27
Figura 6. Espectro de absorción de pigmentos extraídos a partir de hojas de tabaco.....	39
Figura 7. Niveles de expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción DcAlfin4, DcAlfin7 y DcAREB3 en plantas de <i>D. carota</i> sometidas a tratamiento agudo con NaCl 250mM.....	43
Figura 8. Colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con los vectores de pKAlfin4 y pKAlfin7...	44
Figura 9. Selección de líneas transgénicas de <i>A. thaliana</i> para los genes DcAlfin 4 y DcAlfin7...	46
Figura 10. Niveles de expresión de los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y AtPsy de plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para los genes que codifican los factores de transcripción DcAlfin4 y DcAlfin7. ...	48
Figura 11. Cuantificación de carotenoides totales y clorofilas en plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7.....	52
Figura 12. Imagen representativa del comportamiento de las líneas transgénicas para los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y VSI una vez finalizado el tratamiento crónico con NaCl 200mM.	55
Figura 13. Análisis fenotípico de las plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7 sometidas a tratamiento de salinidad.....	56
Figura 14. Imagen representativa del comportamiento de las líneas transgénicas para los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y VSI una vez finalizado el tratamiento de sequía.	57
Figura 15. Análisis fenotípico de las plantas de <i>A. thaliana</i> transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7 sometidas a tratamiento de sequía.....	58
Figura 16. Cultivo <i>in vitro</i> y transformación estable del kiwi.....	62
Figura 17. PCR a partir de ADN genómico de plantas transformantes de <i>A. deliciosa</i> par los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.....	63
Figura 18. RT-PCR de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en plantas de <i>A. deliciosa</i> transgénicas para los genes que codifican los factores de transcripción DcAlfin4 o DcAlfin7.....	65
Figura 19. Niveles relativos de transcrito del gen DcAlfin4 en las líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> Al4.	66
Figura 20. Niveles relativos de transcrito del gen DcAlfin7 en las líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> Al7.	67
Figura 21. Cuantificación de carotenoides totales y clorofila en plantas de <i>A. deliciosa</i> transgénicas para el gen DcAlfin4.....	69
Figura 22. Cuantificación de carotenoides totales y clorofila en plantas de <i>A. deliciosa</i> transgénicas para el gen DcAlfin7.....	71
Figura 23. Análisis cualitativo y semicuantitativo de los niveles de peróxido de hidrogeno de hojas de líneas transgénicas de <i>A. deliciosa</i> para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 sometidas a tratamiento agudo con NaCl.	75

RESUMEN.

El cambio climático (CC) caracterizado por alzas de temperatura, desertificación y aumento de salinidad, entre otros, genera en plantas estrés abiótico (EA) lo que conlleva a una reducción en la tasa de producción de plantas comerciales afectando a la economía de los países. Este es el caso del Kiwi (*Actinidea deliciosa*), el cual se encuentra dentro de las cinco frutas más exportadas por nuestro país, posicionando a Chile como es el segundo mayor exportador de kiwi del hemisferio sur y el tercero a nivel mundial. Uno de los mayores problemas en el cultivo de kiwi, es su sensibilidad a suelos salinos y a la falta de riego, lo que disminuye el calibre de los frutos y limita la distribución geográfica de los campos de kiwi. Lo anterior, y teniendo en consideración los efectos del CC, plantea a la generación de nuevas variedades de patrones de kiwi con mayor tolerancia a EA como un desafío biotecnológico.

Los factores de transcripción (FT) son reguladores clave del metabolismo vegetal y de diversos procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta a los estímulos ambientales como el frío, salinidad y sequía. Dentro de los FT involucrados en la respuesta a EA, destaca la familia ALFIN, algunos de ellos caracterizados en *Medicago sativa* (Alfalfa), *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* (soja).

Previamente, en nuestro grupo identificamos y determinamos que los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 de *D. carota* codifican para proteínas con: (i) localización nuclear, (ii) capacidad de transactivar la transcripción y (iii) capacidad de unirse a elementos cis en el promotor del gen DcPsy2. Este gen, codifica para una enzima clave en la biosíntesis de carotenoides, compuestos antioxidantes y precursores de la hormona ácido abscísico (ABA) involucrada en la tolerancia a EA. En el presente trabajo, se determinó que los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 aumentan su nivel transcripcional al someter plantas de *D. carota* a tratamientos agudos con NaCl. Por ello, se

determinó si los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 conferirían tolerancia a estrés abiótico usando un sistema modelo como lo es *Arabidopsis thaliana*. Las líneas transgénicas homocigotas de *A. thaliana* que expresan DcAlfin4 presentaron una inducción en la expresión de AtPsy, mayores niveles de carotenoides totales y de clorofila a y b, junto con una mayor tasa de supervivencia y menor reducción de biomasa en tratamientos crónicos de salinidad y sequía respecto a las plantas de control. Líneas transgénicas homocigotas de *A. thaliana* que expresan DcAlfin7 presentaron una mayor tasa de supervivencia en tratamiento crónico de salinidad, pero tanto su peso fresco como biomasa se vieron reducidos en tratamientos de estrés salino e hídrico. Además, las líneas de *A. thaliana* transgénicas para DcAlfin7 no mostraron una correlación entre el aumento en carotenoides y la expresión de AtPsy. Lo que sugiere que el mecanismo de ambos FTs es diferente en el rol de conferir de tolerancia a salinidad y sequía en *A. thaliana*, en donde es la expresión del gen DcAlfin4 la que genera un mayor aumento en la tolerancia a estrés salino e hídrico.

Por otro lado, líneas de *A. deliciosa* que expresa DcAlfin4 y DcAlfin7 presentaron un mayor contenido de carotenoides y de clorofilas. Además, hojas de líneas transgénicas DcAlfin4 y DcAlfin7 mostraron un estado oxidativo basal menor en comparación a hojas de plantas no transgénicas. Si bien se debe determinar la tolerancia a salinidad y sequía en plantas de kiwi, los resultados obtenidos nos permiten proponer a los genes DcAlfin4 (y DcAlfin7 en menor medida) como herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de cultivos de importancia comercial para el país.

ABSTRACT.

Climate change (CC), characterized by temperature rises, desertification and increased salinity, among others, generates abiotic stress (AS) in plants which leads to a reduction in the yield of commercial plants affecting the economies of countries. This is the case of the kiwi (*Actinidea deliciosa*), which is one of the five most exported fruits of our country, positioning Chile as the second largest exporter of kiwi in the southern hemisphere and the third worldwide. One of the biggest problems in the cultivation of kiwi is its sensitivity to saline soils and lack of irrigation, which decreases the size of the fruit and limits the geographical distribution of kiwi plantations. Considering the effects of CC means that the generation of new varieties of kiwi with higher tolerance to abiotic stress is a biotechnological challenge.

Transcription factors (TF) are key regulators of plant metabolism and various physiological processes, including the response to environmental stimuli such as cold, salinity and drought. Multiple TFs regulate the expression of stress-inducible genes, which are involved in acclimation and tolerance to AS conditions. Within the TFs involved in the response to AS, the ALFIN family stands out.

Previously, in our group it has been identified and demonstrated that DcAlfin4 and DcAlfin7 genes from *Daucus carota* (carrot) encode for proteins with: (i) nuclear localization, (ii) ability to transactivate transcription and (iii) ability to bind to cis elements in the promoter of the DcPsy2 gene. This gene encode for a key enzyme involved in the biosynthesis of carotenoids, antioxidant compounds and precursors of abscisic acid (ABA) hormone involved in the response to AS. In the present work, it was determined that the genes DcAlfin4 and DcAlfin7 increase their transcriptional levels in plants of *D. carota* under treatments with NaCl. Therefore, the ability of DcAlfin4 and DcAlfin7 genes to confer AS tolerance in a model system such as *Arabidopsis*

thaliana, was evaluated. Homozygous transgenic lines of *A. thaliana* that expressed DcAlfin4 showed an induction in the expression of AtPsy, higher levels of total carotenoids and chlorophyll a and b, together with a higher survival rate and lower biomass reduction in chronic salinity and drought treatments with respect to the control plants. Transgenic homozygous lines of *A. thaliana* expressing DcAlfin7 showed a higher survival rate in chronic treatments of salinity, but a decrease in the fresh weight and biomass compared to control plants without showing a correlation with the increase in carotenoids and the expression of AtPsy. This suggests that the mechanism of both TFs are different in the role of conferring tolerance to salinity and drought in *A. thaliana*, being the expression of the gene DcAlfin4 which generates a higher increase in tolerance to saline and hydric stress.

Moreover, lines of *A. deliciosa* expressing DcAlfin4 and DcAlfin7 presented a higher content of carotenoids and chlorophylls. In addition, leaves of transgenic kiwi lines for DcAlfin4 and DcAlfin7 showed a lower state of basal oxidation compared to leaves of non-transgenic plants. Although the tolerance to salinity and drought in kiwifruit plants has yet to be determined, the results obtained allow us to propose that DcAlfin4 (and DcAlfin7 in lesser extent) are useful biotechnological tools for the genetic improvement of crops of commercial importance for the country.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Cambio climático y estrés abiótico.

1.1.1. Cambio Climático.

El cambio climático (CC) es un proceso de origen antropológico que se relaciona al aumento de la temperatura del planeta, el cual es causado por las elevadas emisiones y acumulación como dióxido de carbono (CO₂) generando el conocido efecto invernadero. Las consecuencias incluyen el derretimiento de glaciares, y cambios en las precipitaciones, desertificación de terrenos y aumento en la frecuencia de eventos meteorológicos extremos (www.fao.org).

El CC representa uno de los principales desafíos para enfrentar la alimentación de una creciente población mundial. En este contexto, las plantas se ven afectadas por condiciones ambientales adversas, ya que el aumento de las temperaturas puede afectar el ciclo de los cultivos, procesos metabólicos tales como la fotosíntesis, la respiración, y por último, afectar el rendimiento. Además, las alteraciones en la distribución de la temperatura podrían ser especialmente dañinas durante los períodos reproductivos de los cultivos, lo que induce esterilidad en los gametos, rendimientos más bajos e incluso una falla completa de los cultivos (Teixeira y col., 2013).

En este contexto, las plantas, incluyendo las que son cultivadas comercialmente, poseen mecanismos intrínsecos que las permiten tolerar condiciones climáticas adversas causadas por el CC, como falta de agua, desertificación de los suelos, temperaturas extremas y la alta intensidad lumínica. No obstante, el CC puede generar condiciones ambientales, en donde los mecanismos de respuesta de las plantas no sean suficiente para generar tolerancia o aclimatación, reduciéndose el rendimiento de los cultivos. Lo anterior, ha forzado a los agricultores a adaptarse a nuevos escenarios en donde qué sembrar y cosechar ya no es

solamente dictado por el mercado, sino por cuáles especies o variedades son cultivables en el escenario climático actual.

1.1.2. Estrés abiótico en plantas.

Desde el punto de vista productivo, la brecha entre los rendimientos en los cultivos en condiciones subóptimas (condición de estrés) y los logrados por las plantas sin estrés, se utiliza como una magnitud del indicador de estrés. Particularmente, el estrés abiótico (EA) se define como el efecto de una condición ambiental adversa que limita el crecimiento y la productividad de las plantas, tales como lo son las condiciones de alta salinidad, sequía, heladas, altas temperaturas y exceso de radiación (Boyer, 1982).

1.1.2.1. Mecanismos de resistencia frente a EA.

Las plantas han desarrollado durante la evolución diversos mecanismos para hacer frente a situaciones estresantes (Gepstein y Glick, 2013), denominadas adaptación (que involucran cambios genéticos seguidos de selección durante muchas generaciones, por ejemplo, semillas tolerantes a la desecación, granos de polen, fotosíntesis C4 y CAM) (Minocha y col., 2014). Por otro lado, los mecanismos fisiológicos y moleculares que conducen a la tolerancia al estrés generalmente se limitan a tejidos y órganos particulares (Minocha y col., 2014). Entre los mecanismos que han desarrollado se encuentra la evasión del estrés, la cual incluye una serie de estrategias dirigidas a minimizar los efectos dañinos del estrés en los tejidos (por ejemplo, el cierre estomático para reducir la transpiración y, por lo tanto, los requisitos de agua que previenen una reducción severa en el tejido)(Verslues y col., 2006). Cuando los mecanismos de evasión no son suficientes, se inducen mecanismos de tolerancia al estrés (ej., síntesis de osmolitos compatibles y proteínas protectoras efectoras, cambios en la composición de

metabolitos e inducción de mecanismos de desintoxicación de ROS) (Verslues y col., 2006). Cuando se inducen mecanismos de tolerancia y persisten las condiciones adversas, las plantas alcanzan un "estado estable" fisiológico conocido como aclimatación, en el cual las plantas se vuelven menos sensibles a las condiciones adversas. Es importante tener en cuenta que mientras que la adaptación implica cambios en el genoma de la planta para colonizar un nicho ecológico particular, la aclimatación solo involucra cambios fisiológicos y bioquímicos orquestados a nivel molecular y modulados por hormonas vegetales (Peleg y Blumwald, 2011; Verslues y col., 2006).

1.1.2.2. Estrés abiótico en plantas y perspectivas biotecnológica.

Los efectos del EA sobre el crecimiento de las plantas y la expresión génica son dosis dependiente respecto al estrés, lo que evidencia una maquinaria de ajuste fino que permite detectar el nivel de estrés y responder de manera específica (Claeys y col., 2014). Una respuesta común a las diferentes condiciones de estrés abiótico es la baja de la tasa fotosintética y un aumento de los niveles de radicales libres en el contexto celular (estrés oxidativo), lo que se asocia a varias alteraciones en el metabolismo y el crecimiento de las plantas. Lo anterior generalmente se traduce en una disminución de la sobrevivencia de las plantas, reducción de biomasa, reducción del tamaño de las plantas y disminución del rendimiento de producción de frutos y flores.

En este sentido, el EA se posiciona como la principal causa de daño a cultivos, en donde el problema de la salinidad y sequía son los más severos (Mahajan y Tuteja, 2005). La tolerancia al estrés, un factor importante en el rendimiento de los cultivos, surge como un mecanismo clave a mejorar. Desde esta perspectiva, cultivos de interés agrícola de gran relevancia para la economía exportadora del país, tal como lo es el kiwi (*Actinidia deliciosa*; Sección 1.2.1), reducen su tasa de crecimiento y rendimientos productivos en condiciones de salinidad y sequía (Sección

1.2.3). Por lo cual, a pesar de que las plantas poseen mecanismos para tolerar parcialmente EA (tales como estrés por sequía y salinidad), la incertidumbre del contexto global actual, generado por el CC, fuerza a los agricultores a adaptarse a estas nuevas condiciones. Siendo aquí, donde la investigación científica y el desarrollo de biotecnología debe aportar conocimientos y tecnologías útiles para enfrentar el EA producido por efecto del CC, potenciando el desarrollo de una agricultura sustentable.

1.2. Actinidia deliciosa (Kiwi).

1.2.1. Características e importancia comercial.

Actinidia es un género compuesto por 55 especies y 76 taxones nativos de China, con una amplia distribución geográfica en toda China y el sudeste de Asia (Li y col., 2009). El género Actinidia es normalmente dioico, es decir existen individuos con flores masculinas (flores solo con estambres) y otros con flores femeninas (flores solo con pistilos), pero también se pueden encontrar plantas del género Actinidia con flores perfectas (flores con pistilos y estambres)(Ferguson, 2011). .

La domesticación y el desarrollo de *A. deliciosa* (kiwi de pulpa verde) y más recientemente, de *A. chinensis* (kiwi de pulpa amarilla), ambas a partir de germoplasma silvestre, ha dado lugar a las variedades comerciales cultivadas hoy en día en varios continentes. Las distintas cualidades del kiwi, como el atractivo color, la textura, el sabor y cualidades benéficas para la salud humana hacen del kiwi una fruta aceptable y popular tanto para los consumidores como para los productores (CIREN-CORFO, 1989).

Actualmente, el mercado del kiwi está encabezado por China, con una producción aproximada de 630.000 toneladas anuales, pero de las cuales el 99,8% es consumida internamente (Bravo, 2014). Tras China, la producción y exportación mundial de kiwis está liderada por Italia, con una

participación de 27,2%, seguida por Nueva Zelanda, con 26,6%, Chile se ubica en tercer lugar, con 17% de participación, y lo sigue Grecia, que alcanza una participación de 11% (Bravo, 2014)). Más recientemente, durante el periodo del año 2017, Chile exportó aproximadamente 174.000 toneladas de fruta fresca, lo que equivale a aproximadamente USD\$188 millones, captando alrededor de un 7% del mercado global.

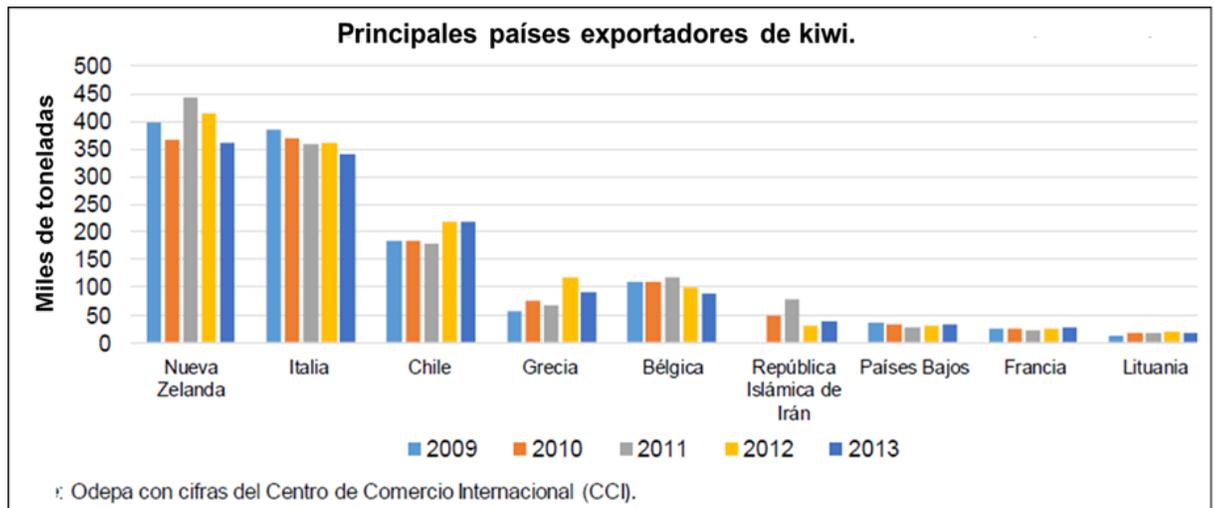


Figura 1. Principales exportadores de kiwi en el mundo en toneladas fruto por año. Chile se ubica como el tercer mayor exportador de kiwi a nivel mundial y representa cerca del 17% de las exportaciones totales en el mundo (Bravo, 2014).

1.2.2. Biotecnología en Actinidia.

Aunque la diversidad genética de Actinidia proporciona un enorme potencial de mejorar el cultivar, hay características incluyendo la naturaleza vigorosa de enredaderas, el periodo juvenil de 3 a 5 años, la naturaleza dioica y la estructura de poliploidía reticulada que hacen de Actinidia menos susceptible al mejoramiento clásico, en comparación con otros cultivos agronómicos. El cultivo de tejidos vegetales, la manipulación *in vitro* de células vegetales, tejidos y órganos, son

metodologías importantes que se han empleado para el mejoramiento de Actinidia (Wang y Gleave, 2012).

Dos décadas y media atrás, desde el primer reporte de plantas transgénicas pertenecientes al género Actinidia, seis especies Actinidia han sido transformadas, la mayoría mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Matsuta y col., 1990). Gran parte de los sistemas de transformación han sido desarrollados para *A. chinensis* y *A. deliciosa*, las dos especies más importantes a nivel comercial (Wang y Gleave, 2012). Todas las especies han reportado una buena respuesta a las condiciones de cultivo *in vitro*, y relativamente susceptibles a protocolos de regeneración (Fraser y col., 1995). También poseen una tasa de transformación relativamente alta (un 27% (Wang y Gleave, 2012)) en comparación a otras especies leñosas, por ejemplo el manzano (James y col., 1989).

1.2.3. Condiciones de cultivo de *A. deliciosa*.

El kiwi (*A. deliciosa*) es sensible a las bajas temperaturas y tolera climas de inviernos suaves y veranos templados y húmedos (Gostincar y Yuste Pérez, 2006). El rango de temperaturas en donde *A. deliciosa* puede crecer adecuadamente es de 13-35°C, siendo la óptima 23-30°C. Por debajo de los 13°C no existe crecimiento (Griffiths, 1994). Temperaturas superiores a 40°C son perjudiciales, sobre todo si se asocian con déficit hídrico, ambiental y edáfico. También le son perjudiciales temperaturas por debajo de 0°C, cuando está en estado vegetativo, estado de crecimiento y desarrollo durante el cual una planta dedica toda su energía para el crecimiento del sistema radicular y el follaje, donde heladas tardías y tempranas afectan a los brotes no lignificados (Covatta y Borscak, 1988).

A pesar de la gran cantidad de información sobre el crecimiento y condiciones de cultivo de las plantas de kiwis, los estudios científicos sobre el grado en que los kiwis pueden tolerar condiciones de salinidad y sequía son pocos. Aun así, se ha comprobado que una conductividad eléctrica de 4-6 mmhos/cm (51mM de NaCl aproximadamente) de salinidad reduce el crecimiento y rendimiento de *A. deliciosa* (Figura 2)(CIREN-CORFO, 1989). También se ha descrito, que dentro de los efectos producidos por estrés salino en el kiwi, se encuentra la disminución del crecimiento vegetativo, acumulación de sales en el tejido vegetal, menor desarrollo del área foliar y un menor rendimiento fotosintético (Chartzoulakis y col., 1995).

Considerando estos antecedentes, es que se vuelve necesaria la generación de variedades de kiwi tolerantes a salinidad y sequía utilizando estrategias de mejoramiento vegetal basados en técnicas de biotecnología moderna, tales como ingeniería genética y metabólica. De este modo, las nuevas variedades podrían proyectarse a ser utilizadas como portainjertos (o patrones) de variedades con características comerciales de interés, pero con baja tolerancia a condiciones de EA.

1.3. Factores de transcripción involucrados en la respuesta a EA.

Los factores de transcripción (FT) son reguladores clave del metabolismo vegetal incluyendo la respuesta al estrés abiótico como el frío, la salinidad, la sequía (Qu y Zhu, 2006; Riechmann y col., 2001). Múltiples FT interactúan con los elementos cis en las regiones promotoras de varios genes inducibles por estrés para regular la expresión de genes inducibles por estrés, los cuales están involucrados en la aclimatación y tolerancia al estrés (Agarwal y col., 2006). Los estudios de la regulación transcripcional en condiciones de sequía y salinidad han revelado la existencia de vías dependientes e independientes de ABA (Yoshida y col., 2014).



Figura 2. Tolerancia a salinidad de distintos frutales. (A) El kiwi se encuentra dentro de los frutales más sensibles a altas concentraciones de sal, siendo su límite de tolerancia cerca de los 6 mmhos/cm (modificado de CIREN-CORFO, 1989). (B) Conductividad eléctrica en soluciones de NaCl a distintas concentraciones.

El sistema de señalización dependiente de ABA induce la familia de FT ABF/AREB (factor de unión a ABA/proteína de unión a elemento de respuesta a ABA) constituida por FT de tipo bZIP que controlan la expresión de genes mediada por ABA en condiciones de estrés abiótico (Fujita y col., 2011; Fujita y col., 2013; Furihata y col., 2006). Algunos de ellos responden a condiciones de EA, por ejemplo, en *Arabidopsis* ABF1 es significativamente inducido por el frío (Kim 2006), mientras que AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 y ABF3 son inducidos por ABA y alta osmolaridad (Yoshida y col., 2014). Por otro lado, se ha reportado que el gen DcAREB3 de *Daucus carota* (zanahoria) es inducido por ABA, y participa en la regulación transcripcional del gen DcPsy2, el cual es un gen clave en la ruta de biosíntesis los precursores metabólicos de ABA (Simpson y col., 2018). Por otro lado, se ha demostrado que el FT MYB2 perteneciente a la familia MYB es un mediador

importante de la expresión de genes mediados por ABA (Stracke y col., 2001). Otros FT de la familia MYB también participan en la expresión génica mediada por ABA, incluido MYB102 (Denekamp y Smeekens, 2003), MYB41 (Cominelli y col., 2008); MYB108 (Mengiste y col., 2003) y MYB44 (Jung y col., 2008; Persak y Pitzschke, 2014).

Por otro lado, AP2/ERF son una gran familia de FT que reconocen los elementos cis DRE (Elementos de respuesta a deshidratación) e inducen la expresión de genes que responden al estrés independientemente de ABA (Lata y Prasad, 2011). Este grupo incluye al FT CBF/DREB1 (factores de unión a elementos de respuesta sensibles a frío/deshidratación 1) cuya expresión es inducida de manera fuerte y transitoria por estrés de baja temperatura (Fowler y col., 2005) y DREB2 (por ejemplo, DREB2A y DREB2B) que son inducidos por sequía, alta salinidad y estrés por calor, pero no por estrés por frío o ABA exógeno (Sakuma y col., 2006a; Sakuma y col., 2006b).

Hay otros FT involucrados en las respuestas de tolerancia al estrés abiótico, como NAC o WRKY (Chen y col., 2012; Nakashima y col., 2012). Los promotores en los genes NAC contienen dominios que responden a ABA (ABRE), JA, SA, sequía (DRE) y baja temperatura, así como sitios de reconocimiento para los FT de MYB y MYC (Puranik y col., 2012). Interesantemente, en *Arabidopsis*, se ha demostrado que factores NAC como ATAF1 regulan la expresión de NCED3 (que codifica para una enzima clave en la ruta de biosíntesis de ABA) y median la acumulación de ABA (Jensen y col., 2013).

1.3.1. Factores de transcripción ALFIN en tolerancia a EA.

La familia de FT tipo-ALFIN, es una familia de FT que solo existe en plantas (Song y col., 2013), estos FT están involucrados en múltiples procesos, como el crecimiento y desarrollo de las raíces, germinación de las semillas, el alargamiento de los pelos radiculares, el desarrollo de meristemas

y la tolerancia frente a condiciones de estrés abiótico (Chandrika y col., 2013; Molitor y col., 2014; Wei y col., 2015; Winicov, 2000). Todos los factores de transcripción ALFIN poseen tres dominios: El dominio conservado N-terminal (DUF3594), el dominio conservado C-terminal PHD-finger (Cys4HisCys3) y el dominio V (Región variable entre los dos dominios conservados)(Wei y col., 2015). El dominio PHD-finger fue descubierto en la proteína HAT3.1 (Histone acetyltransferase 3.1)(Schindler y col., 1993). Con alta similitud al dominio RING-finger (Cys3HisCys4), el dominio PHD-finger también puede unir a dos átomos de zinc y posee una estructura similar (Capili y col., 2001). Esta característica le permite a los PHD-finger unirse a algunos patrones de proteínas nucleares. De hecho, en Arabidopsis proteínas tipo ALFIN se pueden unir a las marcas de histonas activas (H3K4me3/2) vía PHD-finger, pudiendo participar de esta manera en la regulación de la cromatina (Bienz, 2006; Lee y col., 2009). La proteína tipo-ALFIN GmPHD6 de *Glycine max* (Soja) interactúa con ella misma y con las otras cuatro GmPHDs, a excepción de la GmPHD2, en células de levadura. Lo anterior posiblemente a través del dominio N-terminal y el dominio variable más que con el dominio PHD-finger (Wei y col., 2009). En adición a la capacidad de interactuar con otras proteínas, la mayoría de los factores de transcripción ALFIN se pueden unir al elemento cis conservado GNGGTG/GTGGNG a través del dominio N-terminal (Bastola y col., 1998; Tao y col., 2018; Wei y col., 2009; Wei y col., 2015). Excepcionalmente, la proteína codificada por el gen AtAlfin6 de Arabidopsis no es capaz de unirse al elemento cis conservado, esto debido a la pérdida de la capacidad de unirse al ADN debido a la variación de dos aminoácidos en la posición 34 y 35 en el dominio N-terminal (Wei y col., 2015).

El primer factor de transcripción de tipo ALFIN, ALFIN1, fue aislado a partir de alfalfa (*Mendicago sativa*) (Winicov, 1993), y se encontró predominantemente expresado en raíces. Además, tanto los callos como las plantas transgénicas de alfalfa sobrepresoras para el gen Alfin1 fueron

capaces de crecer en presencia de niveles elevados de sal (128mM) (Winicov y Bastola, 1999) y presentaban un aumento en el crecimiento de raíces bajo condiciones normales y de salinidad (Winicov, 2000), mientras que callos que expresan Alfin1 en antisentido demostraron ser más sensibles a tratamientos de salinidad (171 mM de NaCl)(Winicov y Bastola, 1999), indicando que en alfalfa Alfin1 participa en la tolerancia a estrés salino. Recientemente, se identificaron 15 factores de transcripción de tipo ALFIN en *Brassica rapa*, de los cuales 10 mostraron expresarse en respuesta a estrés biótico, mientras que todos respondieron bajo estrés por frío, sequía y sal (Kayum y col., 2015).

En *A. thaliana* se han descrito siete genes tipo-Alfin. Entre ellos, el gen AtAlfin5 presenta una mayor respuesta transcripcional frente a distintas condiciones de estrés abiótico (Wei y col., 2015). Se demostró que plantas de *A. thaliana* mutantes homocigotas para el gen AtAlfin5 presentan una menor tolerancia a estrés salino y sequía, mientras que plantas sobreexpresoras para el gen AtAlfin5 presentaron una mayor tolerancia a dichas condiciones ambientales. Dentro de los efectos generados por AtAlfin5, que producen el aumento de la tolerancia a estrés abiótico, está el ajuste de múltiples procesos tales como la regulación de la expresión de otros factores de transcripción, modificaciones en el metabolismo de aminoácidos, en el transporte de calcio e inhibición de especies reactivas de oxígeno(Wei y col., 2015).

Recientemente, se ha descrito que la expresión heteróloga del gen Alfin1 de *Atriplex hortensis* (AhAlfin1) en *Arabidopsis* aumentó la tasa de sobrevivencia de las plantas bajo condiciones de salinidad, mientras que la expresión de cualquiera de los otros tres genes AhAlfin de *A. hortensis* condujo a una respuesta hipersensible a la sal, lo que indica una divergencia funcional de los genes Alfin en *A. hortensis* (Tao y col., 2018). Además, AhAlfin1 también confiere una mayor tolerancia a la sequía, mostrando una mayor supervivencia, mejor crecimiento y menor pérdida

de agua a plantas sobreexpresoras de AhALFIN1. Análisis adicionales demostraron que la proteína AhALFIN1 puede unirse a las regiones promotoras de los genes GRF7, DREB1C y varios genes del grupo A PP2C, reprimiendo su expresión. De forma correspondiente, los niveles de expresión de los genes reguladores del estrés positivo DREB1A, DREB2A y tres ABF se incrementaron sus niveles de expresión en las plantas que expresan AhALFIN1 (Tao y col., 2018).

1.3.2. Factores de transcripción ALFIN en *Daucus carota*.

D. carota es una planta medianamente tolerante a salinidad (tolera entre 50 y 100mM de NaCl). Se ha reportado que, en tratamientos con salinidad (250mM de NaCl), se inducen genes relacionados a la síntesis de carotenoides como DcPsy2 (Figura 3A)(Simpson y col., 2018). DcPsy2 codifica para la enzima fitoeno sintasa (PSY), la cual es la primera enzima de la ruta de biosíntesis de carotenoides, encargada de condensar dos moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) para producir fitoeno (Figura 3B)(Rosas-Saavedra y Stange, 2016; Ruiz-Sola y Rodriguez-Concepcion, 2012). Además, se ha descrito que la catálisis de fitoeno es un paso clave y limitante en la síntesis de carotenoides (Rosas-Saavedra y Stange, 2016) y de ABA (Li y col., 2008; Ruiz-Sola y col., 2014). Tanto los carotenoides, como ABA participan en la respuesta de tolerancia a estrés abiótico, los primeros como moléculas antioxidantes y precursores metabólicos de ABA, y ABA como hormona que genera una respuesta a nivel fisiológico y transcripcional frente a condiciones de estrés abiótico, activando tanto factores de transcripción de la familia AREB/ABF (Simpson y col., 2018) y de la familia ALFIN (Tao y col., 2018; Wei y col., 2015), como genes pertenecientes a la ruta de biosíntesis de carotenoides (Meier y col., 2011; Ruiz-Sola y col., 2014; Ruiz-Sola y Rodriguez-Concepcion, 2012).

Durante la caracterización y análisis *in silico* del gen DcPsy2, se encontraron elementos de respuesta a ABA en la región promotora de dicho gen, lo cual puede explicar parcialmente la regulación del gen DcPsy2 en plantas sometidas a condiciones de salinidad (Simpson y col., 2018). Interesantemente, también se encontraron múltiples motivos de unión para factores de transcripción de la familia ALFIN en el promotor del gen DcPsy2 (Figura 3C). La búsqueda en transcriptoma de *D. carota* evidenció la presencia de al menos dos putativos genes (llamados DcAfin4 y DcAlfin7) los cuales fueron seleccionados para su estudio y caracterización en cuanto a participación en tolerancia estrés abiótico. Es así que, mediante ensayos de localización subcelular, se determinó que las secuencias DcAlfin4 y DcAlfin7 codifican para proteínas que se encuentran localizadas en el núcleo. También, mediante ensayos de transactivación en levadura, se determinó que estos TF son capaces de activar la transcripción de genes reporteros en levadura, indicando que son funcionales como TF, y se comprobó, mediante ensayos de monohíbrido en levadura, que ambos TF son capaces de unirse al promotor del gen Psy2 de *D. carota* (Simpson, 2015). Además, las secuencias aminoacídicas de los FTs DcALFIN4 y DcALFIN7 poseen un porcentaje de identidad del 69% y 73%, respectivamente, respecto al FT ALFIN1 de *M. sativa* (número de acceso L07291). Resultados sugieren que estos FT podrían estar involucrados en la mediación de señales y la regulación de genes que participen en el crecimiento y el desarrollo de la raíz en *D. carota*, así como mediar la respuesta de tolerancia a EA (Bastola y col., 1998; Chandrika y col., 2013; Winicov, 2000; Winicov y col., 2004).

Considerando estos antecedentes aún queda por determinar la funcionalidad *in planta* de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7, para de este modo poder proyectar su aplicación biotecnológica en plantas de interés comercial y con sensibilidad a condiciones de estrés salino e hídrico, tal como lo es *A. deliciosa*.

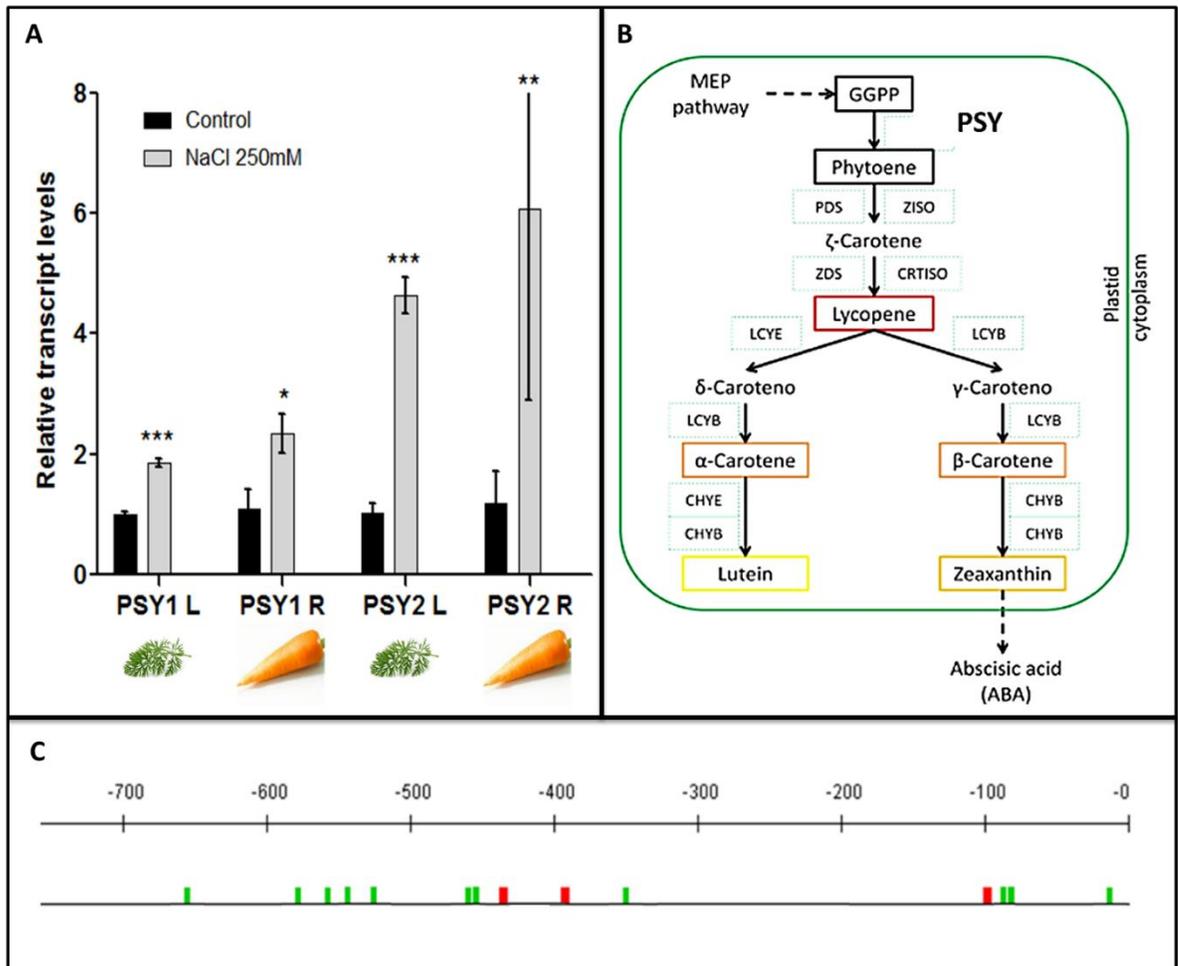


Figura 3. Respuesta del gen DcPsy2 de *D. carota* bajo tratamiento con NaCl. (A) Niveles relativos de transcrito del gen DcPsy1 y DcPsy2 en hojas y raíces de plantas sometidas a tratamiento de NaCl. (B) Esquema de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas. (C) Esquema de la región promotora del gen DcPsy2, en rojo se muestran las regiones con elementos de respuesta a ABA y en verde se muestran motivos de unión a factores de transcripción ALFIN (figura modificada de Simpson 2015).

HIPÓTESIS.

Los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 de *D. carota*, que codifican para los factores de transcripción de la familia ALFIN, se inducen bajo condiciones de estrés salino en *D. carota* y otorgan tolerancia a estrés abiótico (salino e hídrico) al ser expresados de manera heteróloga en plantas de *A. thaliana* y *A. deliciosa*.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la expresión de los transcritos DcAlfin4 y DcAlfin7 bajo condiciones de estrés salino en *D. carota* y determinar, mediante expresión estable en *A. thaliana* y *A. deliciosa*, si éstos confieren tolerancia a condiciones de estrés abiótico (salino e hídrico).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE).

OE1: Determinar si los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 responden a tratamientos de salinidad en plantas de *D. carota*.

OE2: Determinar si la expresión heteróloga y constitutiva de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en plantas de *A. thaliana* confiere un aumento de la tolerancia a condiciones de salinidad y sequía.

OE3: Determinar si la expresión heteróloga y constitutiva de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en plantas de *A. deliciosa* disminuye la producción de radicales libres frente a condiciones de estrés salino.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron escogidas de acuerdo con los estándares de calidad necesarios. Estos productos fueron obtenidos de empresas y marcas registradas como Invitrogen, Agilent Technologies, Thermo Fisher Scientific, Promega, Axygen, New England Biolabs, Biorad, Merck, US Biological, MO BIO Laboratories Inc. y Sigma-Aldrich.

2.2. Cultivo de cepas bacterianas.

Se utilizaron células de *Escherichia coli* DH5 α , de genotipo F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 y células de *Agrobacterium tumefaciens* de genotipo GV3101: C58, plásmido Ti , GenR, RifR, respectivamente.

Los cultivos de *E. coli* en medio líquido se realizaron mediante la inoculación de células de *E. coli* de una alícuota stock en LB líquido (Tryptona 2% p/v, NaCl 0.8% p/v, Extracto de levadura 0.5% p/v) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, de acuerdo a la resistencia que portaban los vectores usados para transformar las células. El cultivo se mantuvo durante 12 horas a 37 °C en agitación. Los cultivos en medio sólido de *E. coli* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido (medio LB líquido con Agar-agar 1,6%) suplementando con el antibiótico de selección adecuado, y las placas fueron incubadas durante 16 horas a 37 °C.

Los cultivos líquidos de *A. tumefaciens* se realizaron mediante la inoculación de células de *A. tumefaciens* provenientes de la alícuota stock en medio LB líquido suplementado con rifampicina 20 mg/L, gentamicina 50 mg/L y el antibiótico de selección correspondiente al plásmido de interés. El cultivo líquido se mantuvo a 28 °C por 16 horas en agitación. Del mismo modo, los cultivos en medio sólido de *A. tumefaciens* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido

suplementado con los antibióticos mencionados, y las placas fueron incubadas durante 48 horas a 28 °C.

Tanto para los cultivos de *E. coli* como para las de *A. tumefaciens*, el almacenamiento de alícuotas a partir de los cultivos líquidos se realizó en una mezcla de 500 µL del cultivo con 300 µL de glicerol 80% estéril, y las alícuotas fueron guardadas a -80 °C.

2.3. Preparación de células de *A. tumefaciens* quimiocompetente.

Para la obtención de células de *A. tumefaciens* quimiocompetentes se inocularon 200 µL de una alícuota de *A. tumefaciens* GV3101 en 5 mL de LB líquido suplementado con rifampicina 10 mg/L y gentamicina 50 mg/L, y se incubó a 28 °C en agitación durante 16 horas. Posteriormente, se inocularon 4 mL del cultivo anterior en 100 mL de LB líquido suplementado con la misma concentración de antibióticos y se incubó a 28 °C en agitación hasta alcanzar una D.O.(600nm) de 0.5. El cultivo se incubó 10 minutos en hielo, y se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 3000 g. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado de células se resuspendió suavemente en 1 mL de una solución estéril y fría de CaCl₂ 20 mM. Las células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* fueron almacenadas en alícuotas de 100 uL a -80°C.

2.4. Transformación de células bacterianas quimiocompetentes.

2.4.1. Vectores utilizados.

En el laboratorio se cuenta con las construcciones pK7RWG2 (pK7, vector vacío), pK7RWG2/DcAlfin4 (pKAlfin4) y pK7RWG2/DcAlfin7 (pKAlfin7) en células de *E. coli* DH5α. Dichas construcciones fueron generadas y verificadas mediante ensayos de restricción y secuenciación en un trabajo previo (Simpson, 2015). En esta tesis se procedió a generar un stock dichos vectores

y a transformar con ellos *A. tumefaciens* para de este modo proceder con la transformación de plantas.

2.4.2. Transformación de *A. tumefaciens* quimiocompetentes.

Para la transformación de *A. tumefaciens*, se descongeló en hielo una alícuota de *A. tumefaciens* quimiocompetente (Sección 2.3) y se mezcló con 250-500 ng de ADN plasmidial de los vectores pK7, pKAlfin4 y pKAlfin7. La alícuota fue sumergida en nitrógeno líquido durante 5 minutos y luego se descongeló a temperatura ambiente por 15 minutos. Se adicionó 1 mL de LB líquido y las células se incubaron a 28 °C por 16 horas. Las células fueron sembradas en placas Petri con medio LB sólido suplementado con rifampicina 10 mg/L, gentamicina 100 mg/L y el antibiótico de selección del vector incorporado y las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas.

2.5. Esterilización de semillas mediante gas Clorín.

Se colocaron las semillas de *Arabidopsis thaliana* en tubos eppendorf de 1,5 o 2 mL. Se colocaron los tubos abiertos con las semillas en una gradilla dentro de un sistema que permita un sellado hermético. Dentro, también se colocó un vaso precipitado de 250 ml con 100 ml de cloro comercial (hipoclorito de sodio). Inmediatamente antes de sellar la cámara, se agregó cuidadosamente 2 ml de HCl concentrado (32% v/v) al vaso precipitado. Se dejó esterilizando por los vapores producidos (Reacción química en el vaso precipitado: $\text{NaClO} + 2\text{HCl} \rightarrow \text{Cl}_2 + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$) por 16 horas. Luego se abrió el recipiente hermético en la campana de flujo laminar estéril y se ventilaron las semillas por aproximadamente 30 minutos en la cámara de flujo en condiciones estériles.

2.6. Generación de líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresen los genes *DcAlfin4* y *DcAlfin7*.

2.6.1. Transformación de *A. thaliana* con las construcciones pKAlfin4 y pKAlfin7.

Se transformaron *A. thaliana* del ecotipo Col-0 mediante inmersión floral con *A. tumefaciens* con los vectores pK7RWG2/DcAlfin4 (pKAlfin4), pK7RWG2/DcAlfin7 (pKAlfin7) y pK7RWG2 (pK7, vector vacío) (Sección 2.4) utilizando el protocolo de Zhang y col. 2006 modificado (Zhang y col., 2006). Para ello, se tomaron plantas de *Arabidopsis* de 3-4 semanas de edad y crecidas en fotoperiodo corto (12 horas luz / 12 horas oscuridad; fotoperiodo de crecimiento vegetativo) y se pasaron a fotoperiodo largo (16 horas luz / 8 horas oscuridad; fotoperiodo de floración). Se dejaron crecer en fotoperiodo largo hasta obtener plantas con 20 a 30 inflorescencias. Si la planta presentó algunas silículas, éstas se removieron antes de proceder con la transformación.

Para llevar a cabo la transformación, se dejaron creciendo 500mL de *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 transformados con los vectores pK7, pKAlfin4 y pKAlfin7. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 4000g por 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y al pellet se le adicionó un volumen de solución de sacarosa 5% (preparada en el momento y estéril) y se disolvió el pellet con agitación suave. Una vez resuspendidas las células, se agregó Silwet L-77 a una concentración de 0,02% (vol/vol; 100mL por 500 mL de solución) y se agitó inmediatamente.

Una vez lista la solución de transformación con *A. tumefaciens*, se invirtieron las plantas y se sumergió la parte aérea en la suspensión de células de *Agrobacterium* durante 15 segundos con agitación suave. No solo se debe sumergir las inflorescencias, sino también la roseta, para remojar las inflorescencias axilares más cortas. Posteriormente, se retiraron las plantas y se dejó

drenar el exceso de agua por 5 segundos. Una película de recubrimiento líquido en las plantas debería ser visible. Luego, se cubrieron las plantas con una cubierta de plástico y se dejaron recostadas y en oscuridad por 16-24 horas. Transcurrido el tiempo, se retiró la cubierta plástica de las plantas y se transfirieron al invernadero. Se dejaron crecer las plantas por aproximadamente 1 mes y luego se cosecharon y recolectaron las semillas de las plantas transformantes.

2.6.2. Selección de líneas transgénicas y T3 homocigotas de *A. thaliana*.

Las semillas T1 de *A. thaliana* provenientes de las líneas T0 transformadas mediante inmersión floral con *A. tumefaciens* (Sección 2.6.1) fueron esterilizadas con gas clorin (Sección 2.5) y posteriormente sembradas en placas de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 0,5% (p/v) suplementados con 10 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 7 g/L de agar, pH ajustado a 5,8 y con el agente de selección kanamicina a una concentración de 100mg/L (vectores pK7 confiere resistencia a kanamicina en plantas). Para ello, se sembraron 10 placas por construcción, cada una con aproximadamente 100 semillas cada una. Después de 2 semanas se seleccionaron las plántulas sobrevivientes al agente de selección, se dejaron crecer por dos semanas *in vitro*, se transfirieron al invernadero y se verificó mediante PCR si poseían el inserto de interés (Sección 2.11.1).

Posteriormente, una vez seleccionadas las líneas transgénicas mediante PCR, se procedió a seleccionar las líneas homocigotas. Para ello, se recolectaron las semillas de las líneas transgénicas T1 y se germinaron en placas de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 0,5% (p/v) suplementados con 10 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 7 g/L de agar, pH ajustado a 5,8 y con el agente de selección kanamicina a una concentración de 100mg/L. Se tomaron 12 plantas T2 resistentes al antibiótico (por línea transgénica T1) y se dejaron crecer en el invernadero hasta

la producción de semillas T3. Por probabilidades, 1 de cada 3 plantas T2 que sobrevive al agente de selección debería ser homocigota. Dicha situación se verificó mediante la recolección y germinación de las semillas producidas por las líneas T2 (semillas que darán origen a las plantas T3). En las placas donde la sobrevivencia es de un 100% de las plantas germinadas, es debido a que la línea de la cual provienen las semillas, es homocigota (Figura 4). Cabe destacar, que en algunos casos para poder generar líneas homocigotas se debió seguir segregando las semillas hasta la generación T4.

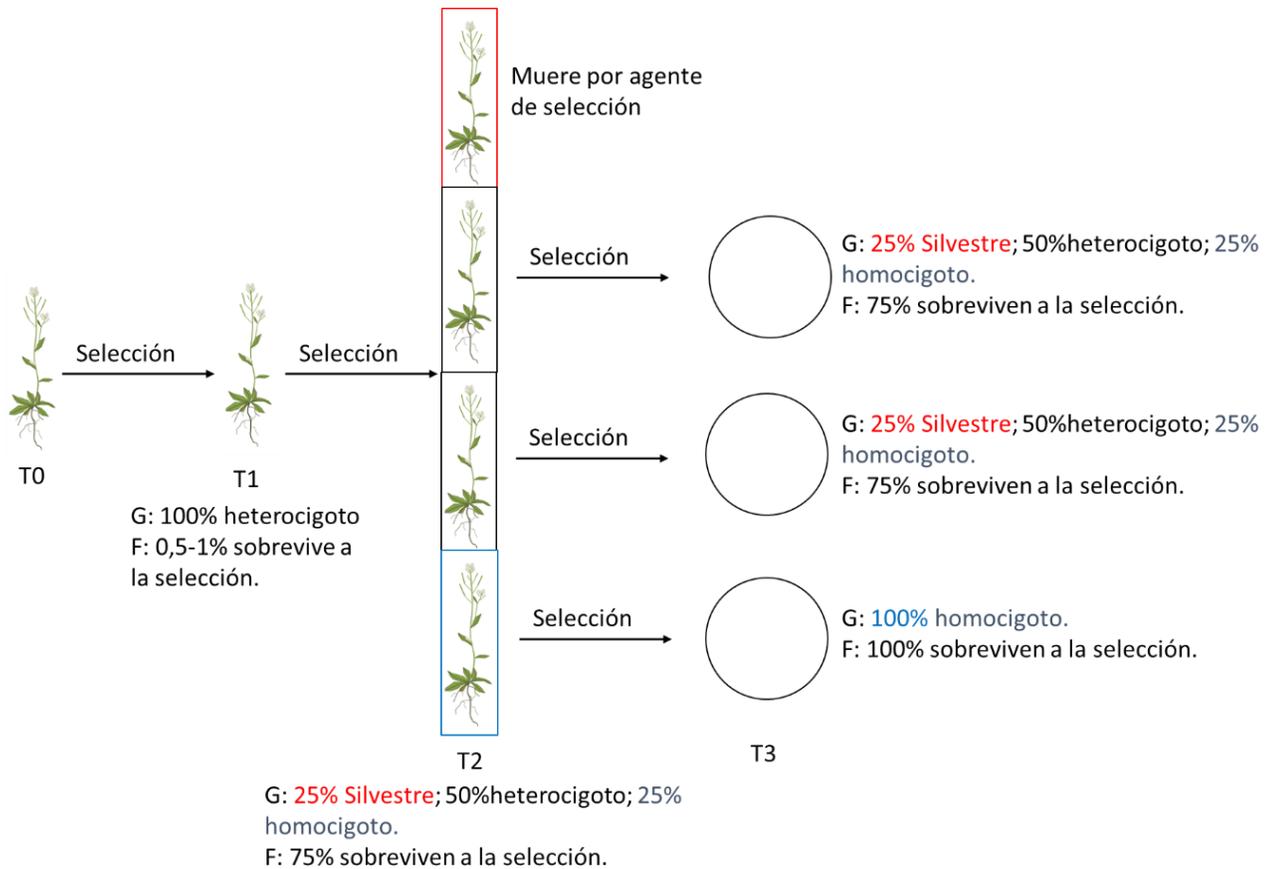


Figura 4. Esquema de selección de líneas transgénicas homocigotas en *A. thaliana*. El esquema muestra como a partir de la tercera generación post transformación (T3) se puede comenzar a seleccionar líneas transgénicas homocigotas.

2.7. Tratamiento con NaCl en plantas de *D. carota*.

Plantas de *D. carota* de 8 semanas de edad fueron sumergidas en solución salina 200mM NaCl por 2, 4, 6, 8 horas. Al finalizar cada tratamiento, se recolectó tejido de la parte aérea (hojas) y de la raíz de zanahoria. El experimento se llevó a cabo en duplicado para cada tiempo de muestreo, y las muestras se tomaron en triplicados para cada condición. Posteriormente, se extrajo ARN total (Sección 2.10.2.1) y se sintetizó el ADNc (Sección 2.10.2.2 y Sección 2.10.2.3) para medir los niveles relativos de transcrito de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Sección 2.11.3) en las condiciones de tratamiento.

2.8. Ensayos de tolerancia a salinidad y sequía en plantas de *A. thaliana*.

Plantas de *A. thaliana*, de generación T3 o T4 homocigotas (Sección 2.6.2) de 14 días de edad germinadas *in vitro*, se traspasaron a maceteros y se dejaron en aclimatación en el invernadero por 2 semanas (16 horas luz / 8 horas oscuridad) con constante riego con medio hidropónico (KNO₃ 0,125 mM, Ca(NO₃)₂*4H₂O 0,15 mM, MgSO₄*7H₂O 0,075 mM, KH₂PO₄ 0,05 mM, KCl 5 uM, H₃BO₃ 5 uM, MnSO₄ 1 uM, ZnSO₄*7H₂O 200 nM, CuSO₄ 150 nM, Na₂O₃Si 10 uM, Fe/DTPA 10 uM, pH 6). Una vez transcurrido dicho tiempo, se procedió a los tratamientos de estrés. Para mantener condiciones de suelo iniciales homogéneas, todos los tratamientos se realizaron utilizando el sustrato comercial Light Mix BioBizz® (Composición: Turba rubia, turba negra, turba fibrosa y perlita; PH: 5,5-6,9).

En el caso del tratamiento por sequía, se cesó el riego por 14 días y luego se recuperaron las plantas (riego normal) por 14 días más (Figura 5). En el caso del tratamiento por salinidad, los maceteros fueron regados por 14 días con medio hidropónico suplementado con 200mM NaCl.

Una vez transcurrido dicho periodo de tiempo, las plantas pasaron a la etapa de recuperación con riego normal (medio hidropónico sin NaCl) por 14 días más (Figura 5).

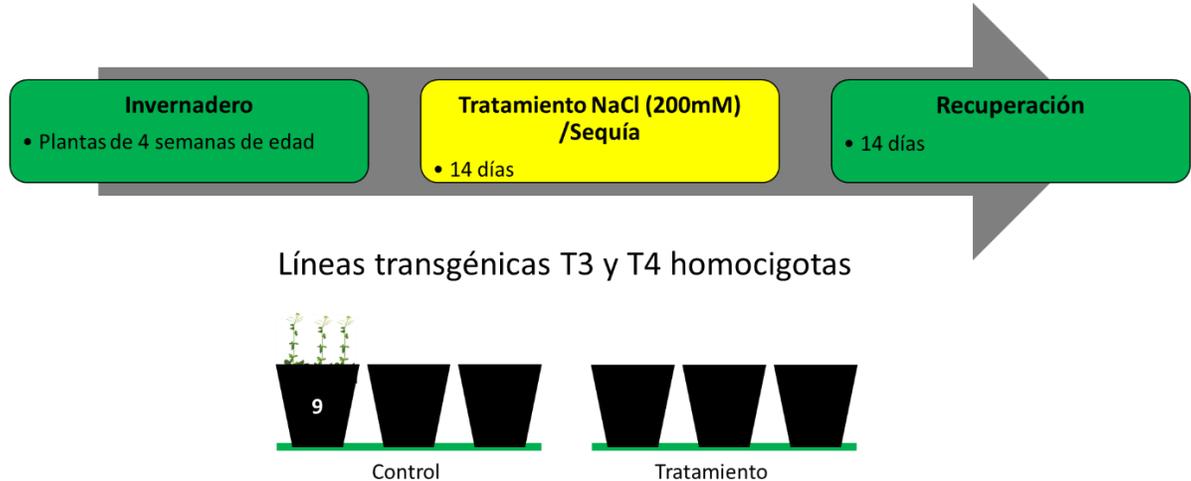


Figura 5. Esquema de los tratamientos de salinidad y sequía en plantas de *A. thaliana*. Para los tratamientos de estrés por salinidad y sequía se realizaron 3 réplicas técnicas, cada una con un número de 9 plantas T3 o T4 por cada línea de *A. thaliana* analizada.

Finalizados los tratamientos de salinidad y sequía, se procedió a cuantificar el largo de la parte aérea de las plantas, el peso seco, peso fresco y reducción de biomasa (Wei y col., 2015). Lo anterior en conjunto a un registro fotográfico para comparación visual de los fenotipos.

2.9. Generación de líneas transgénicas de *A. deliciosa* que expresen los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

2.9.1. Regeneración *in vitro* de plantas transformantes de *A. deliciosa* mediante organogénesis somática.

Plantas de *A. deliciosa* (kiwi) de la variedad Hayward *in vitro* fueron crecidas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido (medio MS con vitaminas 0,44%, sacarosa 2%, myo-inositol

0,01%, Agar-agar 0,7%, pH 5,8) suplementado con BAP 0,5mg. cultivo a 22°C y expuestas a 16 h luz hasta las tres semanas, momento en que fueron utilizadas para la transformación.

Los explantes (hojas de plantas de kiwi *in vitro*) fueron depositados en placas Petri con medio I (La composición del medio I y la de los siguientes medios se detallan en la Tabla I). Estas placas se mantuvieron de 4-6 semanas en condiciones de fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a 24°C. Posteriormente, los explantes fueron transferidos a placas Petri con medio II, en donde se mantuvieron por 2-4 meses bajo fotoperiodo 16 horas luz y en constante reposición de medio de cultivo, hasta la aparición de brotes. Luego, los callos con brotes fueron transferidos a placas Petri con medio III por 4 semanas, favoreciendo la elongación de los brotes, facilitándose así su individualización y multiplicación. Luego, los brotes se dejaron en medio IV hasta la aparición de raíces. Estas plántulas fueron transferidas a maceteros que contenían una mezcla de tierra de hojas, vermiculita y turba (1:1:1) y cultivadas en un invernadero a 22°C bajo fotoperiodo de 16 h luz. Debido a que las plántulas en condiciones de cultivo *in vitro* se encontraban en un ambiente con alta humedad, al ser transferidas a tierra se cubrieron con frascos transparentes durante un mes para mantener las condiciones de humedad. Los frascos se retiraron lentamente para aclimatar a las plántulas a la baja humedad del invernadero. Las plantas fueron regadas 2 veces por semana con medio Hidropónico (KNO₃ 0,125 mM, Ca(NO₃)₂*4H₂O 0,15 mM, MgSO₄*7H₂O 0,075 mM, KH₂PO₄ 0,05 mM, KCl 5 uM, H₃BO₃ 5 uM, MnSO₄ 1 uM, ZnSO₄*7H₂O 200 nM, CuSO₄ 150 nM, Na₂O₃Si 10 uM, Fe/DTPA 10 uM, pH 6).

Tabla I. Medios utilizados para la regeneración in vitro de plantas de *A. deliciosa* mediante el proceso de organogénesis somática.

	2,4-D	NAA	BAP	IBA	Función
Medio I	1mg/L	-	0,5 mg/L	-	Inducción de callo.
Medio II	-	-	5mg/L	-	Proliferación de callo e inducción de brotes.
Medio III	-	-	0,5mg/L	-	Elongación de brotes y multiplicación de plántulas.
Medio IV	-	-	-	0,5mg/L	Enraizamiento de plántulas.

2.9.2. Transformación de *A. deliciosa* con las construcciones pKAlfin4, pKAlfin7 y pK7.

Se dejó creciendo *A. tumefaciens* de la cepa GV3101, transformada con los vectores pK7Alfin4, pKAlfin7 o pK7, en 30 mL de medio LB líquido con 100 mg/L del antibiótico Kanamicina, 50 mg/L de Gentamicina y 10 mg/L de Rifampicina, durante toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 28°C. Pasadas las 16 horas se procedió a centrifugar los cultivos a 8000g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 30 mL de medio MS suplementado con 20 g/L de sacarosa, 100mg/L de mioinositol y acetociringona 1 mM. Posteriormente, se dejó creciendo a 28°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,6 -0,8 a los 600nm.

A continuación, distintos explantes provenientes de hoja y peciolo de aproximadamente 1cm cultivados *in vitro* (Sección 2.9.1) se sumergieron e incubaron en la solución con *A. tumefaciens* por 30 minutos mientras se le hacían heridas al tejido con un bisturí. Una vez transcurrido el tiempo, los explantes se secaron con papel estéril y se dejaron en placas de Petri con medio MS

sólido (medio MS con vitaminas 0,44 %, sacarosa 2%, mioinositol 0,01%, pH 5,8) en total oscuridad a 25 ± 2 °C por aproximadamente 48 horas. Luego, se lavaron los explantes 3-5 veces en agua destilada estéril, se secaron en papel absorbente estéril, y se dejaron en el medio I del proceso de organogénesis somática (sección 2.9.1) hasta la regeneración de brotes transformantes.

2.10. Extracción de ácidos nucleicos.

2.10.1. Extracción de ADN.

2.10.1.1. Extracción de ADN genómico a partir de hojas de *A. thaliana*.

La extracción de ADN genómico a partir de hojas de *A. thaliana* se realizó utilizando el protocolo descrito por Doyle y Doyle modificado y simplificado (Doyle y Doyle, 1990). Se utilizaron aproximadamente 50 mg de hojas de Arabidopsis, los cuales fueron molidos en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se adicionaron 2 mL del búffer CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, PVP40 1% y Tris 100 mM pH 8) previamente calentado a 60°C, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó a un tubo Eppendorf de 2 mL. El homogenizado se incubó durante 15 min a 60°C con agitación cada 5 min. Se agregó un volumen de una solución fría de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex brevemente y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo limpio y se precipitó con un volumen de isopropanol frío durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, y el precipitado se lavó con etanol 75%. Luego de centrifugar a 10000 g durante 5 min, el ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 uL de agua libre de nucleasas.

2.10.1.2. Extracción de ADN genómico a partir de hojas de *A. deliciosa*.

La extracción de ADN genómico a partir de hojas de *A. deliciosa* se realizó utilizando un protocolo descrito por Doyle y Doyle con modificaciones (Doyle y Doyle, 1990). Se utilizaron aproximadamente 100 mg de hojas de kiwi, los cuales fueron molidos en presencia de nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y enfriados. Se adicionaron 2 mL del búffer CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 2 M, EDTA 20 mM, PVP40 1% y Tris 100 mM pH 8) previamente calentado a 60°C, se homogenizó con el tejido vegetal y se traspasó a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se adicionaron 5 uL de β -mercaptoetanol y el homogenizado se incubó durante 15 min a 60°C con agitación cada 5 min. Se agregó un volumen de una solución fría de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex brevemente y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo limpio y se agregó un volumen de una solución fría de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló en vortex brevemente y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se traspasó a un tubo limpio y se precipitó con un volumen de isopropanol frío durante 30 min a -20°C. Se centrifugó a 10.000 g durante 10 min, y el precipitado se lavó con etanol 75%. Luego de centrifugar a 10000 g durante 5 min, el ADN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 uL de agua libre de nucleasas. Si el ADN extraído no tenía la calidad requerida, se trató con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcló en vortex por 15 s y se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. El sobrenadante se rescató en otro tubo y se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se mezcló en vortex por 15 s y se centrifugó a 10.000 g durante 5 min. Nuevamente, se rescató la fase superior en otro tubo y se agregó un volumen de isopropanol frío. Se homogenizó durante 10 s y se incubó a -20°C durante 20 min para precipitar el ADN. Se centrifugó a 10.000 g por 10 min, se lavó con 200 uL de etanol 70% frío y se centrifugó

nuevamente durante 3 min. Finalmente, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas.

2.10.2. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.

2.10.2.1. Extracción de ARN total a partir de tejido vegetal de *A. deliciosa*, *A.*

***thaliana* y *D.carota*.**

Para la extracción de ARN total a partir de tejido vegetal, se modificó el protocolo descrito por Meisel y col. (2005)(Meisel y col., 2005). Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido vegetal. Éste se maceró en un mortero estéril en presencia de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Una vez obtenido, se procedió a verter en el mortero 1 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, PVP40 (PM. 40.000) 2%, EDTA 25 mM, NaCl 2 M, TrisHCl 100 mM (pH 8.0), Trihidroclorato de espermidina 0.05 % y β -mercaptoetanol 2% (agregado justo antes de su uso)), previamente calentado a 65°C en un baño termoregulado. Rápidamente se transfirió la mezcla a un tubo de 2 mL y se mezcló brevemente en un Vortex. Posteriormente, la mezcla se incubó a 65°C durante 15 min. Durante este período se agitó vigorosamente la muestra cada 5 min para evitar la separación del tejido y el buffer de extracción. Transcurrido este tiempo, se agregó 1 volumen equivalente de solución cloroformo: alcohol isoamílico frío (24:1) y se agitó vigorosamente la mezcla durante 1 min. Luego, se centrifugó a 12.000 g durante 30 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante acuoso a un tubo nuevo. A la fase acuosa obtenida se le agregó nuevamente un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico frío (24:1) y se repitió el paso anterior. Luego, la fase acuosa recuperada se precipitó con 1 volumen de LiCl 10 M durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo la mezcla se centrifugó a 12.000 g durante 40 min a 4°C para obtener el ARN en forma de precipitado. Luego, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se suspendió

en 500 μ L de agua nanopura tratada con DEPC. Esta mezcla fue transferida a un tubo de 2 mL, se agregó a la solución 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamilico frio (24:1) y se agitó vigorosamente durante 1 min, para luego centrifugar la muestra a 14.000 g durante 10 min a 4°C. De esta mezcla, se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 mL de etanol 100% frio. Esta mezcla se incubó a -20°C durante 1 h y luego se centrifugó a 14.000 g durante 20 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó secando a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 25 μ L agua libre de nucleasas y se almacenó a -80°C hasta su uso.

2.10.2.2. Cuantificación y Análisis de la calidad del ARN Total.

Para evaluar la integridad del ARN total (Sección 2.10.2.1) se realizó una electroforesis en un gel de agarosa 1% (p/v). Para evaluar la calidad y cantidad de ARN total, se utilizó el equipo EPOCH 2 (Biotek®). La presencia de contaminantes se determinó mediante el cálculo de los cocientes de absorción A260/A280 (evaluación de la contaminación por proteínas en la mezcla) y A260/A230 (evaluación de la contaminación por polisacáridos y polifenoles). Se consideró que, para una muestra de ARN total de óptima calidad para futuros estudios moleculares, ambos cocientes deberían ser cercanos a 2.

2.10.2.3. Síntesis del ADNc.

2.10.2.3.1. Tratamiento del RNA total con DNasa I.

Las muestras de ARN total cuantificadas, y analizadas su integridad y grado de pureza (Sección 2.10.2.2) se trataron con DNasa I previo a realizar la técnica de RT-PCR, de manera de eliminar la posible contaminación con ADN genómico. Para eso, se trataron 3 μ g de ARN total con 50 U de DNasa I (Fermentas), 1 μ L de inhibidor de RNasa (Fermentas) y 2 μ L de buffer de DNasa/MgCl₂ 10X (Fermentas). Esto se realizó en un volumen total de 20 μ L utilizando agua DEPC para

completar ese volumen cuando fue necesario. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 40 minutos en un baño termorregulado. Transcurrido ese tiempo, se transfirió rápidamente a hielo y se agregó 1 µL EDTA (50 mM) y se inactivó la reacción por 15 min a 70°C.

2.10.2.3.2. Síntesis de ADNc mediante RT-PCR.

Para la síntesis del ADNc se utilizó el sistema ImProm-II Reverse Transcription (Promega). Se tomaron 9.5 µL de ARN total tratado con DNasa I (Sección 2.10.2.3.1) y se mezclaron en un tubo de 0.6 mL con 1,5 µL del partidor Oligo-AP (Anexo 1). Cada muestra se incubó 5 min a 70°C. Transcurrido este tiempo el programa se detuvo, los tubos se mantuvieron en hielo y se agregó 4 µL de agua DEPC y 1.5 µL de la enzima de transcriptasa reversa ImProm-II a la mezcla de transcripción reversa (5 µL de buffer ImProm-II 5X, 1 µL de inhibidor de RNasa (Fermentas), 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 1.5 µL de dNTPs 10 µM,) completando un volumen total de 25 µL. Luego, se colocaron nuevamente los tubos en el termociclador y se continuó el programa de RT-PCR. Finalmente, se obtuvieron 25 µL de cada cDNA que fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

2.11. PCR y qRT-PCR.

2.11.1. PCR Convencional utilizando ADNg o ADNc como molde.

Para confirmar la integridad del ADNg (Sección 2.10.1) o ADNc obtenido (Sección 2.10.2) se amplificó mediante PCR un fragmento del gen RNA ribosomal 18S (partidores en Anexo 1). En el caso del ADNc, se utilizó ARN total tratado con DNasa I como control para verificar la ausencia de ADN genómico contaminante en el ADNc. Esto se llevó a cabo para cada una de las muestras de ADNc analizadas.

Todas las reacciones de PCR llevadas a cabo en este trabajo se realizaron en un volumen total de 25 µL en agua libre de nucleasas e incluyendo 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2.5 µL del

buffer de la Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 0.5 μ L dNTPs (10 mM), 0.5 μ L de los partidores sentido y antisentido correspondiente a cada gen (10 μ M) y 1 μ L de ADNg o ADNc como molde. Además, se agregó a cada reacción de PCR un control negativo (carente de molde) y un control positivo según el ensayo. Los programas utilizados en esta ocasión se muestran en el Anexo 2.

2.11.2. PCR de colonias bacterianas.

Para determinar de forma preliminar si las colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores de interés portaban realmente el inserto, se realizaron reacciones de PCR directamente a las colonias crecidas en placas de Petri luego de la transformación. Para esto, se picó la colonia con un mondadientes estéril y se resuspendió en un Eppendorf de 0,2 mL que contenía 25 μ L de la misma reacción utilizada para realizar un PCR convencional (Sección 2.11.1). Además, se picó nuevamente la misma colonia y se rayó en una placa Petri con medio LB suplementado con el antibiótico adecuado para propagar la colonia. Finalmente, los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa mediante electroforesis (Sección 2.12). las colonias positivas fueron seleccionadas para posteriores estudios.

2.11.3. qRT-PCR.

Para cuantificar los niveles de relativos de transcrito de los genes de interés se realizó un RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) utilizando la sonda fluorescente SYBR green. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (Stratagene) y se utilizó el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene). Cada reacción de qRT-PCR contenía 10 μ L de Master Mix, la cual contiene Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y la sonda SYBR green, 0,6 μ L del partidador reverso, 0,6 μ L del partidador directo, 0,3 μ L de una dilución 1:500 de la sonda ROX, 1 μ L de ADNc y 7,5 μ L para completar 20 μ L de reacción. El programa utilizado para la

realización del qRT-PCR se detalla en el Anexo 2, el cual fue el mismo para cada par de partidores utilizado. Cada reacción se realizó por duplicado técnico.

Luego, de cada programa de amplificación se realizó una curva de disociación, la cual permite determinar la especificidad de la reacción. La curva de disociación consiste en la medición de la fluorescencia durante toda la denaturación y la renaturación del producto de PCR, en donde la presencia de una sola señal da cuenta de una reacción específica.

Todas las cuantificaciones de los niveles de expresión realizadas en este trabajo fueron relativizadas a un control (calibrador). Además, para descartar posibles diferencias debido a la cantidad o calidad de ADNc presente en las muestras, los datos fueron normalizados con los niveles de expresión de genes *housekeeping*, los cuales poseen expresión constante en las plantas. Los genes y la secuencia de partidores utilizados, se muestran en el Anexo 1.

Para determinar la expresión relativa de cada gen se utilizó la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$\text{Expresión Relativa} = \frac{(E_{\text{gen objetivo}}) * e^{-(Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{calibrador gen objetivo}})}}{(E_{\text{gen normalizador}}) * e^{-(Ct_{\text{normalizador}} - Ct_{\text{calibrador}})}}$$

2.12. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Todos los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa de concentración 1% a 1.5% según el tamaño esperado de la banda a visualizar. Como marcador de tamaño de banda en pares de bases (pb) se utilizó Gene Ruler 1Kb o 100pb (Fermentas). Estos geles fueron preparados utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) como disolvente de la agarosa. Al momento de cargar las muestras en el gel estas se mezclaron con buffer de carga (Azul de

bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol 80%) en una proporción 5:1. Posteriormente, se realizó la electroforesis utilizando una diferencia de potencial entre 90V y 110V durante 50 a 60 minutos dependiendo del tamaño de banda esperado. Luego, se tiñeron los geles durante 15 minutos en una solución de bromuro de Etidio, fueron visualizados con un transiluminador UV (GeneGenius Classic de SynGene) y fotografiados utilizando el software GenSnap.

2.13. Cuantificación de clorofilas y carotenoides totales.

2.13.1. Extracción de pigmentos.

Para extraer los pigmentos a partir de tejido vegetal de *A. thaliana* y *A. deliciosa*, se recolectaron 100 mg del tejido vegetal y se maceró en presencia de nitrógeno líquido en un mortero previamente esterilizado y enfriado. Se agregaron 4 mL de una solución de hexano:acetona:etanol (2:1:1) y se homogenizó con el tejido. El homogenizado se traspasó a un tubo Falcon de 15 mL, se agitó en vortex por 2 min y luego se mantuvo en hielo durante otros 2 min. Se centrifugó a 10000 g durante 10 min a 4°C, y los carotenoides se recuperaron de la fase superior y se traspasaron a un Eppendorf de 2 mL. Durante todo el proceso de extracción de carotenoides el homogenizado y el extracto se mantuvieron en hielo y en oscuridad para evitar la degradación de los carotenoides. Finalmente, la solución que contenía los pigmentos fue secada con nitrógeno gaseoso y almacenada a -80°C.

2.13.2. Cuantificación de pigmentos.

Para cuantificar la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales presentes, los extractos de pigmentos (sección 2.13.1) fueron resuspendidos en 2 mL de acetona y se midió la absorbancia de las muestras a 750, 662, 645 y 470 nm en cubetas de cuarzo utilizando un espectrofotómetro (Jenway 6300). La medición de absorbancia a 662, 645 y 470 nm permite

determinar la concentración de clorofila a, clorofila b y carotenoides totales, respectivamente, como se observa en la Figura 6. Además, debido a que la medición de muestras turbias puede provocar la subestimación de la concentración de los pigmentos presentes, la medición de absorbancia a 750 nm permite determinar la turbidez de la muestra, la que es cero cuando un extracto es totalmente transparente ya que la clorofila a, clorofila b y los carotenoides no absorben en esta región.

Con las mediciones de absorbancia, la concentración de clorofila a (Ca), clorofila b (Cb) y carotenoides totales (Ct) se determinó mediante las ecuaciones descritas por Lichtenthaler y Buschmann (Lichtenthaler y Buschmann, 2001), en donde la concentración de los pigmentos queda expresada como ug/mL de extracto.

$$Ca \left(\frac{ug}{mL} \right) = 11,24 * A_{662} - 2,04 * A_{645} \quad (1)$$

$$Cb \left(\frac{ug}{mL} \right) = 20,13 * A_{645} - 4,19 * A_{662} \quad (2)$$

$$Ct(ug/mL) = (1000 * A_{470} - 1,9 * Ca - 63,14 * Cb)/214 \quad (3)$$

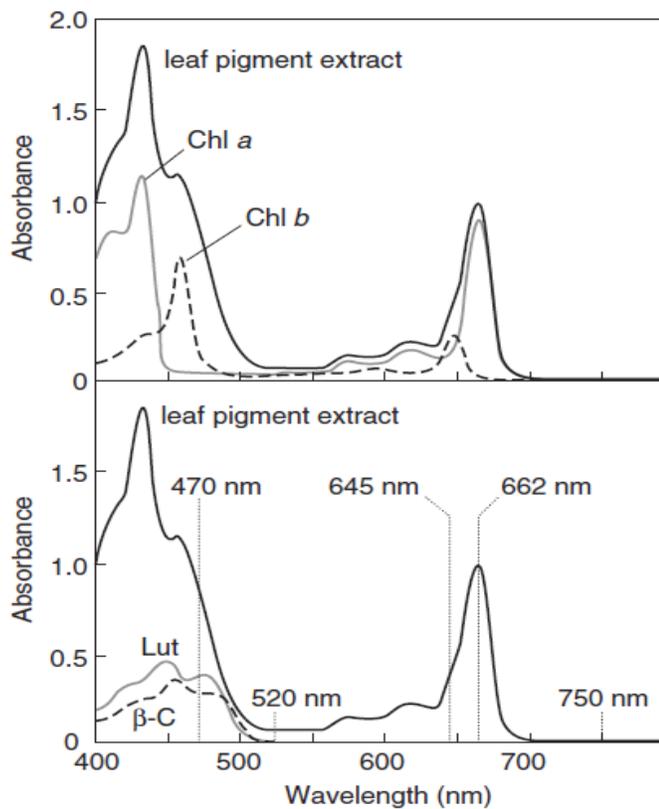


Figura 6. Espectro de absorción de pigmentos extraídos a partir de hojas de tabaco. La mezcla de pigmentos resuspendidos en acetona contenía clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), beta caroteno (β -C) y luteína (Lut)(Lichtenthaler y Buschmann, 2001).

2.14. Detección de la producción de peróxido de hidrógeno en hojas de *A. deliciosa* sometidas a tratamiento con NaCl.

2.14.1. Tratamiento de hojas de *A. deliciosa* con NaCl.

Hojas de *A. deliciosa* silvestres y transgénicas fueron sometidas a tratamiento agudo con NaCl. Para ello, las hojas fueron sumergidas en solución de NaCl 200mM por 0, 24 y 48 horas. Para cada tiempo se utilizaron 3 hojas por línea y se realizó un control de tratamiento sin NaCl para cada tiempo. Para determinar los niveles de producción de peróxido de hidrógeno en las hojas

de *A. deliciosa* sometidas a tratamiento con NaCl, se procedió a teñir las hojas con 3,3'-Diaminobenzidine (DAB; Sección 2.14.2)

2.14.2. Tinción de hojas de *A. deliciosa* con DAB.

Para cuantificar los niveles de peróxido de hidrogeno mediante tinción con DAB, se utilizó el protocolo modificado de Daudi y O'Brien (Daudi y O'Brien, 2012). Hojas de *A. deliciosa* fueron sumergidas en la solución de tinción con DAB (DAB 1mg/mL ; Na₂HPO₄ 10 mM; Tween 20 0,05% v/v). Para asegurar que la solución con DAB ingresa al tejido, se aplicó vacío suave por 5 minutos y luego se mantuvieron en agitación constante y oscuridad por 4 horas (DAB es sensible a la luz). Una vez finalizada la incubación, se eliminó la solución de tinción y se sumergieron las hojas en la solución de blanqueamiento (Etanol : Ácido acético : Glicerol = 3 : 1 : 1) y se dejó en baño termostático a 80°C por 20 minutos. Una vez transcurridos los 20 minutos, se reemplazó la solución de blanqueamiento por solución fresca y se dejó en el baño termostático por 30 minutos más. Una vez finalizada la última incubación con solución de blanqueamiento, se procedió a secar las hojas en papel absorbente y a visualizar el grado de tinción con DAB.

2.15. Diseño de partidores.

Todos los partidores utilizados en este trabajo fueron diseñados manualmente o utilizando el programa SnapGene. El análisis de los partidores diseñados se realizó mediante la herramienta bioinformática OligoAnalyzer 3.1, la cual permitió calcular la temperatura de disociación y descartar la presencia de homo y heterodímeros. Los partidores fueron sintetizados por IDTDNA® y se detallan en el Anexo 1.

3. RESULTADOS.

3.1. Niveles de expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en plantas de *D. carota* sometidas a tratamiento agudo por sal.

Se extrajo ARN (Sección 2.10.2.1) de hoja y raíz de plantas de *D. carota* de 8 semanas de edad sometidas a distintos tiempos de tratamiento con NaCl (Sección 2.7). La correcta integridad del ARN extraído, se observó mediante electroforesis en gel de agarosa (Anexo 3). Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA mediante RT-PCR (Sección 2.10.2.3) y se llevaron a cabo análisis de los niveles relativos de transcrito de los genes DcAlfin4, DcAlfin3 y DcAREB3 mediante qRT-PCR (Sección 2.11.3). El gen DcAREB3 se utilizó como control positivo del tratamiento con NaCl, ya se determinó que su expresión se induce bajo condiciones de estrés por sal (Simpson y col., 2018).

En la figura 7 se muestran los niveles relativos de transcrito de los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y DcAREB3 normalizados respecto al tratamiento 2h en H₂O. Como se observa en la figura 7.A el nivel relativo de transcrito de DcAlfin4 se ve aumentado en las hojas a las 4h, 6h y 8 h de tratamiento con NaCl respecto a la condición control (H₂O), mientras que la raíz no presenta una diferencia significativa (Figura 7.B). En tanto el gen DcAlfin7 muestra un aumento significativo en los niveles de expresión a las 6h y 8h en hojas y en raíz luego del tratamiento con NaCl respecto al control con H₂O (Figura 7.C y D). Además, se observó que el gen control de respuesta a estrés, DcAREB3, muestra un aumento significativo en los niveles de expresión tanto en las hojas a las 2 h como en la raíz de *D. carota* desde las 4h, validando que el tratamiento indujo un efecto en las plantas (Figura 7.E y F). Este resultado muestra que los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 responden, aunque diferencialmente, a tratamientos por estrés salino; ambos son inducidos por estrés salino en hojas mientras que solo DcAlfin7 lo hace en la raíz. A su vez muestran un patrón de

regulación transcripcional diferente con respecto a DcAREB3, lo que podría sugerir la regulación de mecanismos de tolerancia a estrés distintos a los regulados por DcAREB3. De este modo, se propone que los FT codificados por los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 estarían involucrados en mecanismos de transducción de respuesta a salinidad.

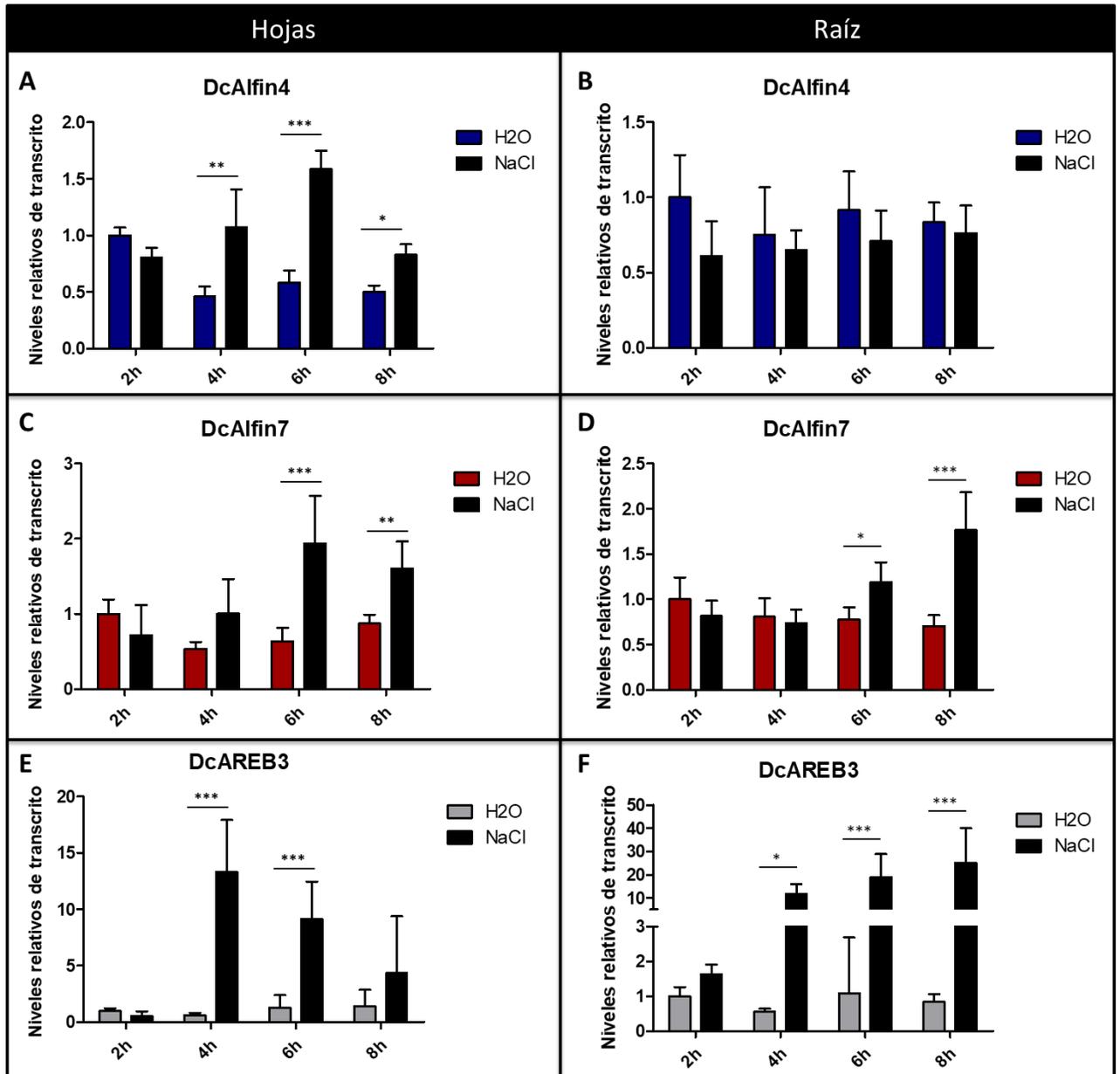


Figura 7. Niveles de expresión de los genes que codifican para los factores de transcripción DcAlfin4, DcAlfin7 y DcAREB3 en plantas de *D. carota* sometidas a tratamiento agudo con NaCl 250mM. Niveles de expresión de DcAlfin4 en (A) las hojas y (B) las raíces de *D. carota* sometidas a tratamiento con NaCl. Niveles de expresión de DcAlfin7 en (C) las hojas y (D) las raíces de *D. carota* sometidas a tratamiento con NaCl. Niveles de expresión de DcAREB3 en (E) las hojas y (F) las raíces de *D. carota* sometidas a tratamiento con NaCl. Para cada medición se utilizó el gen ubiquitina como normalizador, y los datos se calibraron respecto a plantas en condición control en H₂O a las 2 horas post tratamiento. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas técnicas compuestas cada una por 100 mg de tejido de plántulas independientes de *D. carota ex vitro* de 8 semanas de edad. Los asteriscos indican diferencias significativas, las cuales fueron determinadas mediante Test de ANOVA de dos colas. *: p<0,05; **: p<0,01; *** p<0,001.

3.2. Generación, análisis moleculares y ensayos de tolerancia a estrés salino y sequía de líneas de *A. thaliana* que expresen los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Para determinar si los factores de transcripción codificados por los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 poseen un rol en otorgar tolerancia a estrés salino y/o hídrico, se procedió a caracterizar funcionalmente dichos genes mediante la expresión heteróloga de ellos en *A. thaliana*. De este modo, la validación funcional en el organismo modelo *A. thaliana* es una primera aproximación para proyectar el generar plantas de *A. deliciosa* transgénicas tolerantes a salinidad y/o sequía.

3.2.1. Transformación de *A. thaliana* con los factores de transcripción DcAlfin4 y DcAlfin7 y obtención de líneas T3 homocigotas.

En el laboratorio se contaba con las construcciones pK7RWG2 (pK7, vector vacío), pK7RWG2/DcAlfin4 (pKAlfin4) y pK7RWG2/DcAlfin7 (pKAlfin7) generadas y verificadas mediante ensayos de restricción (Anexo 4) y secuenciación en un trabajo previo (Simpson, 2015).

Los vectores pKAlfin4 y pKAlfin7 dejan la secuencia CDS de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Anexo 5) bajo la dirección del promotor fuerte y constitutivo CaMV 35S y lo fusiona a la proteína fluorescente RFP en su extremo C-terminal. Se realizó miniprep, a partir de cultivos líquidos de *E. coli* transformadas con los vectores pK7, pKAlfin4 y pKAlfin7 (Simpson, 2015). Con estos vectores se transformó *A. tumefaciens* de la cepa GV3101 (Sección 2.4.2). De las cuales se obtuvieron 3 colonias positivas para DcAlfin4 y 6 colonias positivas para DcAlfin7 (Figura 8). Para verificar la correcta funcionalidad de los vectores utilizados, se chequeó mediante infiltración de hojas de tabaco con las colonias de *A. tumefaciens* obtenidas la correcta expresión y localización subcelular de los FT codificados por los genes DcAlfin4 (citoplasmática y nuclear) y DcAlfin7 (nuclear; ver Anexo 6)(Simpson, 2015). Finalmente, estas colonias fueron posteriormente utilizadas para la transformación estable de *A. thaliana* y *A. deliciosa*.

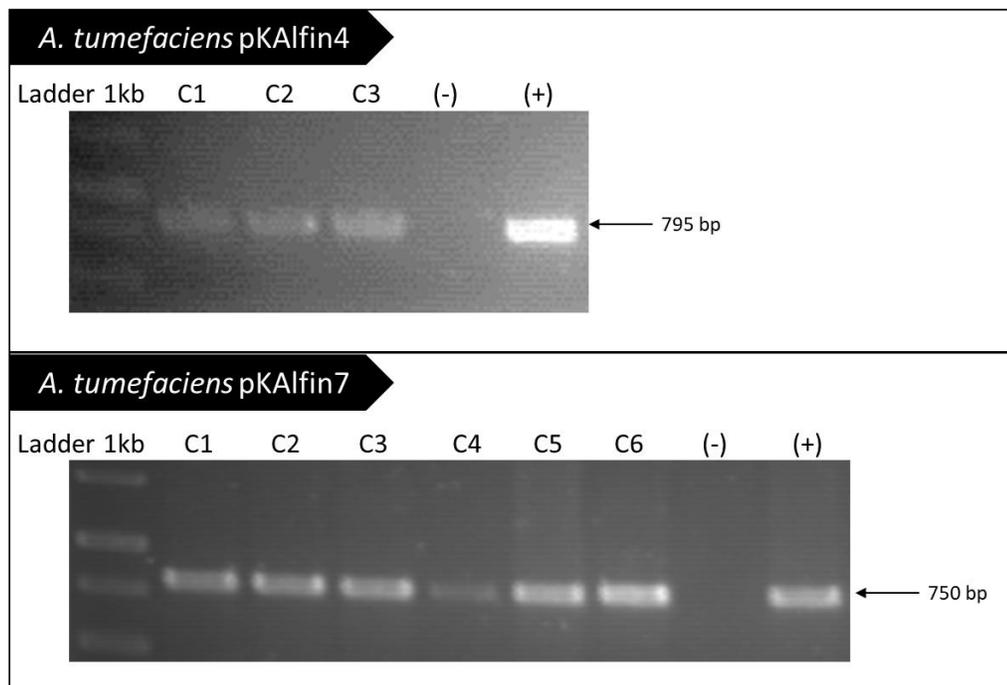


Figura 8. Colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores de pKAlfin4 y pKAlfin7. Análisis realizado mediante PCR de colonia a células de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores pKAlfin4 y

pKAlfin7. C N°: corresponde al número de la colonia analizada por PCR; (-): control negativo (colonia sin transformar); (+): control positivo (vector pKAlfin4 o pKAlfin7 según corresponda).

Se transformaron plantas de *A. thaliana* mediante inmersión floral con *A. tumefaciens* con las construcciones pK7Alfin4, pK7Alfin7 y pK7 (Sección 2.6.1). Una vez crecidas las plantas T0 transformadas, éstas fueron cosechadas y sus semillas recolectadas (semillas T1). Para llevar a cabo la selección de las líneas T1 transformantes, éstas se sembraron en medio MS sólido suplementado con 100mg/L de kanamicina. En este punto, se obtuvieron 8 líneas T1 transformantes para el gen DcAlfin4 (capaces de sobrevivir en medio con el agente de selección), 6 líneas T1 transformantes para el gen DcAlfin7 y 2 líneas VSI (Vector sin inserto).

Mediante análisis por PCR (Sección 2.11.1) a partir de ADN genómico (Sección 2.10.1.1) de las líneas T1 de *A. thaliana* transformantes para los genes DcAlfin4, DcAlfin7, y VSI se determinó y seleccionaron las líneas transgénicas. En la figura 9.A se muestra que las 8 líneas T1 DcAlfin4 (Líneas Al4) transformantes, obtenidas mediante selección con kanamicina, mostraron amplificación para el gen DcAlfin4, es decir, todas las líneas son transgénicas. En la figura 9.B se muestra que 6 de las 7 líneas T1 DcAlfin7 (Líneas Al7) transformantes muestran un resultado positivo para la amplificación del gen DcAlfin7, mostrando que estas 6 líneas son transgénicas. Mientras que en los controles negativos de transformación (Líneas VSI) y de la reacción de PCR (C-) no se observó la banda para el gen DcAlfin4 o DcAlfin7.

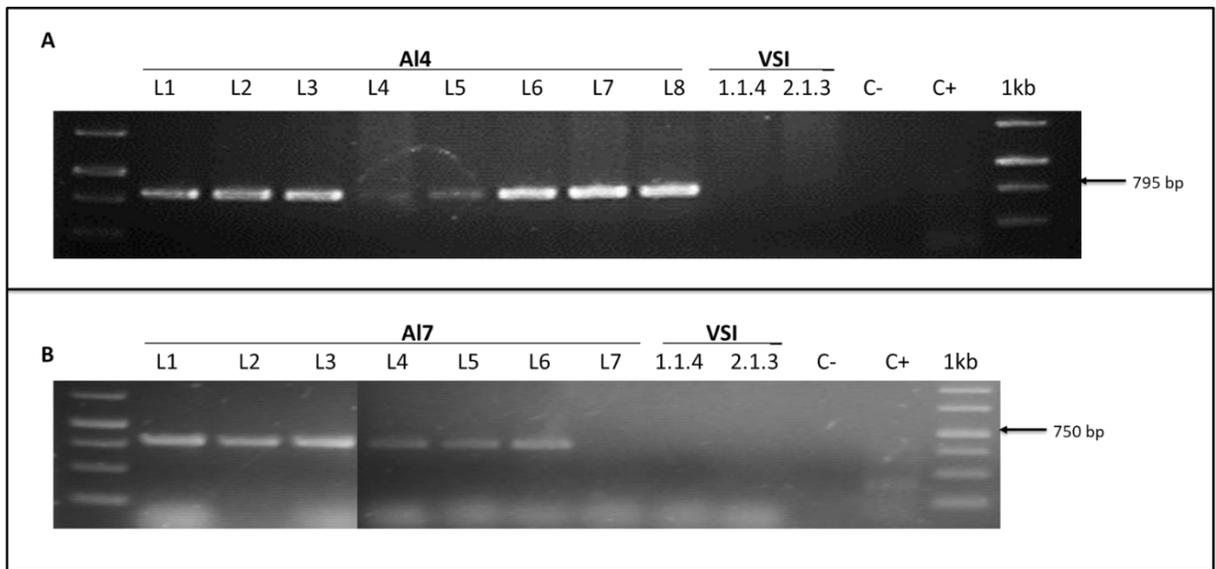


Figura 9. Selección de líneas transgénicas de *A. thaliana* para los genes DcAlfin 4 y DcAlfin7. (A) PCR para el gen DcAlfin4 a partir de ADNg de 8 líneas de *A. thaliana* transformantes. AI4: Líneas de *A. thaliana* transformantes para el gen DcAlfin4 (B) PCR para el gen DcAlfin7 a partir de ADNg de 7 líneas de *A. thaliana* transformantes.; AI7: Líneas de *A. thaliana* transformantes para el gen DcAlfin7; VSI: Líneas transformantes para el vector pK7 sin inserto; C-: Control negativo de PCR con H₂O; C+: control positivo de PCR a partir de colonia de *A. tumefaciens* transformada con el vector pK7Alfin4 o pK7Alfin7; Las flechas indican el tamaño esperado de los amplicones al ser observados en gel de agarosa.

Se continuó trabajando con las 16 líneas transgénicas (8 líneas AI4; 6 líneas AI7; 2 líneas VSI) hasta la obtención de líneas T3 o T4 homocigotas. Para ello, se utilizó un sistema de selección con kanamicina el cual se basa en las probabilidades de la segregación mendeliana del transgén (Sección 2.6.2; Figura 4). Finalmente, se logró obtener 5 líneas AI4 homocigotas, 4 líneas AI7 homocigotas y 2 líneas VSI homocigotas. Mediante este sistema de selección y dada la proporción mendeliana de segregación, se comprobó además que las líneas transgénicas tienen solo una copia del inserto.

3.2.2. Niveles de transcrito de los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y AtPsy en las líneas transgénicas de *A.thaliana* Al4 y Al7.

Una vez obtenidas las líneas T3 homocigotas de *A. thaliana* para los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y VSI (Sección 3.2.1), se procedió a realizar la extracción de ARN total y la posterior síntesis de cDNA (Sección 2.10.2) para llevar a cabo el análisis de los niveles relativos de transcrito mediante qRT-PCR (Sección 2.11.3).

En la figura 10.A y 10.B, se muestran los niveles de expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 de líneas transgénicas de *A.thaliana* Al4 y Al7 respecto a los controles VSI, respectivamente. Se observó un nivel de transcrito del gen DcAlfin4 entre 50 a 100 veces respecto al control y de 25 a 40 veces para el gen DcAlfin7 respecto a los controles VSI que no expresan el gen DcAlfin4 ni y DcAlfin7.

Además, se midieron los niveles de transcrito del gen fitoeno sintasa de *A.thaliana* (AtPsy) en las distintas líneas, ya que es un gen clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides que son los precursores metabólicos de ABA y se ha reportado que plantas sobreexpresoras de factores de transcripción de la familia Alfin presentan una respuesta dependiente de ABA aumentada (Tao y col., 2018). Además, se contaba con el antecedente que los factores de transcripción codificados por DcAlfin4 y DcAlfin7 se unen al promotor de DcPsy2 (Simpson2015). Como se puede observar en la figura 10.C, las líneas Al4 L1, L2 y L5, junto con las líneas Al7 L1 muestran un aumento en los niveles de transcrito para el gen AtPsy respecto a la línea control VSI, lo que podría sugerir un posible aumento en la síntesis de carotenoides en las líneas con mayor abundancia de transcrito de AtPsy.

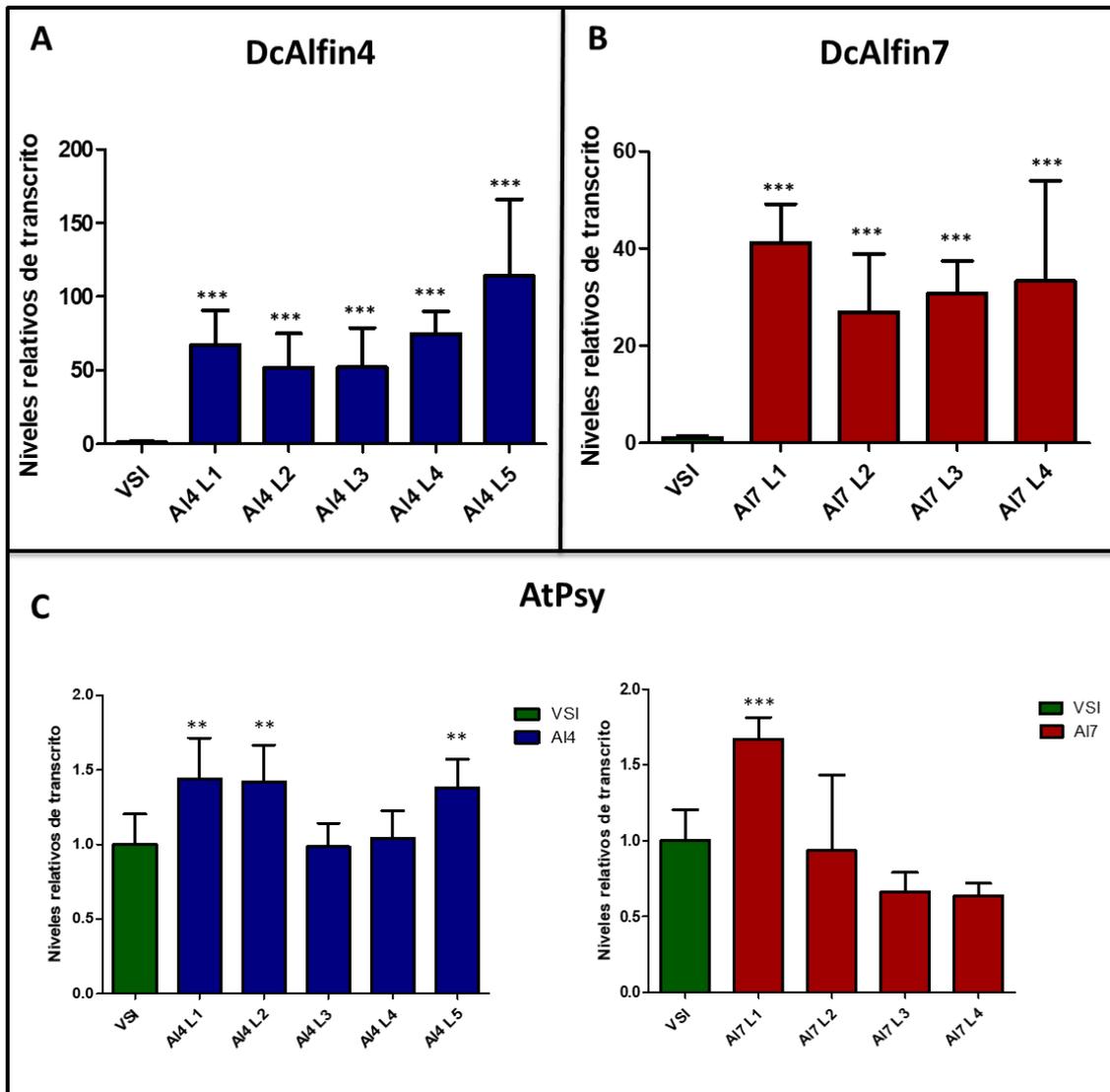


Figura 10. Niveles de expresión de los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y AtPsy de plantas de *A. thaliana* transgénicas para los genes que codifican los factores de transcripción DcAlfin4 y DcAlfin7. (A) Niveles relativos de transcrito del gen DcAlfin4 en las líneas de *A. thaliana* transgénicas para los factores de transcripción DcAlfin4, AI4L1-L5. (B) Niveles relativos de transcrito del gen DcAlfin7 en las líneas de *A. thaliana* transgénicas para los factores de transcripción DcAlfin7, AI7L1-4. (C) Niveles relativos de transcrito del gen AtPsy en las líneas transgénicas AI4 y AI7. Para cada medición se utilizó el gen ubiquitina

como normalizador, y los datos se calibraron respecto a la línea VSI. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas técnicas respectivamente, compuesta cada una por de tres mediciones independientes utilizando hojas de la roseta de 3 plantas T3 de 8 semanas de edad. Los asteriscos indican diferencias significativas, las cuales fueron determinadas mediante Test de ANOVA de una cola. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.3. Contenido de clorofilas y carotenoides totales de las líneas transgénicas de *A. thaliana* para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Luego de determinar que las líneas transgénicas de *A. thaliana* AI4 y AI7 expresaban los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 respectivamente, se procedió a realizar extracción de pigmentos (Sección 2.13.1) a partir de hojas de la roseta de las líneas que presentaron una inducción del gen AtPsy (AI4 L1, AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1) y la posterior cuantificación de clorofilas y carotenoides totales (Sección 2.13.2).

Como se puede observar en la figura 11.A, existe un aumento en los niveles de carotenoides totales de las líneas transgénicas AI4 y AI7 respecto al control VSI, en donde la línea AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1 muestran un aumento estadísticamente significativo respecto al control, lo que en la mayoría de las líneas se correlaciona con el aumento en la expresión de AtPsy (Fig 10.C). Por otro lado, los niveles de clorofila a y clorofila b en las líneas transgénicas para el gen DcAlfin4 o DcAlfin7 también aumentaron, principalmente en las líneas AI4 L2 y AI4 L5 que mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de clorofila a (Figura 11.B) y las líneas AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1 con un aumento significativo en cuanto a los niveles de clorofila b (Figura 11.C). Aunque la línea AI4 L1 muestra una tendencia a tener más carotenoides y clorofilas, la desviación estándar es muy grande, lo que no permite que sea estadísticamente significativo.

3.2.4. Ensayo de tolerancia a salinidad de líneas transgénicas de *A. thaliana* para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Posteriormente, se determinó si la expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 genera tolerancia a estrés abiótico dependiente o independiente de los niveles de expresión de AtPsy y los niveles de carotenoides y clorofilas. Para ello se realizó un ensayo crónico de estrés salino (Sección 2.8) de las 5 líneas T3 homocigotas para el gen DcAlfin4, las 4 líneas T3 homocigotas para el gen DcAlfin7 y las 2 líneas T3 homocigotas VSI. En la figura 12, se muestran imágenes representativas del comportamiento de las distintas líneas sometidas al tratamiento con 200mM NaCl. De manera notable, las líneas VSI se encuentran mucho más afectadas que las líneas Al4 y Al7 al riego de dos semanas con la solución salina 200mM. A su vez, las líneas Al7 parecen estar más afectadas por el tratamiento con NaCl que las líneas Al4.

A modo de análisis cuantitativos, se analizaron distintas características de las plantas post-tratamiento con NaCl, tales como, sobrevivencia, tamaño de la planta, peso fresco, peso seco, reducción de biomasa, reducción de peso fresco (Figura 13). Como se puede observar en la figura 13.A, tanto las líneas Al4 como las Al7 mostraron una mayor tasa de sobrevivencia respecto al control VSI. En la figura 13.B se puede observar que todas las plantas de las líneas Al4, post-tratamiento con NaCl, muestran un aumento significativo en su largo respecto al control VSI. Al analizar la reducción de peso fresco y de biomasa, se observa que las líneas Al4 son las menos afectadas por el tratamiento de salinidad (Figura 13.C y E). Al contrario, 3 de las 4 líneas Al7 mostraron una reducción de peso fresco y biomasa similar a la de las plantas control VSI (Figura 13.C y E).

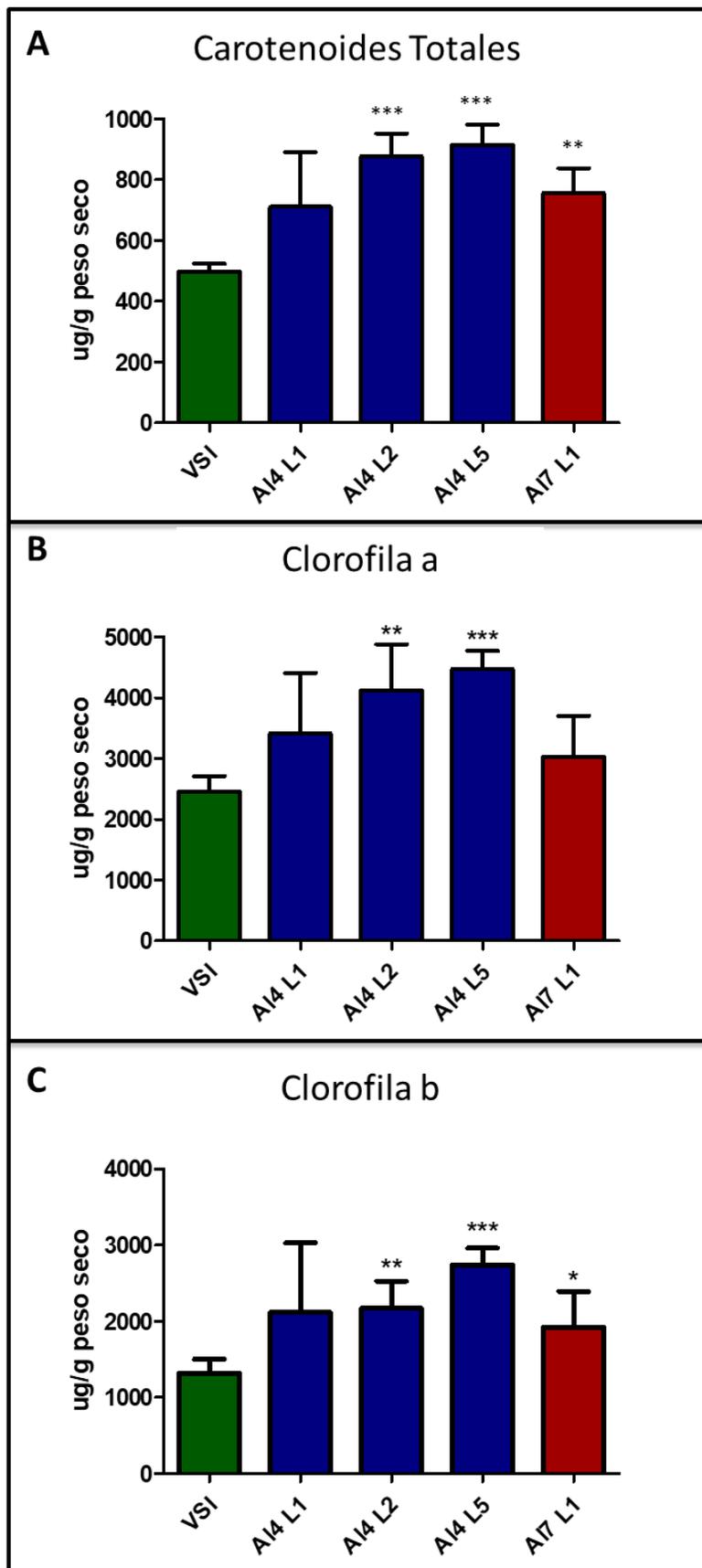


Figura 11. Cuantificación de carotenoides totales y clorofilas en plantas de *A. thaliana* transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7. (A) Cuantificación de carotenoides totales en hojas de líneas transgénicas para el gen DcAlfin4 (Al4 L1, Al4 L2 y Al4 L5) y DcAlfin7 (Al7 L1) . (B) Cuantificación de clorofila a en hojas de líneas de *A. thaliana* transgénicas para el gen DcAlfin4 (Al4 L1, Al4 L2 y Al4 L5) y DcAlfin7 (Al7 L1). (C) Cuantificación de clorofila b en hojas de líneas de *A. thaliana* transgénicas para el gen DcAlfin4 (Al4 L1, Al4 L2 y Al4 L5) y DcAlfin7 (Al7 L1). Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres mediciones independientes utilizando hojas de la roseta de 3 plantas T3 de 8 semanas de edad. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Interesantemente, las líneas Al4 L2 y al Al4 L1 presentan menor peso fresco que el control VSI en condiciones de riego normal, pero el efecto producto del tratamiento por sal es mucho menor y estas líneas (al igual que todas las líneas Al4) poseen mayor peso fresco que el control VSI en tratamiento con NaCl (Figura 13.D). Por otro lado, las líneas Al7 L2, Al7 L3 y Al7 L4 también poseen mayor peso fresco en comparación al control VSI, mas, esto no se ve reflejado en la reducción de peso fresco debido a que en general estas líneas también poseen un mayor contenido de agua en condiciones de riego normal en comparación al control VSI (Figura 13.D). En cuanto al peso seco y la reducción de biomasa de las plantas, se observó a modo general que las líneas Al4 son las menos afectadas por el tratamiento con NaCl, solo la línea Al4 L3, no presentó una disminución en la reducción de biomasa. Al contrario, de las líneas transgénicas Al7, solo la línea Al7 L1 presentó la menor reducción de biomasa en comparación a la línea control VSI (Figura 13.E). A pesar de que la línea Al7 L1 es la con menor peso seco en condiciones de riego normal, también es la con mayor peso seco post tratamiento con NaCl (Figura 13.F).

En resumen, las líneas transgénicas AI4 L1, AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1 presentaron una alta tolerancia al tratamiento con NaCl, siendo las líneas transgénicas que mostraron una menor reducción en peso fresco (Figura 13.C) y biomasa luego del tratamiento (Figura 13.E). Es importante destacar que son estas líneas las que también mostraron un aumento en los niveles de transcrito de AtPsy, carotenoides y clorofilas. El aumento en el contenido de carotenoides podría estar generando un estatus celular inicial en la planta mejor preparado para soportar el estrés oxidativo producido por los altos niveles de salinidad.

3.2.5. Ensayo de tolerancia a sequía de líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan DcAlfin4 y DcAlfin7.

Para complementar el estudio de tolerancia a estrés abiótico otorgada por los genes DcAlfin4 y DcAlfin7, se llevó a cabo un ensayo de tolerancia a estrés hídrico (sección 2.8). Para este ensayo solo se continuó trabajando con las líneas VSI L1, AI4 L1, AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1 dado que fueron las que presentaron mejor desempeño en tolerancia estrés salino, en conjunto con una mayor expresión de AtPsy y mayor contenido carotenoides y clorofila.

En la figura 14, se muestran imágenes representativas del comportamiento fenotípico de las líneas transgénicas tras el tratamiento de sequía (realizado en el instituto VIB-UGent, Bélgica). En esta figura, se puede observar que la línea VSI se ve afectada en la condición de sequía respecto a su control (riego normal). A pesar de que al observar las plantas transgénicas para el gen DcAlfin4, éstas parecen ser de menor tamaño que las plantas VSI, las plantas DcAlfin4 en tratamiento de sequía parecen mostrarse menos afectadas producto del tratamiento comparado con su condición control con riego normal. Por el contrario, no se puede observar una diferencia notoria entre la línea transgénica AI7 L1 para el gen DcAlfin7 y VSI.

Alfin4



Control

NaCl

Vector sin inserto



Control

NaCl

Alfin7



Control

NaCl



Figura 12. Imagen representativa del comportamiento de las líneas transgénicas para los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y VSI una vez finalizado el tratamiento crónico con NaCl 200mM. Control: Plantas con riego normal; NaCl: Plantas con riego NaCl 200mM. Para detalle del comportamiento por cada línea ver Anexo 7.

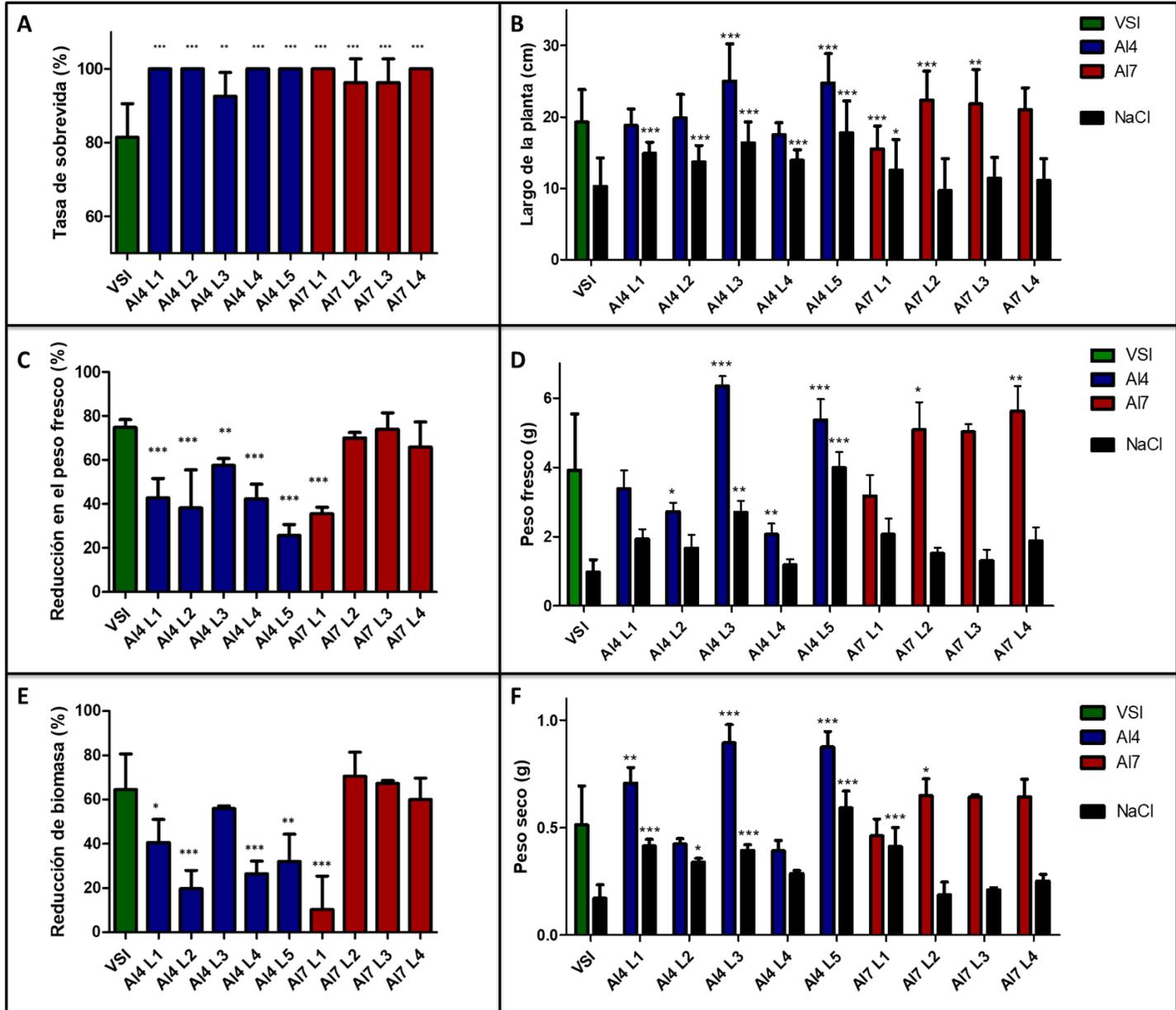


Figura 13. Análisis fenotípico de las plantas de *A. thaliana* transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7 sometidas a tratamiento de salinidad. (A) Porcentaje de sobrevida, (B) Largo de las plantas, (C) Reducción de peso fresco, (D) Peso fresco, (E) Reducción de biomasa y (F) Peso seco de las líneas transgénicas de *A. thaliana* Al4 y Al7 sometidas a 2 semanas a tratamiento con 200mM de NaCl. Se utilizaron 3 réplicas técnicas con 9 plantas de generación T3 por construcción. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas técnicas. Los asteriscos indican diferencias significativas, las cuales fueron determinadas mediante Test de ANOVA de una o dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Las diferencias significativas están representadas para riego normal o tratamiento con NaCl de las líneas transgénicas respecto al control VSI en cada una de éstas condiciones.

Para darle más robustez a lo observado anteriormente, se estudiaron distintas características de las plantas post-tratamiento, tales como, porcentaje de sobrevida, largo de la planta, peso seco, peso fresco, reducción de biomasa, reducción de peso fresco y largo de la planta (Figura 15). Como se puede observar en la figura 15.A, no existe una diferencia en la tasa de sobrevida en las plantas transgénicas para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 respecto a las plantas VSI. Y a pesar de que las plantas de las líneas Al4 y Al7 presentaron una disminución en el largo, peso fresco y peso seco respecto a las plantas VSI en condiciones de riego normal (Figura 15.B, D y F), no se observó una diferencia significativa en peso fresco y peso seco entre las plantas Al4 en condición control y sequía (Figura 15.D y F). lo anterior se traduce en que las líneas Al4 L2 y L5 transgénicas para el gen DcAlfin4 mostraron una menor reducción de peso fresco y biomasa respecto a la línea VSI, mientras que la línea Al7 L1 no muestra diferencia significativa respecto a la línea control VSI (Figura 15.E).

Alfin4



Sequía

Control

Vector sin inserto



Sequía

Control

Alfin7



Sequía

Control

Figura 14. Imagen representativa del comportamiento de las líneas transgénicas para los genes DcAlfin4, DcAlfin7 y VSI una vez finalizado el tratamiento de sequía. Control: Plantas con riego normal; Sequía: Plantas sometidas a estrés hídrico. Para detalle del comportamiento por cada línea, ver Anexo 8.

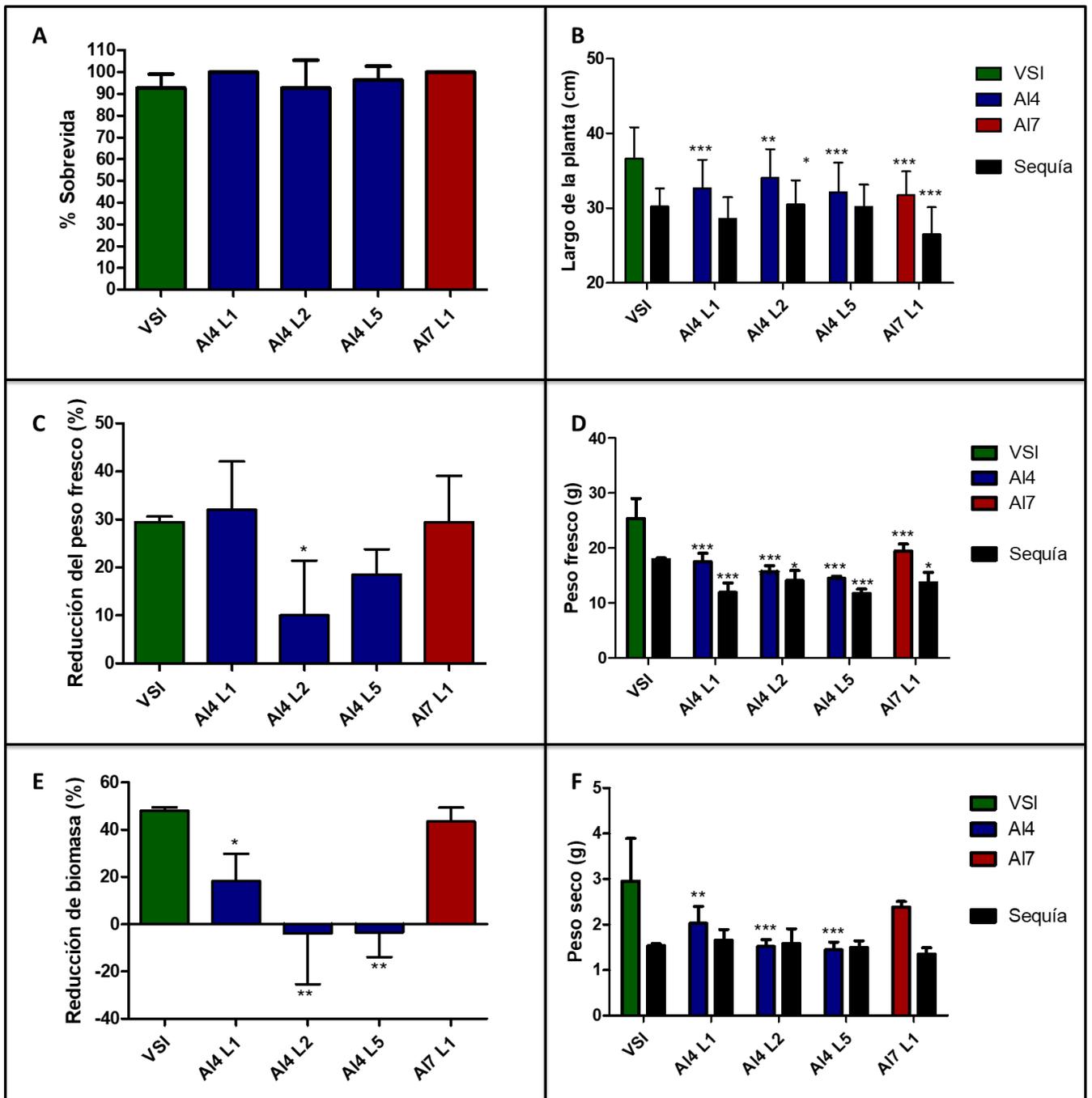


Figura 15. Análisis fenotípico de las plantas de *A. thaliana* transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7 sometidas a tratamiento de sequía. (A) Porcentaje de sobrevivencia, (B) Largo de las plantas, (C) Reducción de peso fresco (D) Peso fresco, (E) Reducción de biomasa, (F) Peso seco de las plantas de *A. thaliana* sometidas a tratamiento de sequía por 2 semanas. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación

estándar de tres réplicas técnicas. Los asteriscos indican diferencias significativas, las cuales fueron determinadas mediante Test de ANOVA de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Las diferencias significativas están representadas para riego normal o tratamiento con NaCl de las líneas transgénicas respecto al control VSI en cada una de éstas condiciones.

De los resultados obtenidos, se puede concluir que la expresión ectópica del gen DcAlfin4, genera un aumento en tolerancia a condiciones de salinidad y sequía en las líneas transgénicas AI4 de *A. thaliana*. Resultados que correlacionan con la mayor expresión del gen AtPsy, mayores niveles de carotenoides y de clorofila a y b de las líneas AI4. Por otro lado, a pesar de que la expresión del gen DcAlfin7 en la línea AI7 L1 produce un aumento en el contenido de clorofilas, carotenoides y tolerancia a condiciones de salinidad, no se observó el mismo comportamiento en al someter la líneas AI7 L1 a condiciones de privación de agua, sugiriendo un rol diferencial del gen DcAlfin7 frente a condiciones de estrés salino e hídrico.

3.3. Generación, análisis moleculares y ensayos de tolerancia a estrés salino de líneas de

***A. deliciosa* que expresen los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.**

Considerando los resultados obtenidos en las líneas transgénicas de *A. thaliana* que expresan los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Sección 3.2), es que se propone utilizar dichos genes como herramientas biotecnológicas para mejorar la tolerancia a salinidad y sequía de cultivos de importancia comercial para Chile (Sección 1.1.1).

Desde este punto de vista, se plantea como proyección biotecnológica, el generar líneas transgénicas de *A. deliciosa* con mayor tolerancia a salinidad y sequía mediante la utilización de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7. Lo anterior, con miras de utilizar dichas líneas como una variedad

que pueda ser utilizada como portainjerto de variedades comerciales de kiwi sensibles a estos tipos de estrés.

3.3.1. Transformación de *A. deliciosa* y regeneración *in vitro* de plantas transformantes que para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Para la generación de plantas transgénicas de *A. deliciosa*, se procedió a transformar explantes de hoja de *A. deliciosa* var Hayward con las construcciones pKAlfin4, pKAlfin7 y pK7 mediante *A. tumefaciens* (Sección 2.9.2). A pesar de que el gen DcAlfin4 fue el que mostró los mejores resultados respecto al aumento de la tolerancia a estrés salino e hídrico en *A. thaliana* (Sección 3.2.4 y Sección 3.2.5), se decidió utilizar tanto el gen DcAlfin4 como DcAlfin7 en para llevar a cabo la transformación de *A. deliciosa*. Lo anterior, con el fin de analizar comparativamente los resultados tolerancia para cada gen en ambas especies.

Una vez finalizada la etapa de transformación, se procedió a la regeneración *in vitro* de plantas transformantes de *A. deliciosa* mediante el proceso de organogénesis somática (Sección 2.9.1; Figura 16). El proceso de regeneración mediante organogénesis somática de *A. deliciosa* se puede llevar a cabo en un periodo de 5 a 6 meses, mas, para llevar a cabo la transformación, el tiempo del proceso aumenta a aproximadamente 12 meses. Lo anterior, debido a que el agente de selección (en este caso Kanamicina) retrasa considerablemente el proceso de inducción de callos y proliferación de callos (Figura 9; Medio I y Medio II). La concentración óptima del agente de selección Kanamicina se determinó mediante una curva de tolerancia a dicho antibiótico en explantes silvestres de *A. deliciosa* (Anexo 9).

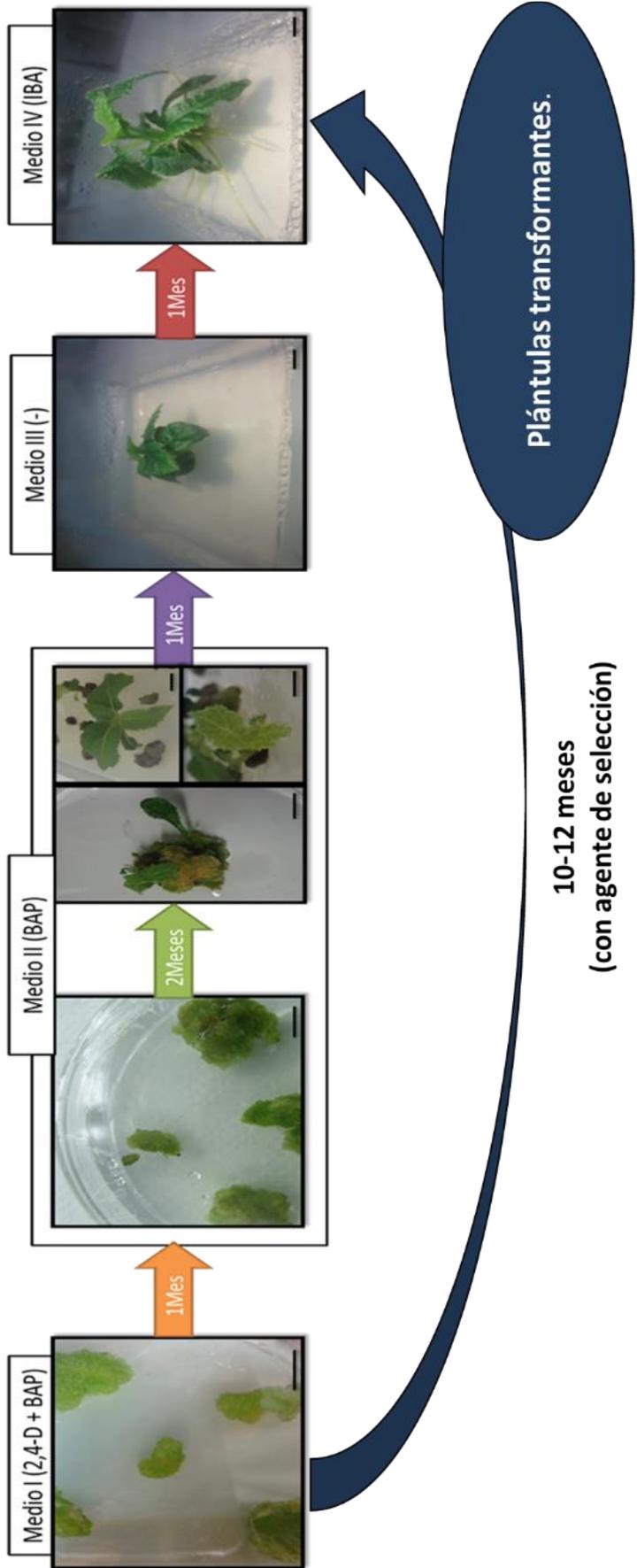


Figura 16. Cultivo *in vitro* y transformación estable del kiwi. Medio I: Medio de inducción de callo suplementado con 2,4-D (2 mg/L) y BAP (0,5 mg/L). Medio II: Medio de proliferación del callo e inducción de brotes suplementado con BAP (5 mg/L). Medio III: Medio de proliferación de brotes sin suplementar o con BAP (0,5 mg/L). Medio IV: Medio de enraizamiento suplementado con IBA (0,5 mg/L). Las flechas indican el tiempo en cada medio de cultivo. Barras de escala: 1 cm.

3.3.2. Análisis moleculares de líneas transformantes de *A. deliciosa* para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

3.3.2.1. PCR a partir de ADNg de plantas transformantes de *A. deliciosa* para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Para determinar si las plantas regeneradas a partir de explantes de *A. deliciosa* transformadas con las construcciones pK7Alfin4 y pK7Alfin7 portaban los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 respectivamente, se extrajo ADN genómico (sección 2.10.1.2) a partir de hojas de 13 líneas transformantes para DcAlfin4 y 12 líneas transformantes para el gen DcAlfin7, de plántulas de kiwi regeneradas para cada construcción. A partir del ADNg extraído, se realizó un PCR convencional (sección 2.11.1) para amplificar un fragmento de 795 pb para el caso de líneas DcAlfin4 y de 750 pb para líneas DcAlfin7 (partidores utilizados en Anexo 1), los cuales abarcan toda la región CDS clonada de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Anexo 5). En la figura 17 se observan las líneas que amplificaron un tamaño de banda esperado al realizar un PCR convencional para DcAlfin4 y DcAlfin7.

Las 13 líneas de *A. deliciosa* transformantes para el gen DcAlfin4, analizadas mediante PCR a partir de ADNg, fueron positivas para el gen DcAlfin4, mientras que, de las 12 líneas transformantes para el gen DcAlfin7, 8 de ellas dieron positivas para el gen DcAlfin7.

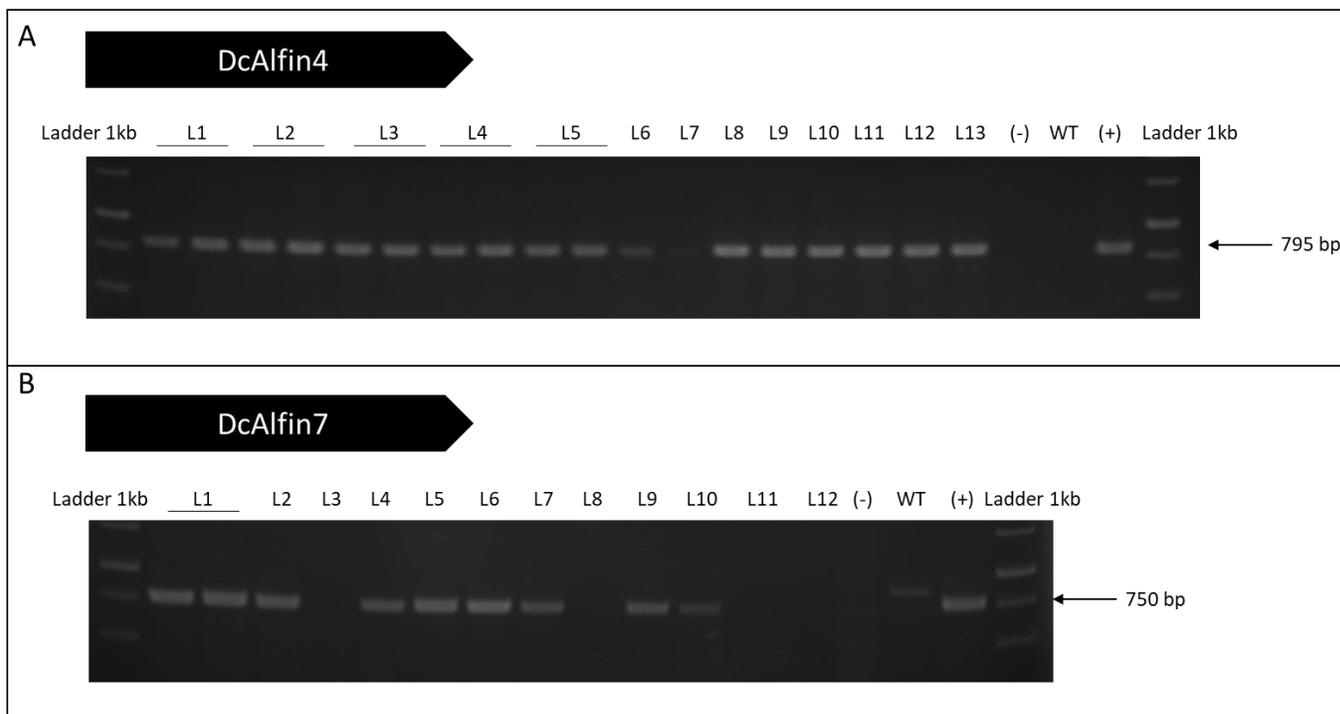


Figura 17. PCR a partir de ADN genómico de plantas transformantes de *A. deliciosa* por los genes DcAlfin4 y DcAlfin7. (A) PCR para el gen DcAlfin4 a partir de ADNg de 13 líneas de *A. deliciosa* transformantes para el gen DcAlfin4. (B) PCR para el gen DcAlfin7 a partir de ADNg de 12 líneas de *A. deliciosa* transformantes para el gen DcAlfin7. L: línea transformante de *A. deliciosa*; WT: planta silvestre de *A. deliciosa* var Hayward; (-): Control negativo de PCR con H₂O; (+): control positivo de PCR a partir de colonia de *A. tumefaciens* transformada con el vector pK7Alfin4 o pK7Alfin7. Las flechas indican el tamaño esperado del amplicon al ser observado en gel de agarosa.

3.3.2.2. RT-PCR de los genes DcAlfin4 y DcAlfin3 de líneas transgénicas de *A. deliciosa* para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Para determinar si las líneas transgénicas Al4 y Al7 de *A. deliciosa* transcriben los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 respectivamente, se extrajo ARN total a partir de hojas de las líneas de *A. deliciosa*

transgénicas para el gen DcAlfin4 y DcAlfin7, VSI y sin transformar (Sección 2.10.2.1). Mediante electroforesis en gel de agarosa se comprobó la óptima integridad del ARN extraído (Anexo 10).

Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de ADNc (Sección 2.10.2.3) con el cual se determinó mediante PCR si las líneas AI4 y AI7 de *A. deliciosa* están expresando los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Figura 18; Sección 2.11.1). Se amplificó un fragmento de 795 pb para el caso de líneas DcAlfin4 y de 750 pb para líneas DcAlfin7, los cuales abarcan toda la región CDS clonada de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7. Como se puede observar en la Figura 18, todas las líneas confirmadas como transgénicas para los genes DcAlfin4 o DcAlfin7 (Figura 17) expresan el gen DcAlfin4 o DcAlfin7 según corresponda.

Por otro lado, a pesar de que el ARN extraído a partir de las líneas transgénicas AI4 L4, AI4 L5, AI4 L10 y AI4 L11 no se encuentra lo suficientemente íntegro para realizar análisis de niveles de transcrito mediante qRT-PCR (Anexo 10), éste sí pudo ser utilizado para análisis mediante RT-PCR tradicional, en donde se observa que todas las líneas en cuestión están expresando el gen DcAlfin4 (Figura 18).

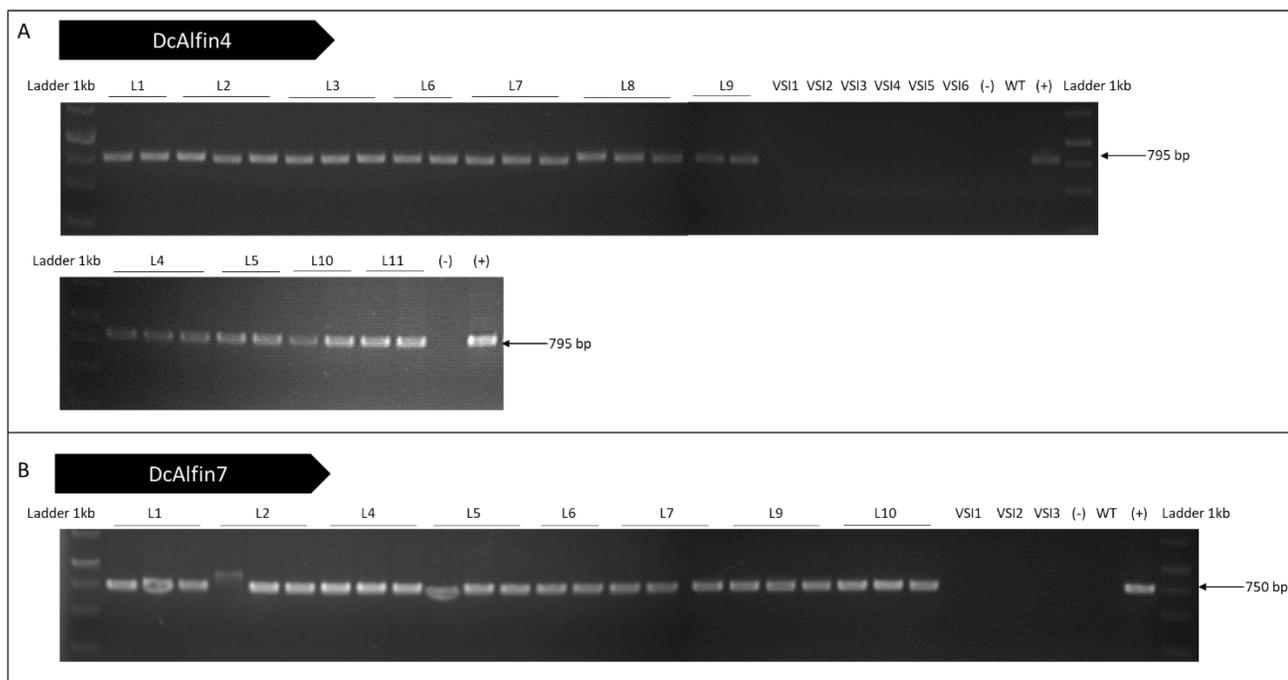


Figura 18. RT-PCR de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en pantas de *A. deliciosa* transgénicas para los genes que codifican los factores de transcripción DcAlfin4 o DcAlfin7. (A) RT-PCR a partir de cDNA de líneas transgénicas de *A. deliciosa* para el gen DcAlfin4. (B) RT-PCR a partir de cDNA de líneas transgénicas para el gen DcAlin7. L: Línea transgénica; VSI: Líneas transformadas con el vector pk7 sin inserto; WT: Planta silvestre de *A. deliciosa* Var Hayward; (-): control negativo de PCR con H₂O; (+): control positivo de PCR a partir de colonia de *A. tumefaciens* transformada con el vector pK7Alfin4 o pK7Alfin7

3.3.2.3. Análisis de niveles de transcrito mediante qRT-PCR de los genes DcAlfin4 y DcAlfin3 de líneas transgénicas de *A. deliciosa*.

Se cuantificaron los niveles relativos de transcrito de las líneas transgénicas de *A. deliciosa* para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 mediante qRT-PCR (Sección 2.11.3). En la figura 19 se muestran los niveles de transcrito de las líneas transgénicas de *A. deliciosa* que expresan el gen DcAlfin4, mientras que en la figura 20, se muestra los niveles de transcrito de las líneas transgénicas de *A. deliciosa* que expresan el gen DcAlfin7. Para este ensayo se utilizaron ADNc sintetizados a partir

de muestras de ARN con niveles de integridad óptima (Figura 18, Anexo 10). Como el ARN extraído a partir de las líneas transgénicas AI4 L4, AI4 L5, AI4 L10 y AI4 L11 no se encuentra lo suficientemente íntegro para realizar análisis de niveles de transcrito mediante qRT-PCR fueron descartadas y este ensayo se realizó solo con un grupo menor de líneas AI4 y AI7 cuyo RNA poseía la calidad e integridad suficiente para análisis por qRT-PCR. Como se puede observar, en ambos casos existen líneas con distintos niveles de expresión, lo que es esperable, considerando que la transformación mediada por *A. tumefaciens* genera inserciones al azar en el genoma, dejando en cada línea al gen de interés en un contexto de regulación transcripcional distinto. Del análisis de expresión se concluye que todas las líneas expresan, aunque en diferente magnitud, el transgen y son susceptibles a ser utilizadas para los ensayos siguientes

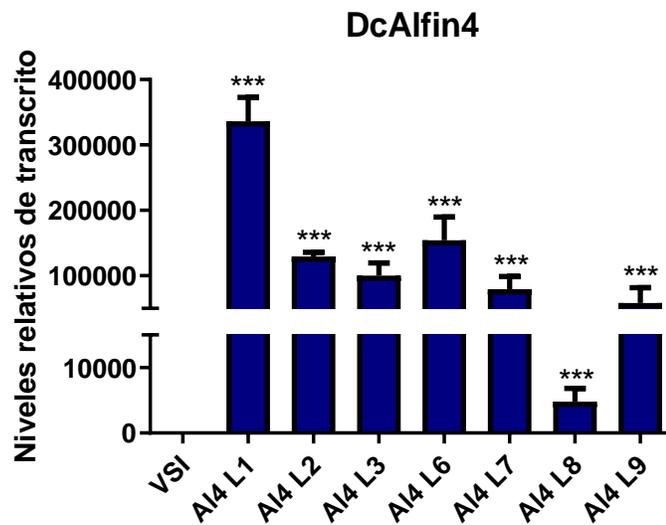


Figura 19. Niveles relativos de transcrito del gen DcAlfin4 en las líneas transgénicas de *A. deliciosa* AI4.

VSI: Vector pk7 sin inserto; AI4: Líneas transgénicas de *A. deliciosa* para el gen DcAlfin4. Para cada medición se utilizó el gen ubiquitina como normalizador. Las columnas y las barras representan el promedio y la

desviación estándar de tres réplicas técnicas respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas, las cuales fueron determinadas mediante Test de T de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

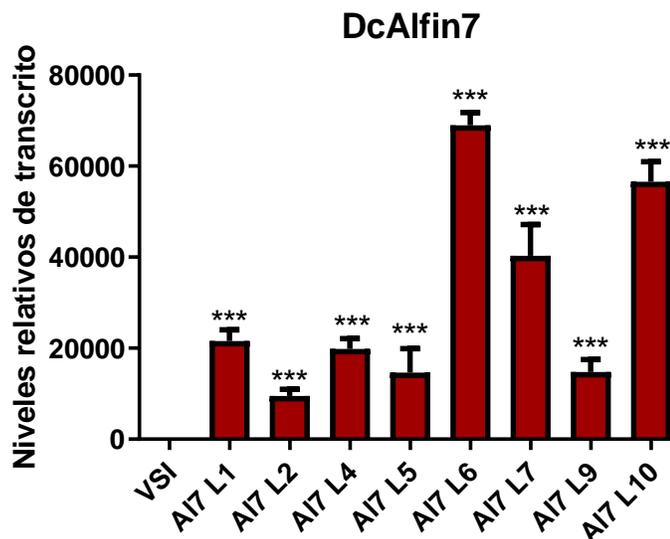


Figura 20. Niveles relativos de transcrito del gen DcAlfin7 en las líneas transgénicas de *A. deliciosa* A17.

VSI: Vector pk7 sin inserto; A14: Líneas transgénicas de *A. deliciosa* para el gen DcAlfin7. Para cada medición se utilizó el gen ubiquitina como normalizador. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de tres réplicas técnicas respectivamente. Los asteriscos indican diferencias significativas, las cuales fueron determinadas mediante Test de T de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.3. Líneas transgénicas de *A. deliciosa* que expresan los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

3.3.3.1. Cuantificación de carotenoides totales y clorofilas de líneas transgénicas de *A. deliciosa* transgénicas para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

Luego de determinar que todas las líneas transgénicas de *A. deliciosa* expresaban los genes DcAlfin4 y DcAlfin7, se realizó la extracción de pigmentos y la cuantificación de carotenoides

totales y clorofila a y b a partir de hojas de la *A. deliciosa* de 8 líneas AI4 y 5 líneas AI7 (Sección 2.13.1 y sección 2.13.2). Estas líneas fueron seleccionadas considerando la cantidad de tejido disponible (hojas) para realizar los siguientes ensayos.

De las 8 líneas transgénicas de *A. deliciosa* AI4 a las cuales se le midió el contenido de carotenoides totales, se observó que 3 líneas no presentan cambios respecto al control (AI4 L1, AI4 L2 y AI4 L7), una presenta disminución (AI4 L6) y 4 líneas muestran un aumento significativo respecto al control silvestre (AI4 L3, AI4 L5, AI4 L8, AI4 L9; Figura 21.A). Respecto al contenido de clorofilas, las líneas AI4 L3, AI4 L5, AI4 L8 y AI4 L9 mostraron un aumento significativo en el contenido tanto de clorofila a como clorofila b respecto al control silvestre y la línea AI4 L1 solo un aumento en el contenido de clorofila a (Figura 21.B y C). Cabe destacar, que en todos los casos el control transformado con el vector sin inserto (VSI) no mostró diferencias, ni en el contenido de carotenoides totales, ni en los niveles de clorofilas respecto al control silvestre, validando a las líneas VSI como control para futuros experimentos. Este resultado muestra una correlación parcial entre la expresión del gen DcAlfin4 y un aumento en el contenido de carotenoides y clorofilas, dado que el 50% de las líneas transgénicas mostro mayor nivel de estos pigmentos.

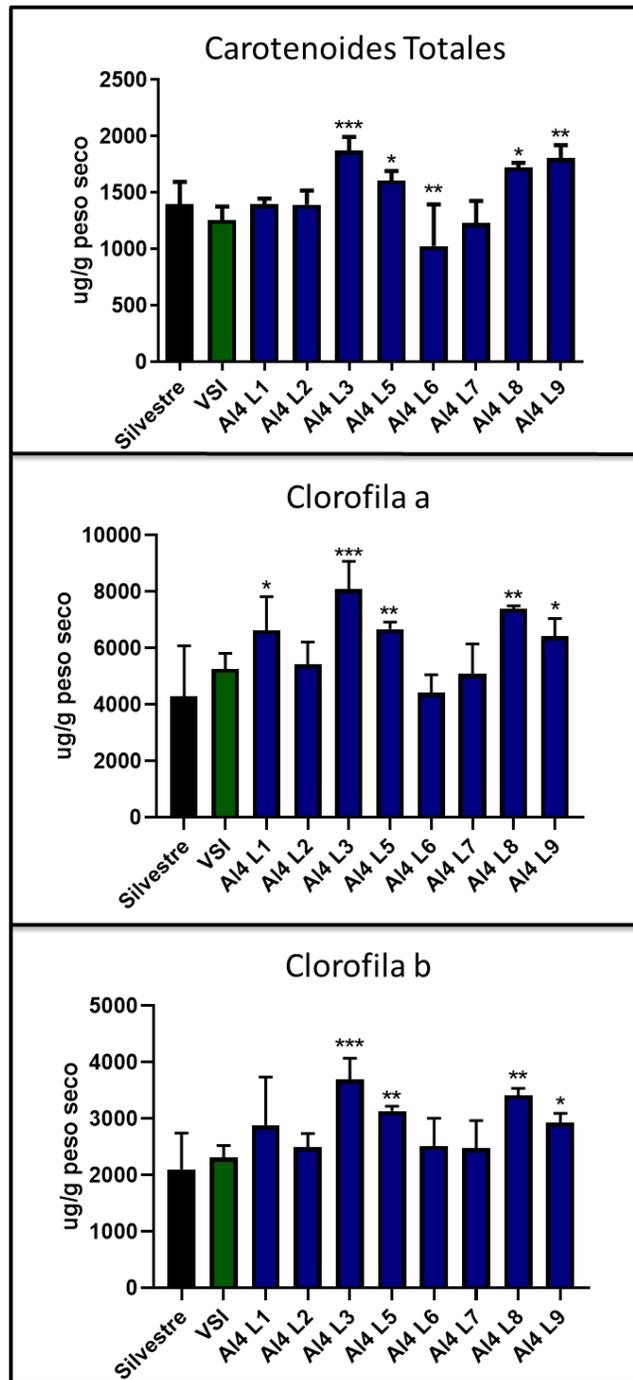


Figura 21. Cuantificación de carotenoides totales y clorofila en plantas de *A. deliciosa* transgénicas para el gen DcAlfin4. (A) Cuantificación de carotenoides totales en hojas de líneas de *A. deliciosa* transgénicas para el gen DcAlfin4. (B) Cuantificación de clorofila a en hojas de líneas de *A. deliciosa* transgénicas para el

gen DcAlfin4. (C) Cuantificación de clorofila b en hojas de líneas de *A. deliciosa* transgénicas para el gen DcAlfin4. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de las mediciones independientes realizadas en triplicado a cada línea. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Por otro lado, en la figura 22.A se observan los niveles de carotenoides totales obtenidos para los extractos a partir de las hojas de 5 líneas transgénicas de *A. deliciosa* para el gen DcAlfin7 (A17 L1, L2, L4, L5 y L6), mientras que en 22.B y C se grafican los niveles de clorofila a y b respectivamente. Como se puede observar, todas las líneas transgénicas para el gen DcAlfin7 analizadas presentan un aumento en los niveles de carotenoides y clorofila a respecto a la línea control VSI, mientras que las líneas A17 L4, A17 L5 y A17 L6 muestran un aumento significativo en los niveles de clorofila b, respecto al control VSI. Este resultado permite correlacionar directamente a la expresión del gen DcAlfin7 con un aumento en los niveles de carotenoides y clorofilas en kiwi.

Estos resultados, en conjunto a los obtenidos en las líneas transgénicas de *A. thaliana* A14 y A17 (Sección 3.2.3), sugieren que los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 son capaces de aumentar el contenido de clorofilas y carotenoides en sistemas heterólogos vegetales, tales como *A. thaliana* y *A. deliciosa*. Aunque cabe destacar, que el patrón de comportamiento es distinto, ya que en *A. thaliana* es el gen DcAlfin4 el que genera un mayor aumento en el contenido de carotenoides, mientras que en *A. deliciosa* parece ser el gen DcAlfin7 el mayormente involucrado en este proceso.

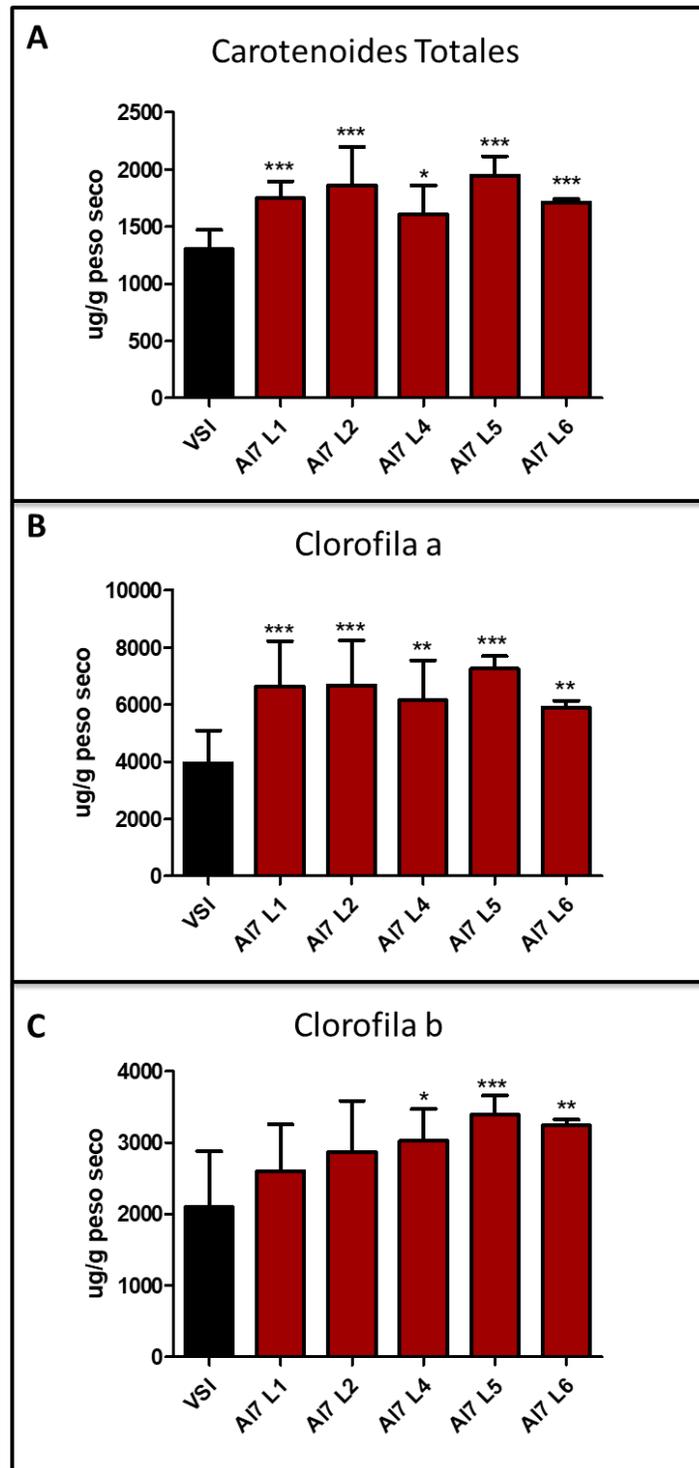


Figura 22. Cuantificación de carotenoides totales y clorofila en plantas de *A. deliciosa* transgénicas para el gen *DcAlfin7*. (A) Cuantificación de carotenoides totales, (B) de clorofila A y (C) de clorofila B en hojas

de líneas de *A. deliciosa* transgénicas para el gen DcAlfin7. Las columnas y las barras representan el promedio y la desviación estándar de las mediciones independientes realizadas en triplicado a cada línea. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las líneas transgénicas y las plantas silvestres, y fueron determinadas mediante Test de T no pareado de dos colas. *: p<0,05; **: p<0,01; *** p<0,001.

3.3.3.2. Tratamiento NaCl y tinción con DAB de hojas *A. deliciosa* transgénicas para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

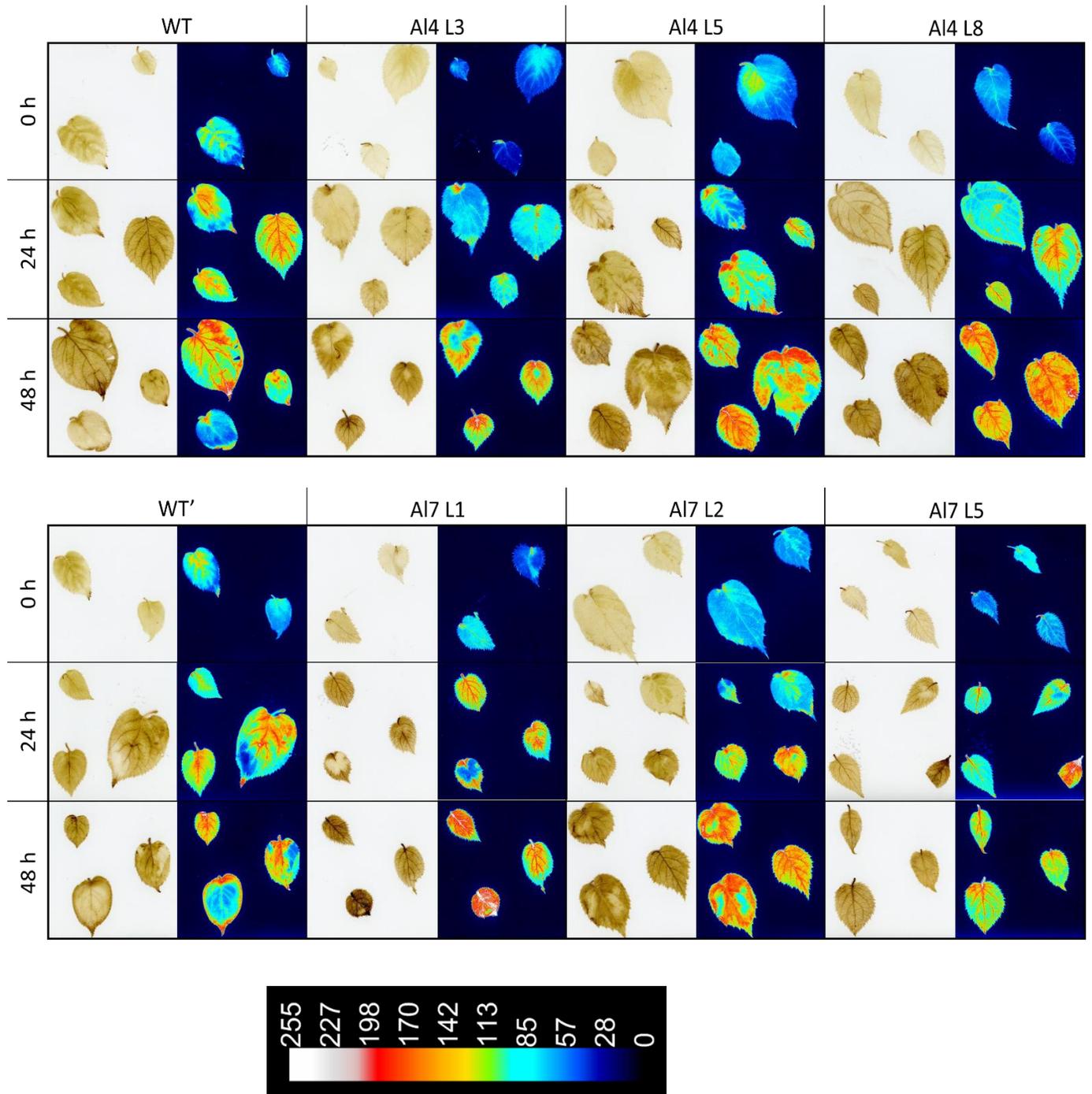
El estrés oxidativo y la producción de radicales libres es una respuesta general que se desencadena producto del resto de los estrés de tipo abiótico (Arbona y col., 2017). Altos niveles de salinidad, falta de agua, heladas o deficiencias nutricionales, pueden desencadenar un entorno celular altamente oxidante, en donde los niveles de los radicales libre, tales como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) se ve aumentado (Arbona y col., 2017; Chen y col., 2011). Es por ello, que como sistema de análisis del efecto fisiológico de la expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 frente a condiciones de salinidad, es que se decidió realizar un análisis cualitativo y semicuantitativo de los niveles de producción de peróxido de hidrogeno en hojas sometidas a tratamiento con NaCl.

Una vez determinados los niveles de carotenoides y clorofilas a y b de las líneas transgénicas de *A. deliciosa* Al4 y Al7 que expresan los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 respectivamente (Sección 3.3.3.1), se procedió a realizar un ensayo agudo de estrés salino en hojas de *A. deliciosa* (Sección 2.14.1) y la posterior tinción con DAB (Sección 2.14.2) como método detección de la producción de peróxido de hidrógeno. El DAB se oxida con peróxido de hidrógeno en presencia de proteínas que contienen el grupo hemo (como las peroxidases), generándose un precipitado de color marrón oscuro. Este precipitado se puede utilizar como una marca para detectar la presencia y distribución de peróxido de hidrógeno en las células vegetales (Daudi y O'Brien, 2012).

Se utilizaron 3 líneas transgénicas A14 (A14 L3, A14 L5 y A14 L8) y 3 líneas transgénicas A17 (A17 L1, A17 L2 y A17 L5), las cuales además poseían mayores niveles de carotenoides y clorofila que las plantas silvestres (Figura 21 y 22). En la Figura 23.A se muestran las hojas de *A. deliciosa* teñidas con DAB post tratamiento con NaCl 200mM por 24 y 48 horas. En paralelo a la imagen normal post tinción con DAB, también se muestra una imagen en escala de colores, que muestra de mejor manera el nivel de intensidad de tinción con DAB. Como se puede observar, y tal como se esperaba, la tinción con DAB es mayor a medida que aumenta el periodo de tiempo del tratamiento con NaCl.

A pesar de que a las 48 horas de tratamiento con NaCl tanto las líneas transgénicas como los controles silvestres (WT y WT') parecen presentar similares niveles de tinción con DAB, a las 0 y 24 horas las líneas transgénicas A14 y A17 muestran menores niveles de tinción con DAB en comparación a los controles WT y WT'. Para poder observar lo anterior de mejor manera, se cuantificó el área con mayores niveles de tinción con DAB, es decir el área que poseía píxeles entre 170 y 255 según escala de figura 23.A (Figura 23.B). Es importante destacar que este análisis es meramente semicuantitativo y tiene la finalidad de entregar una imagen más clara de los resultados obtenidos, por lo cual análisis estadísticos no son pertinentes. En la figura 23.B se muestra los niveles de tinción con DAB para cada una de la líneas y controles. En el tiempo 0h (Figura 23.B), se observa que todas las líneas transgénicas A14 y A17 muestran una menor superficie con altos niveles de tinción con DAB respecto a los controles, mientras que a las 24h de tratamiento las líneas A14 L3, A14 L5, A17 L2 y A17 L5 (Figura 23.B) presentan una menor superficie con altos niveles de peróxido de hidrógeno. Situación que no se mantiene a las 48h,

en donde incluso se observa que algunas líneas tienen mayor superficie con altos niveles de tinción por oxidación de DAB (Figura 17.B).



B

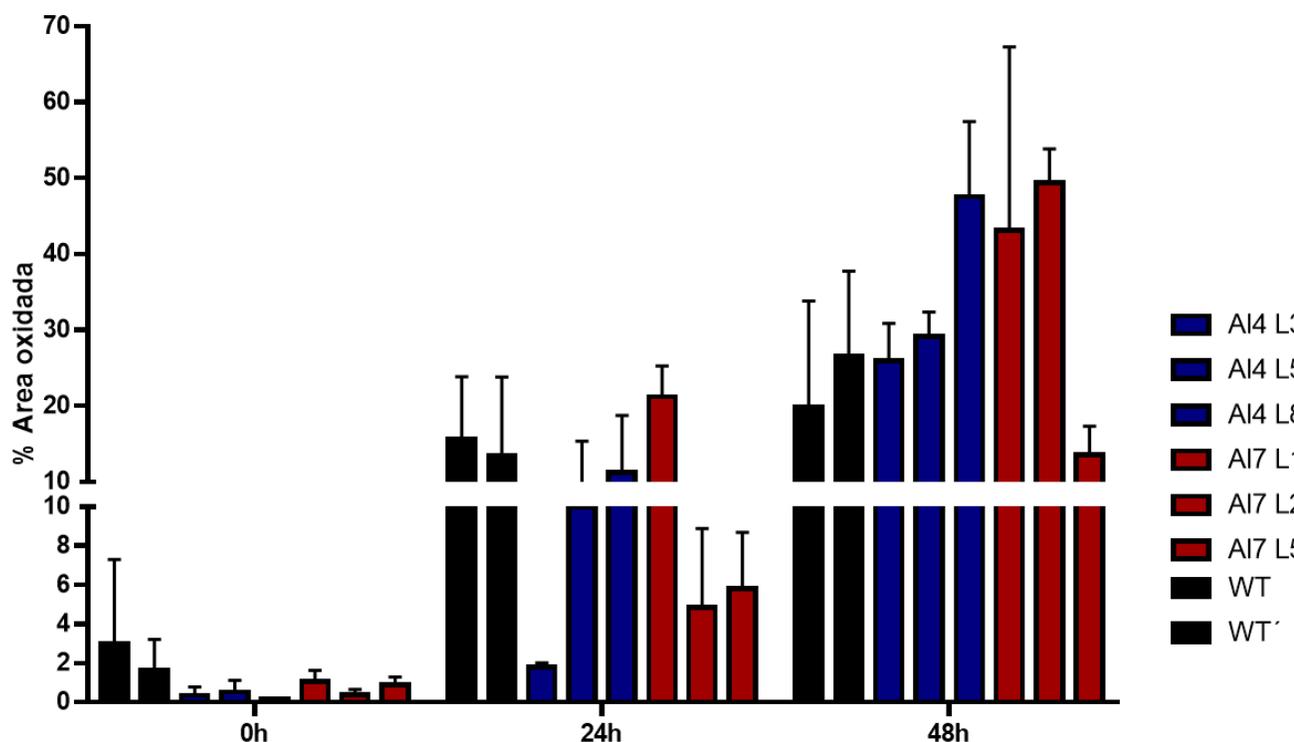


Figura 23. Análisis cualitativo y semicuantitativo de los niveles de peróxido de hidrogeno de hojas de líneas transgénicas de *A. deliciosa* para los genes *DcAlfin4* y *DcAlfin7* sometidas a tratamiento agudo con NaCl. (A) Imágenes de hojas de *A. deliciosa* post tratamiento con NaCl 200mM (0, 24 y 48 h) teñidas con DAB, así como una imagen analizada por el software ImageJ, en donde se puede observar de mejor manera la intensidad de la tinción con DAB en cada línea. (B) Cuantificación del área mayormente oxidada, considerando áreas con intensidades de 170 a 255 (Figura 17.A), para cada línea AI4, AI7 y control WT. AI4: líneas de *A.deliciosa* transgénicas para el gen *DcAlfin4*; AI7: líneas de *A. deliciosa* transgénicas para el gen *DcAlfin7*; WT: Control sin transformar.

Como se puede observar, los resultados obtenidos mediante ensayos de tinción con DAB presentan una alta tasa de variabilidad, lo que nos impide correlacionar el aumento en los niveles de carotenoides con una disminución en la producción de peróxido de hidrógeno. Por lo cual, es

necesario analizar los niveles de oxidación por medio de otras metodologías, tales como, ensayos de peroxidación lipídica y de fuga electrolítica.

4. DISCUSIÓN.

4.1. Los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 responde transcripcionalmente en plantas de *D. carota* sometidas a tratamiento agudo por sal.

Los genes de la familia Alfin-like, son genes que codifican para factores de transcripción (FT) ALFIN, los cuales se han visto relacionados con múltiples procesos de desarrollo en plantas, así como a la respuesta frente a condiciones de estrés abiótico (Chandrika y col., 2013; Molitor y col., 2014; Tao y col., 2018; Wei y col., 2015).

Se ha reportado que los FTs ALFIN, son capaces de unirse a secuencias específicas dentro del ADN y a marcas epigenéticas de regiones transcripcionalmente activas (Lee y col., 2009; Molitor y col., 2014; Peng y col., 2018). ALFIN han sido descritos mayoritariamente como componentes de la regulación negativa de la transcripción, en donde se ha identificado que el dominio PAL (por PHD-associated ALFIN domain; ex dominio DUF3594) como capaz de interactuar con componentes estructurales del complejo de represión polycom (PRC1, por sus siglas en inglés Polycomb Repressive Complex 1)(Molitor y col., 2014; Peng y col., 2018). PRC1 es un “escritor” de la marca epigenética de represión estable H2Aub1 (Monoubiquitinación de la histona H2A)(Molitor y col., 2014; Peng y col., 2018; Tao y col., 2018). De este modo, PRC1 estaría utilizando a los FTs ALFIN como “lectores” de la marca epigenética H3K4me3, para de este modo generar la transición de un estado activo a un estado inactivo de la cromatina (Peng y col., 2018). Contrario a lo anterior, también se ha reportado la capacidad de los FT ALFIN de activar la transcripción, pero el proceso ha sido descrito en mucho menor detalle. Se ha descrito que *in vitro* el FT ALFIN1 pueden unirse a la región promotora del gen inducible por sal MsPRP2 (Bastola y col., 1998) y que la sobreexpresión del gen Alfin1 de alfalfa (*Medicago sativa*) genera un

aumento en la expresión MsPRP2 (Winicov, 2000; Winicov y col., 2004). En nuestro grupo de laboratorio, también se tienen resultados que apoyan esta idea, en donde los FTs DcALFIN4 y DcALFIN7 son capaces de unirse al promotor del gen DcPsy2 e inducir la expresión de genes reporteros en levadura (Simpson, 2015).

Respecto a su participación en estrés abiótico, se ha reportado que la expresión de los genes Alfin-like, es inducida en distintas condiciones de estrés salino, sequía y frío. *A. thaliana* posee siete genes Alfin, los cuales responden con un aumento a nivel transcripcional frente a condiciones de estrés salino, siendo el gen AtAlfin5 el mayormente involucrado en la respuesta frente a condiciones de salinidad (Wei y col., 2015). En *Atriplex hortensis* (Armuelle), se ha descrito que uno de los cuatro genes Alfin-like responde con un aumento a nivel transcripcional (AhAlfin1), mientras que AhAlfin2, AhAlfin3 y AhAlfin4 disminuyen sus niveles de transcrito en la misma condición (Tao y col., 2018). Al igual que lo reportado en la literatura, en esta tesis determinamos que DcAlfin4 y DcAlfin7 de *D. carota* están respondiendo frente al tratamiento con NaCl, mas, la expresión de cada gen es tejido específica. DcAlfin4 y DcAlfin7 presentan un aumento en los niveles relativos de transcrito en hojas de *D. carota*, mientras que solo DcAlfin7 presenta un aumento significativo en los niveles de transcrito en las raíces de plantas sometidas a tratamiento con NaCl 200mM (figura 7). Lo anterior, nos indica que ambos genes pueden estar involucrados en el proceso de respuesta y tolerancia a estrés abiótico en *D. carota*, pero participando de distinta manera y en distintos tejidos, situación similar a la del FT de la familia AREB/ABF DcAREB3 que se inducen en la raíz y en hojas de *D. carota* sometidas a condiciones de estrés salino (Figura 7)(Simpson y col., 2018). De este modo, se propone a los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 como posibles participantes en el mecanismo molecular de respuesta y tolerancia frente a condiciones de estrés abiótico. Hipótesis que se ve corroborada al someter a tratamiento

de salinidad y sequía las líneas de *A. thaliana* que expresan de manera heteróloga los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Sección 3.2).

4.2. La expresión heteróloga de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en *A. thaliana* genera un aumento en los niveles relativos de transcrito del gen AtPsy y en el contenido de carotenoides y clorofilas.

La caracterización funcional de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 para determinar si participan en aumentar la tolerancia a estrés salino e hídrico en plantas, se realizó en líneas T3 y T4 homocigotas de *A. thaliana*. Se generaron 8 líneas transgénicas para el gen DcAlfin4 (Líneas A14) y 6 líneas transgénicas para el gen DcAlfin7 (Líneas A17; figura 9), de las cuales se obtuvieron 5 líneas A14 y 4 líneas A17 homocigotas T3 para cada transgén (Sección 3.2.1). El análisis molecular de estas líneas reveló que existe una correlación parcial entre la abundancia de transcrito del transgén DcAlfin4 con un aumento en la expresión de AtPsy y en los niveles de carotenoides totales y clorofilas en *A. thaliana* (Figura 10 y 11), mientras que para el gen DcAlfin7 no se observa una correlación directa entre los niveles de transcrito, la inducción de AtPsy y el contenido de carotenoides (Figura 10 y 11 y Anexo 11). Mientras la mayoría de las líneas A14 muestran esta correlación, solo la línea A17 L1 presenta mayores niveles de transcrito de AtPsy y carotenoides. Sin embargo, otras líneas A17 (A17 L2 y A17 L4) no presentaron un aumento en los niveles de expresión AtPsy, pero si presentaron un aumento en los niveles de carotenoides totales (Anexo 11).

En *D. carota* se ha reportado que los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 son capaces de unirse al promotor del gen DcPsy2 en *D. carota* (Simpson, 2015), el cual es un gen que codifica para una enzima clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides y la hormona ácido abscísico (ABA) (Li y col., 2008;

Rosas-Saavedra y Stange, 2016; Ruiz-Sola y col., 2014). Al analizar el promotor del gen AtPys, no se encontraron motivos de unión para FTs ALFIN, mas, al analizar *in silico* los promotores de otros genes relevantes en la ruta de biosíntesis de carotenoides/ABA en Arabidopsis y de la ruta MEP (Figura 3.B), poseían motivos de unión para FTs ALFIN. Dentro de los promotores de genes encontrados como posibles blancos de los FTs ALFIN, se encuentran los genes AtDXS, AtDXR, AtLCYB, AtCHXB1, AtNCED1, AtNCED4. Este análisis *in silico* puede, parcialmente, dar explicación de la diferencia en los niveles de transcrito de AtPsy en las distintas líneas AI4 y AI7, sugiriendo que el aumento en la expresión de este gen podría deberse a una inducción indirecta por medio de los genes anteriormente mencionados y no por efecto directo de los FT DcALFIN4 y DcALFIN7 sobre el promotor de AtPsy. Situación que podría explicar el aumento de los carotenoides totales de las líneas AI7 que no presentan un aumento en los transcritos de AtPsy (Anexo 11).

Por ejemplo, los dos primeros pasos en la ruta de MEP son catalizados por las enzimas 5-fosfato sintasa de desoxixilulosa (DXS) y reductoisomerasa (DXR). Aunque recientemente se ha demostrado que DXS es la principal etapa de control de flujo de la vía MEP (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2015), se ha reportado que tanto las enzimas DXS como DXR pueden promover un aumento en los productos derivados de MEP, tales como lo son los carotenoides, ABA y las clorofilas (Chang y col., 2014; Simpson y col., 2016; Wright y col., 2014). Además, también se ha descrito que en zanahoria la sobreexpresión de DXS es capaz de generar un aumento en los niveles de transcrito de genes relacionados en la biosíntesis de carotenoides tales como lo es DcPsy1 y 2 (Simpson y col., 2016). Lo anterior también coincide con las líneas AI4 L2, AI4 L5 que muestran un aumento significativo en los niveles de clorofila a y AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1 que presentan un aumento significativo en los niveles de clorofila b (Figura 11.B y C). Además, a pesar de que la línea AI4 L1, no muestra un aumento significativo en el contenido de

carotenoides y clorofilas, éste si muestra una tendencia al aumento, lo cual se condice con los resultados obtenidos en las otras líneas AI4.

También se ha descrito que existe una retroalimentación positiva entre la síntesis de ABA y sus precursores metabólicos (Li y col., 2008; Meier y col., 2011; Ruiz-Sola y col., 2014; Simpson y col., 2016), lo que se relaciona con la expresión de genes tales como AtCHB1, AtNCED1 y AtNCED2, que son parte de la ruta de degradación de carotenoides y de biosíntesis de ABA. Adicionalmente, promotores de genes relacionados a la ruta de biosíntesis de carotenoides y ABA, tales como el gen AtAREB2/AtABF4(Kang y col., 2002), también presentan motivos de unión a FTs ALFIN. AtAREB2 es un gen que codifica para un FT de la familia de AREB/ABF relacionados con la respuesta de tolerancia a estrés abiótico dependiente de ABA (Kang y col., 2002; Yoshida y col., 2014). Interesantemente, AtPsy presenta múltiples dominios de unión para FTs de la familia AREB/ABF en su región promotora, lo que podría apoyar la idea de que la inducción en los niveles de transcrito de AtPsy está ocurriendo de manera indirecta en las líneas de Arabidopsis transgénicas AI4 y AI7.

De este modo, es posible proponer a los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 como genes que codifican para FTs, que son capaces de regular positivamente, ya sea de manera directa o indirecta la síntesis de carotenoides y clorofilas en plantas, generando así, plantas con mayor contenido de moléculas antioxidantes con lo que se espera tengan mayor capacidad de eliminar radicales libres producto de condiciones de estrés abiótico (Chen y col., 2011; Kim y col., 2012; Pateraki y Kanellis, 2010).

4.3. Las líneas de *A. thaliana* transgénicas para el gen DcAlfin4 presentan una mayor tolerancia a tratamientos de salinidad y sequía que líneas transgénicas para el gen DcAlfin7.

Para determinar si las líneas transgénicas AI4 y AI7 de *A. thaliana* presentaban una mayor tolerancia frente a condiciones de salinidad y/o sequía, se procedió a someter dichas plantas a riego con NaCl (tratamiento salinidad; Sección 2.8 y Sección 3.2.4) o a cese de riego (tratamiento sequía; Sección 2.8 y Sección 3.2.5). En general, a nivel fenotípico, las líneas transgénicas de *A. thaliana* AI4 y AI7 mostraron un mejor rendimiento en condiciones de sal respecto al control VSI (Figura 12, Anexo 7). En condiciones de riego control, todas las líneas presentaron una tasa de sobrevivencia del 100%, mientras que en la condición de riego con sal 200 mM, tanto las líneas AI4 como AI7 mostraron una tasa de sobrevivencia cercanas al 100%, en comparación al control VSI con una tasa de sobrevivencia del 83,48% en la misma condición (Figura 13.A).

Por otro lado, a pesar de que se observó que en la condición de riego normal, las líneas tenían largos distintos (Figura 13.B), con líneas de mayor largo respecto al control VSI (AI4 L3, AI4 L5, AI7 L2 y AI7 L3), otras de igual tamaño (AI4 L1, AI4 L2, AI4 L4 y AI7 L4) y una de menor tamaño (AI7 L1), interesantemente se observó que todas las plantas de las líneas transgénicas AI4 presentaron un mayor largo post tratamiento con NaCl en comparación al control VSI. Situación distinta ocurre en las líneas AI7, en donde solo la línea AI7 L1 presenta un largo post tratamiento con NaCl mayor al control VSI y el resto de las líneas AI7 muestran un tamaño similar a las líneas VSI regadas con sal. Lo anterior es el reflejo del nivel de inhibición del crecimiento que causa el estrés por NaCl en las plantas, en donde las líneas transgénicas AI4 parecen tener una mayor tolerancia a salinidad en comparación con la línea control línea VSI y las líneas AI7 (exceptuando a la línea AI7 L1).

Como se puede observar en la figura 13.C y E, todas las plantas de las líneas AI4 presentan una menor reducción de peso fresco y biomasa al ser sometidas a riego con sal, en comparación con el control VSI y con las líneas AI7, en donde, solo la línea AI7 L1 presenta un comportamiento similar a las líneas AI4. De lo anterior se puede desprender que la sobreexpresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 son capaces de aumentar la sobrevivencia de plantas de *A. thaliana* transgénicas en condiciones de salinidad. Aun así, son principalmente las líneas transgénicas para DcAlfin4 las que presentan un mejor rendimiento bajo el tratamiento con NaCl. Estos resultados se conciben con aquellos reportados en estudios previos. En donde se ha informado que la sobreexpresión de algunos otros genes Alfin, como Alfin1 de *Medicago sativa* (Alfalfa), GmPHD2 de *Glycine max* (soya), AhAlfin1 de *A. hortensis* y AtAlfin5 de *A. thaliana* son capaces de aumentar la tolerancia al estrés salino e hídrico (Bastola y col., 1998; Tao y col., 2018; Wei y col., 2009; Wei y col., 2015; Winicov, 2000). Interesantemente, las líneas transgénicas AI4 L1, AI4 L2, AI4 L5 y AI7 L1 que presentan una alta tolerancia al tratamiento con NaCl, también muestran un aumento en los niveles de transcrito de AtPsy y un aumento en sus niveles de carotenoides y clorofilas. Hecho que genera interés en el estudiar en mayor detalle cuales son los mecanismos moleculares por los cuales los FTs DcALFIN4 y DcALFIN7 están produciendo un aumento en los niveles de carotenoides y de tolerancia a salinidad. Una buena aproximación global para entender dicho proceso, sería el poder realizar análisis mediante ChIP-Seq y así determinar los blancos moleculares de los FT en cuestión. Por otro lado, uno de los primeros procesos fisiológicos que se ven afectados en plantas producto de condiciones de estrés, es la capacidad fotosintética (Singh y Thakur, 2018). Se ha reportado que un aumento en las clorofilas y moléculas precursoras es capaz de mejorar la capacidad fotosintética y el fitness de la planta (Moreno y col., 2016). Es por ello que, considerando que las líneas transgénicas AI4 y AI7 también presentan un aumento

en el contenido de clorofila a y b, sería interesante el estudiar la correlación que podría existir entre un mayor contenido de clorofilas y la capacidad fotosintética de las líneas AI4 y AI7 en condiciones de estrés.

Respecto al ensayo de sequía, llamó la atención que todas las líneas transgénica (incluyendo a la línea VSI) presentaron una sobrevivencia de entre un 90 a un 100% luego del tratamiento, sin diferencias significativas entre ellas (Figura 15.A). Esto se puede deber a que el tiempo que se mantuvo las plantas sin riego no fue suficiente para afectar de manera significativa diferencias en la sobrevivencia de la planta. A pesar de lo anterior, el resto de las características, tales como el largo de la planta, el peso fresco y peso seco se vieron afectadas por el tratamiento de sequía. Es interesante mencionar, que todas las líneas transgénicas AI4 y AI7 presentaron menor tamaño (de 32 a 34 cm aproximadamente) en comparación al control VSI (36 cm aproximadamente) en condiciones de riego normal (Figura 15.B), situación que es contraria a lo observado en el ensayo de tratamiento con NaCl donde todas las líneas transgénicas en condición de riego normal presentaron un largo mayor (20 a 21 cm) en comparación al control VSI (19 cm aproximadamente; Figura 13.B). Esta diferencia en el crecimiento de las plantas, puede deberse a que ambos ensayos se realizaron en diferentes lugares y por tanto no podrían ser comparables. El ensayo de NaCl se llevó a cabo en el invernadero del Centro de Biología Molecular Vegetal de la Universidad de Chile, mientras que el ensayo de sequía fue llevado a cabo en el invernadero del Instituto VIB-UGent (Gante, Bélgica) mientras estaba realizando mi pasantía en el extranjero. Es por ello, que cada ensayo debe ser comparado consigo mismo solamente.

Además, se observó que todas las líneas AI4 en condiciones de sequía son del mismo o mayor largo que las plantas de las líneas VSI (a pesar de ser de menor tamaño en condiciones de riego normal), situación que es distinta en la línea AI7 L1 que muestra una disminución de su tamaño

en condiciones de sequía respecto al control VSI (Figura 15.B). Esto sugiere que las líneas Al4 son más tolerantes a sequía que plantas controles, contrario a la línea Al7 L1 que está significativamente más afectada en comparación al control. Respecto al peso fresco de las líneas Al4 y Al7 sometidas al tratamiento de sequía, se observó que estas líneas presentaron menor peso fresco en condiciones de riego normal y sequía respecto a VSI, pero no mostraron diferencias significativas en peso fresco respecto a sus propios controles, presentando una leve disminución de la reducción de peso fresco (Figura 15.C y D). A diferencia de lo anterior (peso fresco), pero similar a lo ocurrido en el largo de la planta (Figura 15.B), las líneas transgénicas Al4 tienen menor peso seco en condiciones de riego normal en comparación al control VSI, mas, lo anterior no se traduce en un menor peso seco en condiciones de estrés hídrico, en donde las líneas Al4 parecen no ser afectadas por el tratamiento de sequía. Lo anterior se traduce en una tasa muy baja de reducción de biomasa en las líneas transgénicas Al4 respecto al control (Figura 15.E y F). De este modo, a pesar de que en estas condiciones las plantas transgénicas de Arabidopsis Al4 son más pequeñas que las líneas VSI, están siendo menos afectadas por la falta de agua. Situación que se condice con la reducción de peso fresco y la reducción de biomasa mostradas por las mismas líneas en el tratamiento con NaCl (Figura 13.C Y E).

Independientemente del rendimiento, las plantas pueden aclimatarse a diversas condiciones ambientales, desencadenando diferentes mecanismos para enfrentar la situación estresante (Gepstein y Glick, 2013). De este modo, se podría decir que la expresión del gen DcAlfin4 (en estas condiciones de cultivo), estaría generando plantas más preparadas para sobrevivir a condiciones de estrés salino e hídrico. Teniendo en consideración que la proyección biotecnológica de esta tesis es generar portainjertos de kiwi tolerantes a estrés salino y de sequía que se vean menos afectados producto de las condiciones de EA, es que se sugiere al gen

DcAlfin4 como una buena herramienta para aumentar la tolerancia en plantas de *A. deliciosa*. En suma a lo anterior, es importante tener en consideración que no todos los FT ALFIN están involucrados del mismo modo en la respuesta y tolerancia frente a condiciones de estrés abiótico. Por ejemplo, la expresión constitutiva de AhAlfin2, AhAlfin3 y AhAlfin4 de *A. hortensis* en *A. thaliana* causa una respuesta hipersensible al estrés salino (Tao y col., 2018). Del mismo modo, la sobreexpresión de AtAlfin7 reduce la tolerancia de la planta al estrés salino, mientras que la mutación por pérdida de función de AtAlfin7 promovía el crecimiento de la raíz en condiciones normales y salinas (Song y col., 2013). Además, algunos miembros de la familia de FT ALFIN pueden estar involucrados en otras actividades biológicas. Por ejemplo, AtAlfin6 de *Arabidopsis* es necesario para el alargamiento de los pelos radiculares en condiciones de deficiencia de fósforo (Chandrika y col., 2013). Estos antecedentes indican que existe una divergencia funcional de los miembros ALFIN en diferentes especies de plantas. Estos resultados contrastantes respecto a la funcionalidad frente a estrés abiótico por parte de los FT ALFIN, es similar a lo observado en las líneas de *A. thaliana* transgénicas para DcAlfin4 y DcAlfin7. En esta tesis observamos que DcAlfin4 genera un aumento en la tolerancia a salinidad y sequía en las líneas transgénicas de *A. thaliana*, mientras que DcAlfin7 estaría parcialmente involucrado (o en menor medida que DcAlfin4) en conferir tolerancia a salinidad y no genera un efecto frente a condiciones de sequía. Aunque en el ensayo de sequía solo se utilizó la línea Al7 L1 (la única línea Al7 con tolerancia a salinidad), en función de los resultados obtenidos y considerando el menor rendimiento de las otras líneas Al7 en condiciones de salinidad, es que se espera un comportamiento similar de éstas líneas AL7 en tratamiento de sequía.

Teniendo en consideración los resultados obtenidos en los ensayos de expresión génica, cuantificación de carotenoides y tolerancia a sal y sequía, junto con las funciones descritas para

los FT de la familia ALFIN, se puede sugerir que la expresión heteróloga de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 estarían modificando el contexto epigenético, generándose tanto una regulación positiva como negativa sobre múltiples genes o rutas de respuesta, en donde particularmente la ruta de biosíntesis de carotenoides/ABA parece estar siendo regulada de manera positiva por estos FT (sobre todo por DcALFIN4) previo a ser sometidas a condiciones de estrés. Los mayores niveles de moléculas antioxidantes y precursores metabólicos de ABA, como lo son los carotenoides, y los mayores niveles de clorofilas a y b, que son componentes estructurales de los fotosistemas, nos permite proponer que las plantas de *A. thaliana* transgénicas poseen un estado basal mejor preparado para posibles condiciones de EA, en particular estrés salino. Situación similar a lo que ocurre en plantas de *A. thaliana* que expresan el gen AhAlfin1 de *A. hortensis*, en donde la respuesta a ABA por parte de estas plantas se veía incrementada de manera basal (Tao y col., 2018).

4.4. La expresión heteróloga de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en *A. deliciosa* genera un aumento en los niveles de carotenoides totales y clorofilas, así como una reducción parcial de especies reactivas de oxígeno en tratamiento agudo con NaCl.

A modo de aplicación biotecnológica, se propuso desarrollar una plataforma biotecnológica que permitiera aumentar la tolerancia a salinidad y sequía de plantas de interés comercial, tal y como lo es el kiwi (*A. deliciosa*). *A. deliciosa* representa uno de los cultivo frutales más importantes para nuestro país, posicionando a Chile como el tercer mayor exportador de kiwis en el mundo y el segundo mayor del hemisferio sur (Bravo, 2014). Uno de los mayores problemas para el cultivo de kiwi, es su alta sensibilidad a suelos salinos y falta de agua (Chartzoulakis y col., 1995). Lo anterior, sumado a los efectos del cambio climático, hace imperante el generar variedades y

alternativas que permitan a plantas, en particular a portainjertos de kiwi sobrevivir a condiciones adversas de estrés abiótico, tales como lo son la salinidad y sequía.

Considerando que la expresión heteróloga y ectópica de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 fueron capaces de aumentar los niveles de clorofilas y carotenoides totales, así como mejorar su rendimiento en condiciones de estrés salino e hídrico en *A. thaliana* (particularmente DcAlfin4), es que se procedió a generar líneas transgénicas de *A. deliciosa* que expresen los FT codificados por los genes DcAlfin4 y DcAlfin7. A pesar de que DcAlfin7 no mostro conferir tolerancia sustancialmente mayor frente a condiciones de estrés salino e hídrico en Arabidopsis, se decidió incluirlo en la transformación de *A. deliciosa* como condición comparativa y con la finalidad de observar si mostraba el mismo resultado en kiwi.

Para transformar *A. deliciosa*, a diferencia de *A. thaliana* que se transformó mediante inmersión floral con *A. tumefaciens* (Sección 2.6.1), es necesario un sistema de regeneración *in vitro*. En nuestro laboratorio contamos con un sistema estandarizado de regeneración *in vitro* de *A. deliciosa* mediante organogénesis somática a partir de explantes de hojas y peciolo (Sección 2.9.1). Particularmente, en *A. deliciosa* el desarrollo de callo a partir de un explante y la inducción de nuevos órganos a partir del callo dependen de la concentración de hormonas exógenas del tipo citoquinina y auxinas (Akbas y col., 2009; Arigita y col., 2005; Centeno y col., 1996). Se ha demostrado que las citoquininas no solo tienen un papel importante en inducir proliferación celular en las distintas fases de la micropropagación, sino que también regulan el desarrollo de las plántulas regeneradas (Saeiahagh y col., 2019). Las citoquininas en conjunto con las auxinas controlan el ciclo celular de las células vegetales. Particularmente, en la micropropagación por cultivos de tejidos, las auxinas NAA y 2,4-D se utilizan para inducir la formación de raíces en brotes y callos no diferenciados, así como para estimular la división celular (Delker y col., 2008;

Simon y Petrasek, 2011), mientras que las citoquininas regulan la entrada de la célula en la fase G_1 tras la mitosis y la transición entre las fases G_2/M . Además en cultivo *in vitro*, las citoquininas promueven la formación de brotes en diversos tipos de explantes, como callos, hojas y cotiledones de diversas especies (Mok y Mok, 2001). Por ello, es importante utilizar una combinación hormonal correcta para inducir la formación y proliferación de callo, la generación de brotes y el enraizamiento de los brotes de manera eficiente.

Mediante la utilización del protocolo de organogénesis somática de *A. deliciosa* (Sección 2.9.1) y transformación mediante *A. tumefaciens* (sección 2.9.2), se generaron líneas transformantes para los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 (Líneas Al4 y Al7), obteniendo un 88% de eficiencia de transformación. Cabe destacar que el proceso de regeneración de las plantas transformantes tardó aproximadamente el doble de tiempo (10 a 12 meses) en comparación al proceso sin agente de selección (Figura 16). Lo anterior debido principalmente a la presión de selección que ejerce el agente de selección en el medio. Es posible disminuir el tiempo de regeneración de plantas transformantes si se disminuye la concentración de agente de selección, pero a cambio se sacrifica la eficiencia de la generación de líneas realmente transgénicas aumentándose el número de falsos positivos de transformación.

Luego de realizar la genotipificación y análisis de abundancia de transcrito de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 de las líneas transgénicas de *A. deliciosa* Al4 y Al7 (Sección 3.3.2), se observó que todas las líneas muestran diferentes niveles de expresión a pensar de que todas las líneas están transformadas con la misma construcción (Figura 19 y 20). Lo anterior, puede ser debido a que el sistema de transformación mediante *A. tumefaciens* es un sistema de transformación al azar. Por lo cual, el transgén se puede ubicar en zonas de mayor o menor tasa transcripcional debido a que se insertan en un contexto genético distinto o puede haber más de un inserto para cada

línea (Azpiroz-Leehan y Feldmann, 1997; Krysan y col., 2002). También se debe considerar que el proceso de organogénesis somática puede generar plantas quimeras, de este modo, una misma planta puede tener células provenientes de eventos insercionales distintos, así como células no transformadas protegidas del agente de selección por células adyacentes transformadas (Chen, 2011; Faize y col., 2010).

En cuanto al contenido de carotenoides y clorofila se observó que de las 8 líneas AI4 analizadas, 4 líneas (AI4 L3, AI4 L5, AI4 L8 y AI4 L9) muestran un aumento respecto a los controles, 3 líneas (AI4 L1, AI4 L2 y AI4 L7) no muestran diferencias respecto a los controles WT y VSI, y una de ellas muestra disminución en los niveles de carotenoides (AI4 L6) (Figura 21.A). Interesantemente, este aumento en el contenido de carotenoides también se ve acompañado con un aumento en los niveles de clorofila a y clorofila b (Figura 21.B y C), situación similar a lo ocurrido en las líneas transgénicas AI4 de *A. thaliana* (Sección 3.2.3 y Sección 4.2.1). A pesar de ello, no existe una relación directa en los niveles de transcrito de DcAlfin4 y los niveles de carotenoides y clorofilas en las líneas transgénicas de *A. deliciosa*. Por otro lado, las 5 líneas transgénicas de *A. deliciosa* AI7, mostraron un aumento tanto en el contenido de carotenoides totales (Figura 22.A) como de clorofila a y b (Figura 22.B y C). Lo anterior se correlaciona con lo obtenido previamente en las líneas transgénicas de AI7 de *A. thaliana*, en donde la expresión heteróloga de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 generó un aumento en los niveles de carotenoides y clorofila a y b en hojas de roseta (Figura 11).

El mecanismo exacto por el cual los FT DcALFIN4 y DcALFIN7 estaría regulando la biosíntesis de carotenoides y de clorofilas en las líneas transgénicas aún sigue siendo desconocido para nosotros, dado que no existe en literatura hallazgos vinculantes entre los FT de la familia ALFIN y la biosíntesis de carotenoides y clorofilas. Probablemente, exista una regulación positiva sobre

genes que codifican para enzimas involucradas en la ruta MEP (ruta de síntesis de precursores metabólicos de carotenoides y clorofilas), así como de enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides, tal como se discutió previamente.

Respecto a la tolerancia frente a estrés abiótico, aunque no fue posible realizar los mismos ensayos que en *Arabidopsis*, esperamos que las líneas transgénicas de kiwi tengan mejor desempeño en condiciones de salinidad y sequía. Dado que un aumento en la actividad antioxidante se ha relacionado con una mejor protección del fotosistema y un aumento en la tolerancia al estrés abiótico (Arbona y col., 2009), determinamos si estas líneas tienen mayor protección antioxidante (lo cual podría estar relacionado a los mayores niveles de carotenoides) mediante ensayos de salinidad agudos y determinación de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) tal como lo es el H_2O_2 . El hecho que líneas transgénicas de *A. deliciosa* Al4 y Al7 mostraron un estado basal con menores niveles de peróxido de hidrogeno (grado de tinción por DAB) previo al tratamiento con NaCl (tiempo 0h) y a 24 h, respecto al control WT (Figura 23,) nos permite sugerir que la expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 en *A. deliciosa* están modificando lo niveles de ROS dentro del entorno celular de las hojas de kiwi previo a cualquier tipo de estrés, así como también retardando el progreso de la producción de peróxido de hidrogeno durante un tratamiento agudo con NaCl. Lo anterior se apoya con el hecho que hojas de kiwi transgénicos tienen mayor contenido de carotenoides, los cuales junto a otros terpenoides, se producen en exceso en varias condiciones de estrés abiótico (Espinoza y col., 2013; Kim y col., 2012) y podrían tener un papel protector al estabilizar la fase lipídica de las membranas de tilacoides de los cloroplastos (Volkova y col., 2009). Particularmente, los carotenoides actúan como absorbentes del exceso de luz, radiación UV y también como poderosos antioxidantes (Binder y col., 2009; Pateraki y Kanellis, 2010). Además, los

carotenoides también son fuentes de compuestos de señalización volátiles y no volátiles (Beck y col., 2014; Hauser y col., 2011). En este caso se destaca particularmente a ABA, un sesquiterpeno derivado de los carotenoides con varias funciones en las respuestas al estrés abiótico (Arbona y col., 2017; Fujita y col., 2011; Kim, 2006; Peleg y Blumwald, 2011; Simpson y col., 2018; Yoshida y col., 2014).

A pesar de que el análisis de DAB en hojas de *A. deliciosa*, es una buena primera aproximación para determinar los niveles de oxidación producto de un tratamiento agudo con NaCl, no es posible determinar si en *A. deliciosa* DcAlfin4 o DcAlfin7 juegan un rol determinante (y si uno de ellos está involucrado en mayor o menor medida) respecto a la disminución a estrés oxidativo y la tolerancia a estrés. Lo anterior debido a que la tinción con DAB es un análisis en esencia cualitativo y los datos obtenidos mediante el procesamiento de la imágenes mostraron una gran desviación estándar, debido a la naturaleza misma del experimento. Es por ello que este ensayo debe ser complementado con otros experimentos que permitan medir otras señales de estrés producto de un tratamiento agudo con NaCl, tales como peroxidación lipídica o permeabilidad de iones (fuga electrolítica) producto del daño en las membranas.

Además, es necesario monitorear el efecto de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 sobre una planta completa sometida a condiciones de salinidad y sequía, ya que este sería un modelo semejante a lo que ocurre en la naturaleza, en donde son las raíces el órgano que está en contacto directo con el estrés salino o déficit de agua. Es por ello que el próxima etapa será la propagación masiva de las líneas transgénicas para realizar ensayos de tolerancia a salinidad y sequia semejantes a realizado en *A. thaliana*, esperando encontrar relación entre la expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 con la cantidad de carotenoides, expresión de genes que codifican para precursores de ABA, nivel de ABA en hojas y raíces y tolerancia estrés abiótico.

CONCLUSIONES.

- Los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 responden diferencialmente a nivel transcripcional al someter plantas de *D. carota* a tratamiento agudo con NaCl. DcAlfin4 responde transcripcionalmente en raíces de plantas de *D. carota* tratadas con NaCl, mientras que DcAlfin7 aumenta sus niveles de transcrito tanto en raíz como en hojas de *D. carota*.
- La expresión heteróloga del gen DcAlfin4 genera un aumento en la expresión de AtPsy, el contenido de carotenoides totales y de clorofila a y b al ser expresado de manera heteróloga en plantas de *A. thaliana* y genera una mayor tasa de sobrevivencia y una menor reducción de peso fresco y de biomasa frente a condiciones de estrés salino e hídrico.
- La expresión heteróloga del gen DcAlfin7 en *A. thaliana* produce plantas con mayor tasa de sobrevivencia en tratamiento con sal. Sin embargo, no muestran una respuesta consensuada de tolerancia a salinidad y sequía dado que poseen una reducción de peso fresco y biomasa similar a plantas WT.
- Aunque los ensayos de tolerancia a sequía deben ser realizados con mayor número de líneas DcAlfin7, la línea Al7 L1 que presenta la mayor tolerancia a salinidad, es sensible a sequía.
- La expresión heteróloga del gen DcAlfin4 y DcAlfin7, pero principalmente DcAlfin7, en *A. deliciosa*, genera un aumento en carotenoides en hojas, mientras que el análisis cualitativo de presencia de peróxido de hidrógeno muestra que las líneas transgénicas DcAlfin4 y DcAlfin7 con mayores niveles de carotenoides presentan un estado basal (tiempo 0h) con menores niveles de peróxido de hidrógeno en las hojas de kiwi y luego de 24h post tratamiento agudo con NaCl.

- Para determinar si la expresión de los genes DcAlfin4 y DcAlfin7 es capaz de conferir tolerancia a estrés abiótico (salino e hídrico) en *A. deliciosa*, es necesario realizar ensayos de tolerancia a salinidad y sequía en planta completa.
- El gen DcAlfin4 es el mejor candidato para ser utilizado como herramienta biotecnológica para conferir mayor tolerancia a condiciones de estrés salino e hídrico en plantas de interés comercial.

Los resultados obtenidos confirman parcialmente la hipótesis planteada, en donde el gen DcAlfin4 otorga tolerancia a estrés abiótico (salino e hídrico) al ser expresados de manera heteróloga en plantas de *A. thaliana*. Mientras que la determinación de tolerancia a estrés abiótico (salino e hídrico) en *A. deliciosa* deben ser realizados en planta completa.

REFERENCIAS.

- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K., ySopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports*, 25(12), 1263-1274. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0204-8>. doi:10.1007/s00299-006-0204-8
- Akbas, F., Isikalan, C., yNamli, S. (2009). Callus induction and plant regeneration from different explants of *Actinidia deliciosa*. *Appl Biochem Biotechnol*, 158(2), 470-475. doi:10.1007/s12010-008-8401-2
- Arbona, V., López-Climent, M. F., Pérez-Clemente, R. M., yGómez-Cadenas, A. (2009). Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 135-142. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098847208001718>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.011>
- Arbona, V., Manzi, M., Zandalinas, S. I., Vives-Peris, V., Pérez-Clemente, R. M., yGómez-Cadenas, A. (2017). Physiological, Metabolic, and Molecular Responses of Plants to Abiotic Stress. In M. Sarwat, A. Ahmad, M. Z. Abdin, & M. M. Ibrahim (Eds.), *Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective, Volume 2* (pp. 1-35). Cham: Springer International Publishing.
- Arigita, L., Fernandez, B., Gonzalez, A., ySanchez Tames, R. (2005). Effect of the application of benzyladenine pulse on organogenesis, acclimatisation and endogenous phytohormone content in kiwi explants cultured under autotrophic conditions. *Plant Physiol Biochem*, 43(2), 161-167. doi:10.1016/j.plaphy.2005.01.012
- Azpiroz-Leehan, R., yFeldmann, K. A. (1997). T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet*, 13(4), 152-156.
- Bastola, D. R., Pethe, V. V., yWinicov, I. (1998). Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible MsPRP2 gene. *Plant Molecular Biology*, 38(6), 1123-1135. Retrieved from <https://doi.org/10.1023/A:1006081926699>. doi:10.1023/A:1006081926699
- Beck, J. J., Smith, L., yBaig, N. (2014). An Overview of Plant Volatile Metabolomics, Sample Treatment and Reporting Considerations with Emphasis on Mechanical Damage and Biological Control of Weeds. *Phytochemical Analysis*, 25(4), 331-341. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pca.2486>. doi:10.1002/pca.2486
- Bienz, M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(1), 35-40. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.11.001>. doi:10.1016/j.tibs.2005.11.001
- Binder, B. Y. K., Peebles, C. A. M., Shanks, J. V., ySan, K.-Y. (2009). The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress*, 25(3), 861-865. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/btpr.97>. doi:10.1002/btpr.97
- Boyer, J. S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science*, 218(4571), 443. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/218/4571/443.abstract>. doi:10.1126/science.218.4571.443
- Bravo, J. (2014). *Kiwis, en la senda correcta*.
- Capili, A. D., Schultz, D. C., Rauscher, F. J., yBorden, K. L. B. (2001). Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-

- binding domains. *The EMBO Journal*, 20(1-2), 165. Retrieved from <http://emboj.embopress.org/content/20/1-2/165.abstract>. doi:10.1093/emboj/20.1.165
- Centeno, M. L., Rodriguez, A., Feito, I., yFernandez, B. (1996). Relationship between endogenous auxin and cytokinin levels and morphogenic responses in *Actinidia deliciosa* tissue cultures. *Plant Cell Rep*, 16(1-2), 58-62. doi:10.1007/bf01275450
- Chandrika, N. N. P., Sundaravelpandian, K., Yu, S.-M., ySchmidt, W. (2013). ALFIN-LIKE 6 is involved in root hair elongation during phosphate deficiency in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 198(3), 709-720. Retrieved from <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/nph.12194>. doi:10.1111/nph.12194
- Chang, K., Qiu, F., Chen, M., Zeng, L., Liu, X., Yang, C., . . . Liao, Z. (2014). Engineering the MEP pathway enhanced ajmalicine biosynthesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61(3), 249-255. Retrieved from <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bab.1176>. doi:10.1002/bab.1176
- Chartzoulakis, K., Therios, I., Misopolinos, N., yNoitsakis, B. (1995). *Growth, ion content and photosynthetic performance of salt-stressed kiwifruit plants* (Vol. 16).
- Chen, G. Q. (2011). Effective Reduction of Chimeric Tissue in Transgenics for the Stable Genetic Transformation of *Lesquerella fendleri*. 46(1), 86. Retrieved from <https://journals.ashs.org/view/journals/hortsci/46/1/article-p86.xml>. doi:10.21273/hortsci.46.1.86
- Chen, L., Song, Y., Li, S., Zhang, L., Zou, C., yYu, D. (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 120-128. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939911001659>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.09.002>
- Chen, X., Han, H., Jiang, P., Nie, L., Bao, H., Fan, P., . . . Li, Y. (2011). *Transformation of -Lycopene Cyclase Genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* Conferred Salt Tolerance in *Arabidopsis* and Tobacco* (Vol. 52).
- CIREN-CORFO. (1989). *Requerimientos de clima y suelo: Futaes de hoja caduca*.
- Claeys, H., Van Landeghem, S., Dubois, M., Maleux, K., yInzé, D. (2014). What Is Stress? Dose-Response Effects in Commonly Used in Vitro Stress Assays. *Plant Physiology*, 165(2), 519. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/165/2/519.abstract>. doi:10.1104/pp.113.234641
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., yTonelli, C. (2008). Over-expression of the *Arabidopsis* AtMYB41 gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, 53(1), 53-64. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-313X.2007.03310.x>. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03310.x
- Covatta, F., yBorscak, J. (1988). *El Kiwi: cultivo alternativo*: Editorial Hemisfério Sur.
- Daudi, A., yO'Brien, J. A. (2012). Detection of Hydrogen Peroxide by DAB Staining in *Arabidopsis* Leaves. *Bio-protocol*, 2(18), e263. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390754>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC4932902/>.

- Delker, C., Raschke, A., yQuint, M. (2008). Auxin dynamics: the dazzling complexity of a small molecule's message. *Planta*, 227(5), 929-941. doi:10.1007/s00425-008-0710-8
- Denekamp, M., ySmeekens, S. C. (2003). Integration of Wounding and Osmotic Stress Signals Determines the Expression of the AtMYB102 Transcription Factor Gene. *Plant Physiology*, 132(3), 1415. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/132/3/1415.abstract>. doi:10.1104/pp.102.019273
- Doyle, J., yDoyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
- Espinoza, A., San Martín, A., López-Climent, M., Ruiz-Lara, S., Gómez-Cadenas, A., yCasaretto, J. A. (2013). Engineered drought-induced biosynthesis of α -tocopherol alleviates stress-induced leaf damage in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 170(14), 1285-1294. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161713001624>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.04.004>
- Faize, M., Faize, L., yBurgos, L. (2010). Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC biotechnology*, 10, 53-53. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637070> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2912785/>. doi:10.1186/1472-6750-10-53
- Ferguson, A. (2011). Kiwifruit: A Botanical Review. In (Vol. 16, pp. 1-64).
- Fowler, S. G., Cook, D., yThomashow, M. F. (2005). Low Temperature Induction of Arabidopsis CBF1, 2, and 3 Is Gated by the Circadian Clock. *Plant Physiology*, 137(3), 961. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/137/3/961.abstract>. doi:10.1104/pp.104.058354
- Fraser, L., Kent, J., yHarvey, C. (1995). *Transformation studies of Actinidia chinensis Planch* (Vol. 23).
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., yYamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research*, 124(4), 509-525. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10265-011-0412-3>. doi:10.1007/s10265-011-0412-3
- Fujita, Y., Yoshida, T., yYamaguchi-Shinozaki, K. (2013). Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 147(1), 15-27. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01635.x>. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01635.x
- Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K., yYamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1988. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/103/6/1988.abstract>. doi:10.1073/pnas.0505667103
- Gepstein, S., yGlick, B. R. (2013). Strategies to ameliorate abiotic stress-induced plant senescence. *Plant Molecular Biology*, 82(6), 623-633. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0038-z>. doi:10.1007/s11103-013-0038-z
- Gostincar, i. T. J., yYuste Pérez, M. (2006). *Biblioteca de la agricultura: Idea Books*
- Griffiths, J. F. (1994). Handbook of agricultural meteorology. Retrieved from <http://catalog.hathitrust.org/api/volumes/oclc/26132397.html>.

- Hauser, F., Waadt, R., ySchroeder, Julian I. (2011). Evolution of Abscisic Acid Synthesis and Signaling Mechanisms. *Current Biology*, 21(9), R346-R355. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.015>. doi:10.1016/j.cub.2011.03.015
- James, D. J., Passey, A. J., Barbara, D. J., yBevan, M. (1989). Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. *Plant Cell Reports*, 7(8), 658-661. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/BF00272054>. doi:10.1007/BF00272054
- Jensen, M. K., Lindemose, S., de Masi, F., Reimer, J. J., Nielsen, M., Perera, V., . . . Sriver, K. (2013). ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Open Bio*, 3(1), 321-327. Retrieved from <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.fob.2013.07.006>. doi:10.1016/j.fob.2013.07.006
- Jung, C., Seo, J. S., Han, S. W., Koo, Y. J., Kim, C. H., Song, S. I., . . . Cheong, J.-J. (2008). Overexpression of *AtMYB44* Enhances Stomatal Closure to Confer Abiotic Stress Tolerance in Transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146(2), 623. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/146/2/623.abstract>. doi:10.1104/pp.107.110981
- Kang, J. Y., Choi, H. I., Im, M. Y., yKim, S. Y. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 14(2), 343-357.
- Kayum, M. A., Park, J.-I., Ahmed, N. U., Jung, H.-J., Saha, G., Kang, J.-G., yNou, I.-S. (2015). Characterization and stress-induced expression analysis of Alfin-like transcription factors in *Brassica rapa*. *Molecular Genetics and Genomics*, 290(4), 1299-1311. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00438-015-0993-y>. doi:10.1007/s00438-015-0993-y
- Kim, S. H., Ahn, Y. O., Ahn, M.-J., Lee, H.-S., yKwak, S.-S. (2012). Down-regulation of β -carotene hydroxylase increases β -carotene and total carotenoids enhancing salt stress tolerance in transgenic cultured cells of sweetpotato. *Phytochemistry*, 74, 69-78. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942211004894>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.003>
- Kim, S. Y. (2006). The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response. *Physiologia Plantarum*, 126(4), 519-527. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00601.x>. doi:10.1111/j.1399-3054.2005.00601.x
- Krysan, P. J., Young, J. C., Jester, P. J., Monson, S., Copenhaver, G., Preuss, D., ySussman, M. R. (2002). Characterization of T-DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis. *Omics*, 6(2), 163-174. doi:10.1089/153623102760092760
- Lata, C., yPrasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4731-4748. Retrieved from <https://dx.doi.org/10.1093/jxb/err210>. doi:10.1093/jxb/err210
- Lee, W. Y., Lee, D., Chung, W.-I., yKwon, C. S. (2009). *Arabidopsis* ING and Alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers. *The Plant Journal*, 58(3), 511-524. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-313X.2009.03795.x>. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03795.x
- Li, F., Vallabhaneni, R., yWurtzel, E. T. (2008). *PSY3*, a New Member of the Phytoene Synthase Gene Family Conserved in the Poaceae and Regulator of Abiotic Stress-Induced Root Carotenogenesis. *Plant Physiology*, 146(3), 1333. Retrieved from

- <http://www.plantphysiol.org/content/146/3/1333.abstract>.
doi:10.1104/pp.107.111120
- Li, X., Li, J., ySoejarto, D. D. (2009). Advances in the study of the systematics of Actinidia Lindley. *Frontiers of Biology in China*, 4(1), 55-61. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11515-008-0110-2>. doi:10.1007/s11515-008-0110-2
- Lichtenthaler, H. K., yBuschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In (Vol. F4).
- Mahajan, S., yTuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys*, 444(2), 139-158. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018
- Matsuta, N., Iketani, H., yHayashi, T. (1990). Effect of acetosyringone on kiwifruit transformation. *Japanese Journal of Breeding*(40), 184-185.
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C., yWurtzel, E. T. (2011). A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in Arabidopsis thaliana. *BMC Syst Biol*, 5, 77. doi:10.1186/1752-0509-5-77
- Meisel, L., Fonseca, B., Gonzalez, S., Baeza-Yates, R., Cambiazo, V., Campos, R., . . . Silva, H. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol Res*, 38(1), 83-88.
- Mengiste, T., Chen, X., Salmeron, J., yDietrich, R. (2003). The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 Gene Encodes an R2R3MYB Transcription Factor Protein That Is Required for Biotic and Abiotic Stress Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(11), 2551. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/15/11/2551.abstract>. doi:10.1105/tpc.014167
- Minocha, R., Majumdar, R., yMinocha, S. C. (2014). Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship1. *Frontiers in Plant Science*, 5(175). Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00175>. doi:10.3389/fpls.2014.00175
- Mok, D. W., yMok, M. C. (2001). CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 89-118. doi:10.1146/annurev.arplant.52.1.89
- Molitor, A. M., Bu, Z., Yu, Y., yShen, W. H. (2014). Arabidopsis AL PHD-PRC1 complexes promote seed germination through H3K4me3-to-H3K27me3 chromatin state switch in repression of seed developmental genes. *PLoS Genet*, 10(1), e1004091. doi:10.1371/journal.pgen.1004091
- Moreno, J. C., Cerda, A., Simpson, K., Lopez-Diaz, I., Carrera, E., Handford, M., yStange, C. (2016). Increased Nicotiana tabacum fitness through positive regulation of carotenoid, gibberellin and chlorophyll pathways promoted by Daucus carota lycopene beta-cyclase (Dlcyb1) expression. *J Exp Bot*, 67(8), 2325-2338. doi:10.1093/jxb/erw037
- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., yYamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 97-103. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939911001817>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.005>
- Pateraki, I., yKanellis, A. K. (2010). Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in Cistus creticus subsp. creticus. *Plant Cell Reports*, 29(6), 629-641. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0849-1>. doi:10.1007/s00299-010-0849-1

- Peleg, Z., yBlumwald, E. (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 290-295. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526611000069>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>
- Peng, L., Wang, L., Zhang, Y., Dong, A., Shen, W.-H., yHuang, Y. (2018). Structural Analysis of the Arabidopsis AL2-PAL and PRC1 Complex Provides Mechanistic Insight into Active-to-Repressive Chromatin State Switch. *Journal of Molecular Biology*, 430(21), 4245-4259. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283618303528>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.08.021>
- Persak, H., yPitzschke, A. (2014). Dominant Repression by Arabidopsis Transcription Factor MYB44 Causes Oxidative Damage and Hypersensitivity to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2). doi:10.3390/ijms15022517
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., yPrasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 17(6), 369-381. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.004>. doi:10.1016/j.tplants.2012.02.004
- Qu, L.-J., yZhu, Y.-X. (2006). Transcription factor families in Arabidopsis: major progress and outstanding issues for future research. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 544-549. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526606001117>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.005>
- Riechmann, J., Heard, J., Martin, G., Reuber, T., Jiang, C.-Z., Keddie, J., . . . L. Yu, G. (2001). *Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes* (Vol. 290).
- Rodríguez-Concepción, M., yBoronat, A. (2015). Breaking new ground in the regulation of the early steps of plant isoprenoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 17-22. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526615000436>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.001>
- Rosas-Saavedra, C., yStange, C. (2016). Biosynthesis of Carotenoids in Plants: Enzymes and Color. In C. Stange (Ed.), *Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function* (pp. 35-69). Cham: Springer International Publishing.
- Ruiz-Sola, M. A., Arbona, V., Gomez-Cadenas, A., Rodriguez-Concepcion, M., yRodriguez-Villalon, A. (2014). A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in arabidopsis. *PLOS ONE*, 9(3), e90765. doi:10.1371/journal.pone.0090765
- Ruiz-Sola, M. A., yRodriguez-Concepcion, M. (2012). Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book*, 10, e0158. doi:10.1199/tab.0158
- Saeiahagh, H., Mousavi, M., Wiedow, C., Bassett, H. B., yPathirana, R. (2019). Effect of cytokinins and sucrose concentration on the efficiency of micropropagation of 'Zes006' Actinidia chinensis var. chinensis, a red-fleshed kiwifruit cultivar. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01597-4>. doi:10.1007/s11240-019-01597-4
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Qin, F., Seki, M., Shinozaki, K., yYamaguchi-Shinozaki, K. (2006a). Functional Analysis of an Arabidopsis&/em> Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, 18(5),

1292. Retrieved from <http://www.plantcell.org/content/18/5/1292.abstract>. doi:10.1105/tpc.105.035881
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006b). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18822. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/103/49/18822.abstract>. doi:10.1073/pnas.0605639103
- Schindler, U., Beckmann, H., Cashmore, A. R. (1993). HAT3.1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. *The Plant Journal*, 4(1), 137-150. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-313X.1993.04010137.x>. doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04010137.x
- Simon, S., Petrasek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Sci*, 180(3), 454-460. doi:10.1016/j.plantsci.2010.12.007
- Simpson, K. (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*. *J Exp Bot*, 69(16), 4113-4126. doi:10.1093/jxb/ery207
- Simpson, K., Quiroz, L. F., Rodríguez-Concepción, M., Stange, C. R. (2016). Differential Contribution of the First Two Enzymes of the MEP Pathway to the Supply of Metabolic Precursors for Carotenoid and Chlorophyll Biosynthesis in Carrot (*Daucus carota*). *Frontiers in Plant Science*, 7(1344). Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.01344>. doi:10.3389/fpls.2016.01344
- Singh, J., Thakur, J. K. (2018). Photosynthesis and Abiotic Stress in Plants. In S. Vats (Ed.), *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 27-46). Singapore: Springer Singapore.
- Song, Y., Gao, J., Yang, F., Kua, C. S., Liu, J., Cannon, C. H. (2013). Molecular evolutionary analysis of the Alfin-like protein family in *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, and *Thellungiella halophila*. *PLOS ONE*, 8(7), e66838. doi:10.1371/journal.pone.0066838
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 447-456. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526600001990>. doi:[https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
- Tao, J.-J., Wei, W., Pan, W.-J., Lu, L., Li, Q.-T., Ma, J.-B., . . . Zhang, J.-S. (2018). An Alfin-like gene from *Atriplex hortensis* enhances salt and drought tolerance and abscisic acid response in transgenic *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 8(1), 2707. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21148-9>. doi:10.1038/s41598-018-21148-9
- Teixeira, E. I., Fischer, G., van Velthuisen, H., Walter, C., Ewert, F. (2013). Global hot-spots of heat stress on agricultural crops due to climate change. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170, 206-215. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168192311002784>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2011.09.002>
- Verslues, P. E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., Zhu, J.-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, 45(4), 523-539. Retrieved from

- <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x>. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x
- Volkova, L., Tausz, M., Bennett, L. T., yDreyer, E. (2009). Interactive effects of high irradiance and moderate heat on photosynthesis, pigments, and tocopherol in the tree-fern *Dicksonia antarctica*. *Functional Plant Biology*, 36(12), 1046-1056. Retrieved from <https://www.publish.csiro.au/paper/FP09098>. doi:<https://doi.org/10.1071/FP09098>
- Wang, T., yGleave, A. (2012). Applications of Biotechnology in Kiwifruit (Actinidia). In.
- Wei, W., Huang, J., Hao, Y.-J., Zou, H.-F., Wang, H.-W., Zhao, J.-Y., . . . Chen, S.-Y. (2009). Soybean GmPHD-Type Transcription Regulators Improve Stress Tolerance in Transgenic Arabidopsis Plants. *PLOS ONE*, 4(9), e7209. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007209>. doi:10.1371/journal.pone.0007209
- Wei, W., Zhang, Y.-Q., Tao, J.-J., Chen, H.-W., Li, Q.-T., Zhang, W.-K., . . . Chen, S.-Y. (2015). The Alfin-like homeodomain finger protein AL5 suppresses multiple negative factors to confer abiotic stress tolerance in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 81(6), 871-883. Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpj.12773>. doi:10.1111/tpj.12773
- Winicov, I. (1993). cDNA encoding putative zinc finger motifs from salt-tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells. *Plant Physiology*, 102(2), 681-682. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8108516>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC158829/>.
- Winicov, I. (2000). Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta*, 210(3), 416-422. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/PL00008150>. doi:10.1007/PL00008150
- Winicov, I., yBastola, D. R. (1999). Transgenic Overexpression of the Transcription FactorAlfin1Enhances Expression of the Endogenous MsPRP2Gene in Alfalfa and Improves Salinity Tolerance of the Plants. *Plant Physiology*, 120(2), 473. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/120/2/473.abstract>. doi:10.1104/pp.120.2.473
- Winicov, I., Valliyodan, B., Xue, L., yHooper, J. K. (2004). The MsPRP2 promoter enables strong heterologous gene expression in a root-specific manner and is enhanced by overexpression of Alfin 1. *Planta*, 219(6), 925-935. doi:10.1007/s00425-004-1296-4
- Wright, L. P., Rohwer, J. M., Ghirardo, A., Hammerbacher, A., Ortiz-Alcaide, M., Raguschke, B., . . . Phillips, M. A. (2014). Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase Controls Flux through the Methylerythritol 4-Phosphate Pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 165(4), 1488. Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/165/4/1488.abstract>. doi:10.1104/pp.114.245191
- Yoshida, T., Mogami, J., yYamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 133-139. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952661400106X>. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.07.009>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.-S., Niu, Q.-W., yChua, N.-H. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1, 641. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>. doi:10.1038/nprot.2006.97

ANEXOS.

Anexo 1. Lista de partidores.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	tamaño (pb)	Descripción
<i>Oligo AP</i>	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-	-	Utilizado para síntesis de ADNc mediante RT-PCR
<i>DcAlfin4.F</i>	GTGGGGGTTTGTGAAAGAAGGC	58,9	795	Amplifican región CDS del gen DcAlfin4 sin codón de término
<i>DcAlfin4.R</i>	TGGCCTAAGTTTCTTGCTACTGCT	58,5		
<i>DcAlfin7.F</i>	TGGCCTAAGTTTCTTGCTACTGCT	59	750	Amplifican región CDS del gen DcAlfin7 sin codón de término
<i>DcAlfin7.R</i>	CATATGGACTCTGGCCCTCTTTGA	58,4		
<i>qDcAlfin4.F</i>	AGAAGAAGAGGAGCACGGAGACAC	60.1	101	Utilizados para qRT-PCR del gen DcAlfin4
<i>qDcAlfin4.R</i>	GGAACCACTTCTCACACACATCACAAC	59.7		
<i>qDcAlfin7.F</i>	CCCTGCCAAGGCTGAACATATCAAG	59.9	104	Utilizados para qRT-PCR del gen DcAlfin7 en D. carota
<i>qDcAlfin7.R</i>	ACTACGATGTCCTCACGGATTTGGTATC	59.5		
<i>qDcAlfin7.F(2)</i>	AATACCCGAGCCAGCATTAG	54.7	90	Utilizados para qRT-PCR del gen DcAlfin7 en A. thaliana y A. deliciosa
<i>qDcAlfin7.R(2)</i>	GAATCACTGTGAACTGCAACAA	53.9		
<i>qDcAREB3.F</i>	GCCAGTTTAGCACCTCGTCTTGC	60.9	179	Utilizados para qRT-PCR del gen DcAREB3
<i>qDcAREB3.R</i>	CGCCTTCTCTCCACCACTTTCTC	59.5		
<i>qDcUbi.F</i>	CAAGACAAAGAAGGCATCCCGC	58.8	177	Utilizados para qRT-PCR del gen housekeeping DcUbi40
<i>qDcUbi.R</i>	CTTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC	57.7		
<i>18S.F</i>	TTGATTACGTCCCTGCCCTT	62	196	Amplifican región del gen 18S. Utilizado para verificar la calidad del ADN y ADNc.
<i>18S.R</i>	ACAATGATCCTCCGCAGGT	60		
<i>qAd18S.F</i>	CTGTGAAACTGCGAATGGCTC	56.7	116	Utilizados para qRT-PCR del gen housekeeping 18S
<i>qAd18S.R</i>	TTCCAGAAGTCGGGGTTTGT	56.5		
<i>qAtPsy.F</i>	GACACCCGAAAGGCGAAAGG	58.8	179	Utilizados para qRT-PCR del gen AtPsy
<i>qAtPsy.R</i>	CAGCGAGAGCAGCATCAA	59.1		
<i>QAtUbi10.F</i>	ACCAGCAGCGTCTCATCTT	56.5	137	Utilizados para qRT-PCR del gen housekeeping AtUbi10
<i>QAtUbi10.R</i>	GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA	52.5		

Anexo 2. Programas PCR.

1. PCR convencional

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación Inicial	94	4min.	1
Denaturación	94	45seg.	35
Hibridación	Tm-5	30seg.	
Extensión	72	1min/kb	
Extensión Final	72	10min.	1

2. RT-PCR

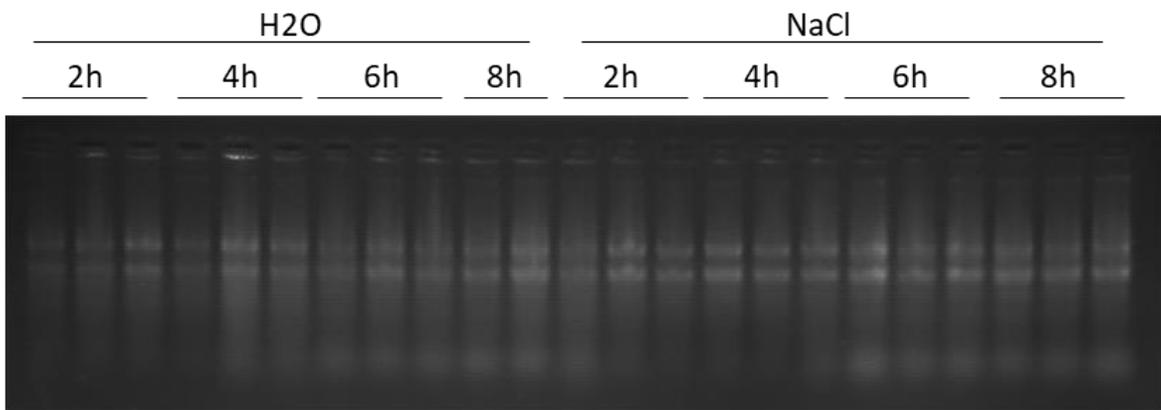
Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Incubación inicial	70	5min	1
Hibridación	25	5min	1
Extensión	42	60min	1
Inactivación	70	15min	1

4. qRT-PCR

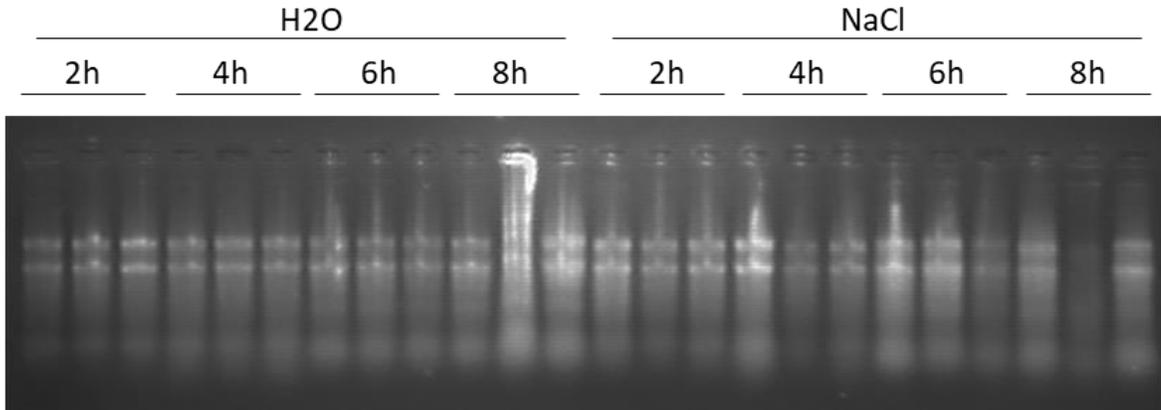
Paso	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
Denaturación	95	3min.	1
Amplificación	95	10seg.	40
	60	20seg.	
Disociación	95	1min.	1
	60	30seg.	
	95	30seg.	

Anexo 3. Gel ARN *Daucus carota*.

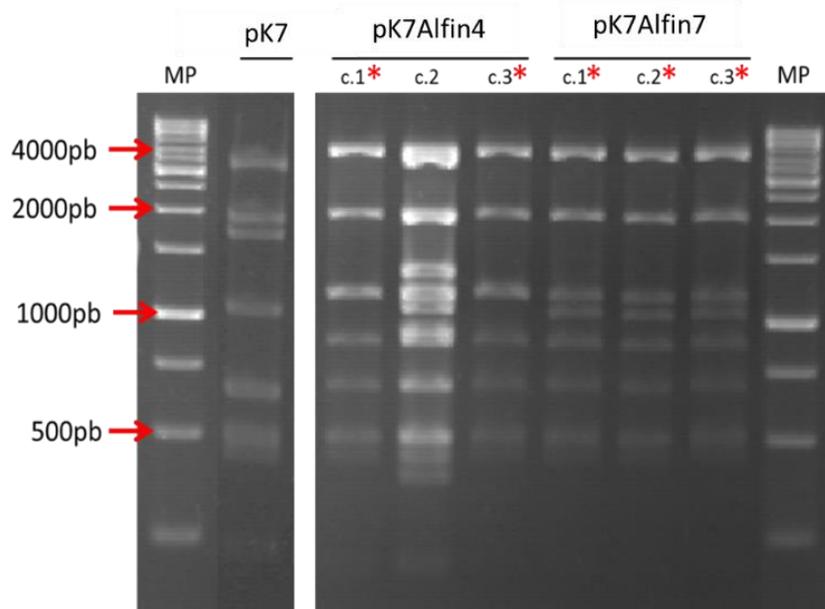
ARN Hoja



ARN Raíz



Anexo 4. Ensayo de restricción de vectores pK7, pKAlfin4 y pKAlfin7.



Vectores	Bandas en esperadas
pK7RWG2-AI2	3744, 1933, 1136, 1131, 849, 630, 515, 480, 423, 192
pK7RWG2-AI3	3744, 1933, 1131, 1007, 846, 630, 515, 480, 423, 192, 87
pK7RWG2	3744, 2160, 1933, 1131, 658, 630, 515, 480, 423, 192

Patrón de bandas obtenido luego de digerir los vectores con la enzima de restricción Aval. c.1 a c.3 corresponde a tres clones independientes digeridos para cada construcción. Con asterisco se indican aquellas colonias que presentaron el patrón de bandas esperado. MP: Marcador de peso molecular 1 Kb. (Modificado de Simpson, 2015).

Anexo 5. Secuencias genes DcAlfin4 y DcAlfin7.

DcAlfin4

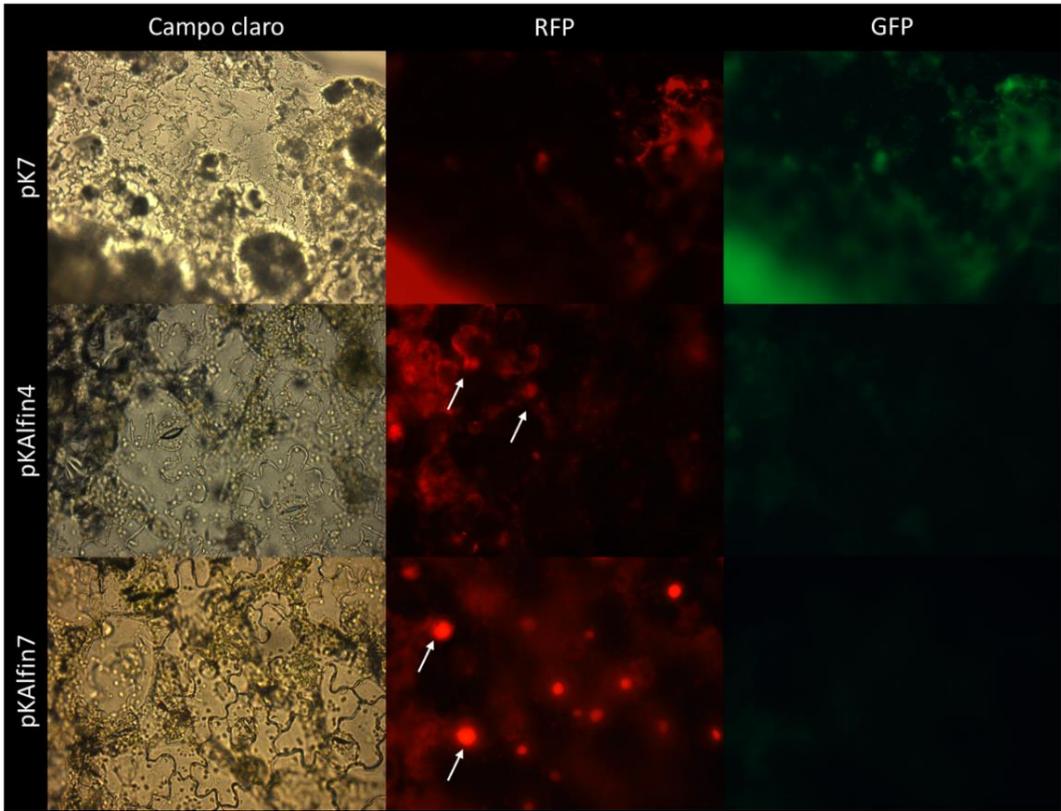
GTGGGGTTTGTGAAAGAAGGCTA GAAGTTCAGAGAGAGAGGAAGCAATG GAAAGCAACGTTCTC
GAACCGTGAAGAGGTGTTACAGACTTCAAAGCTCGCCGACCGCCTTAATCAAAGCCCTCACCACCG
ACGTTGCTGAGTTCTACCAGCTTTGCGATCCTGAGAAAGAGAATCTTTGTCTGTATGGATATCCTAATAA
ACAATGGGAAGTCAATTTGCCTGCCGAAGAGGTACCACCAGAGCTTCCGAGCCTGCTTTAGGTATTA
CTTTGCAAGAGATGGGATGAAAGAAAAGGACTGGTTAGCACTTGTTCGGTCCACAGTGATACATGGC
TACTTTCCGTAGCCTTCTATTTTGAAGCAGATTTGGTTTTGACAGAGCTGACAGGAATCGTCTTTTTGGT
ATGATAAACGATATGGCAACAGTTTATGAAGTTGTTGCTGGAATTGGCAAGAAAAATCCGAGGGAGAA
GTCAGCAGTTTCAAATCAAAGTAGCACCAAGGCCAAGTCAAACACAAGAGGGCGAGGTTCTGAATCAC
AAGGAAAAATATCAAAGATGCAAGGAAAAGACTCTGATGAAGAGGGACAGGAAGAAGAAGAGGAGC
ACGGAGACACTTTGTGTGGAGCATGTGGGGGGGACTATGCTGCAGATGAGTTTTGGATTTGTTGTGAC
GTGTGTGAGAAGTGGTTCCATGGGAAGTGTGTGAAGATCACCCAGCCAGGGCTGAGCATATCAAGCA
ATATAAGTGCCCATCTTGTAGCAGTAGCAAGAACTTAGGCCATGA

DcAlfin7

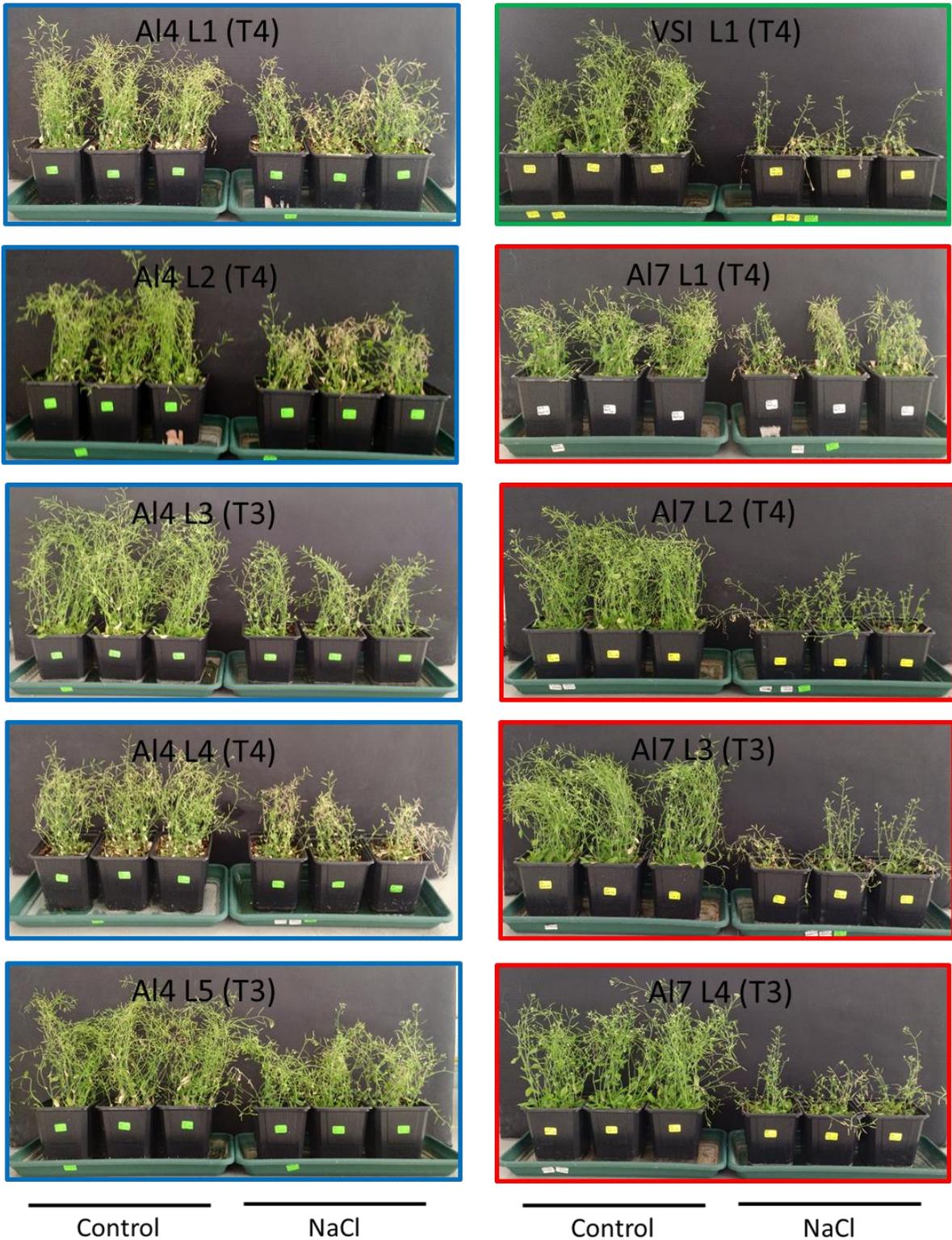
ATGGACGCAAGGCAAACGGTTCCGAGGTCAAGTTCAGGAGGTTTTTATGATTTTCAGAGGCCGAGAGC
TGCTTTGATCAAAGCTTTACAAGTATGAGAAAGTTTACCAGGAGTGTGATCCCGAGAAGGAAAA
TCTGTGTTTGTATGGCTTGCCAAGTGAAGAAATGGGAAGTAAATCTGCCTGTTGAGGAGGTGCCTCCTGA
AATACCCGAGCCAGCATTAGGCATTAATTTTGAAGGGATGGGATGCAAGAGAAGGACTGGTTATCAC
TTGTTGCAGTTCACAGTGATTCGTGGTTAATTTCTGTTGCATTTTATTTTGGTGCTCGTTTTTGTTCACA
AGAATGACAGGAAGAGGCTTTTCCAGATGATAAATGAGCTACCAACTGTATTTGAAGTTGTAACAGGCT
GTGCTAACAGTCTAAGGACTCTGCTCGCAGTAATGGAAGTAAAAGCAAATCTAATGGGAACAAGTCTC
GAACATATGAGTCTTACTCAAAGCAAAGATGACTCCTCCACCAATGAAGCGGGAGAGAGTGATGGT
GATGAGGCTGAAGAAGGACAGGGAACAATTTGTGGTTCTGTGGAGACAAAATATGCGGCTGATGAATT
CTGGATTTGCTGTGATGTGTGTGAGAGATGGTTCCATGGGAAATGCGTAAAAATCACCCCTGCCAAGGC
TGAACATATCAAGCAGTACAAGTGCCTACTTGCAGCTCAAAGAGGGCCAGAGTCCATATGTAA

En verde se destaca las regiones donde hibridan los partidores DcAlfin4.F/DcAlfin4.R y DcAlfin7.F/DcAlfin7.R en los genes DcAlfin4 y DcAlfin7, respectivamente; En rojo se destaca tanto el codón de inicio como de término de la traducción.

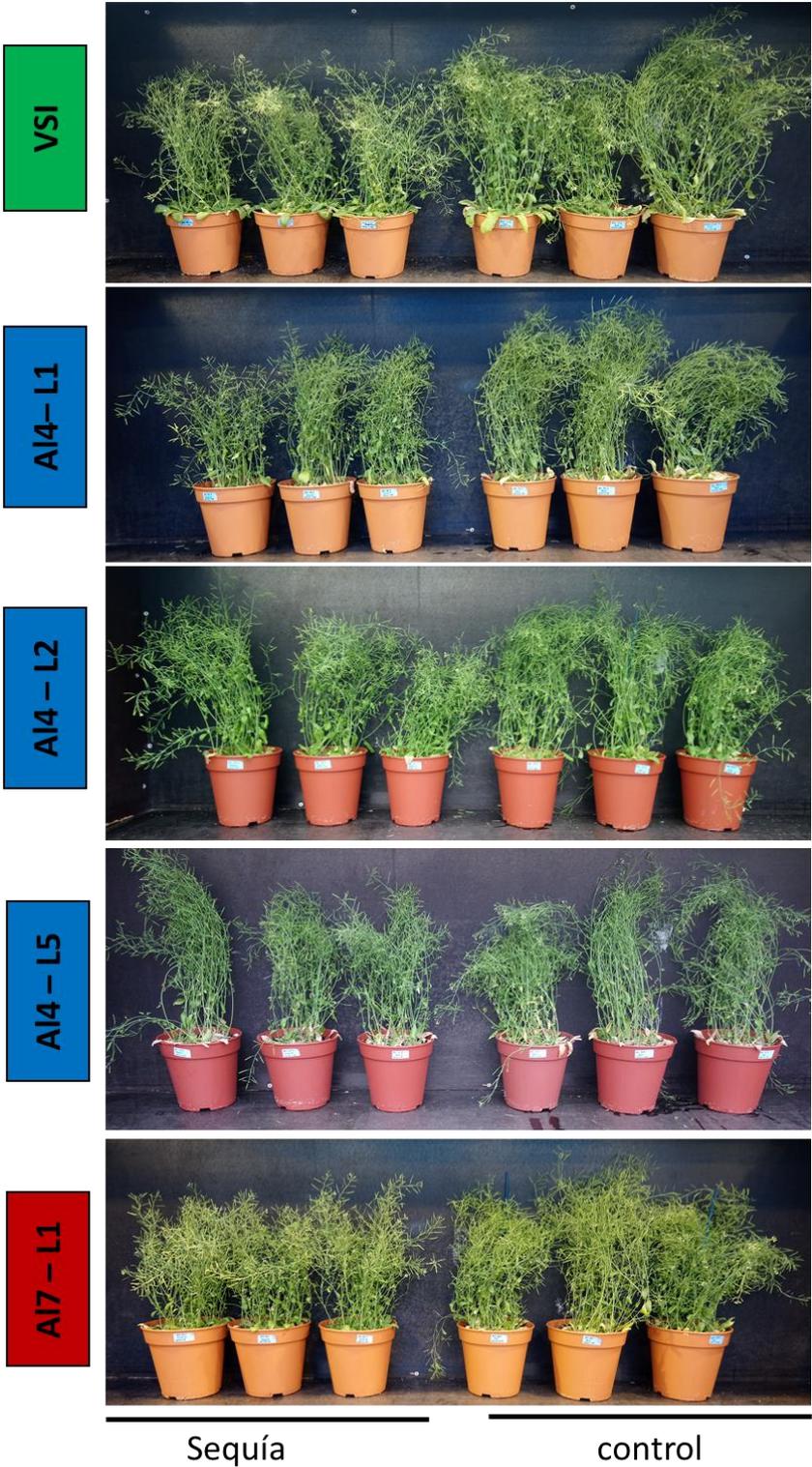
Anexo 6. Verificación de funcionalidad de los vectores pKAlfin4 y pKAlfin7 mediante análisis de localización subcelular de los FT codificados por los genes DcAlfin4 y DcAlfin7.



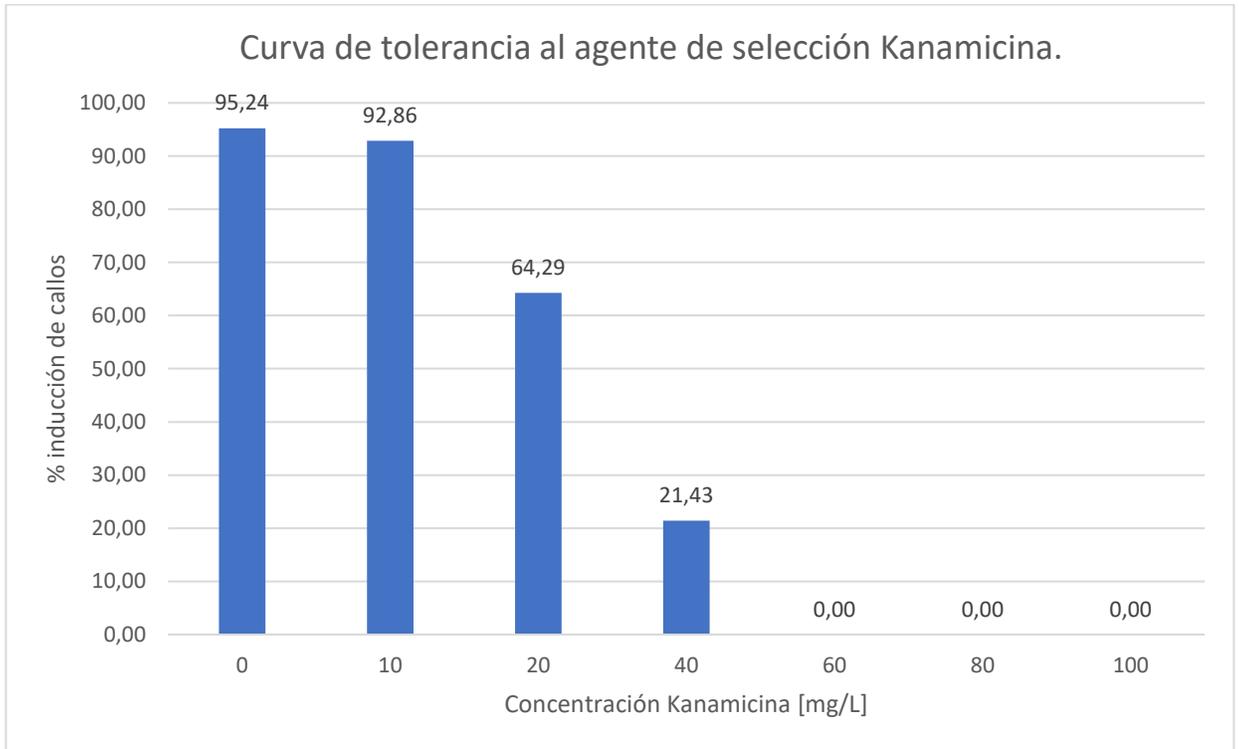
Anexo 7. Imágenes de plantas de *A. thaliana* de las líneas AI4 y AI7 sometidas a tratamiento con NaCl 200mM.



Anexo 8. Imágenes de plantas de *A. thaliana* de las líneas AI4 y AI7 sometidas a condiciones de estrés hídrico (Sequía).



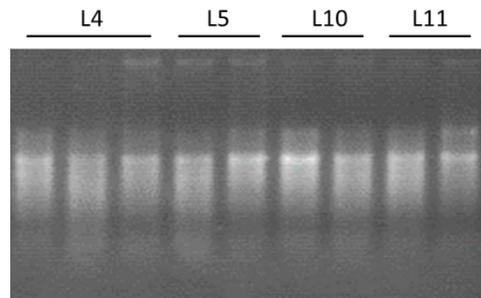
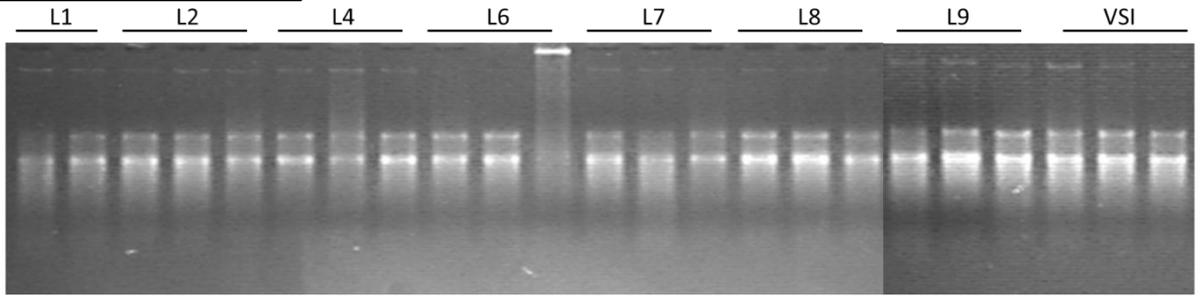
Anexo 9. Curva de tolerancia al antibiótico kanamicina por parte de explantes de hojas de *A. deliciosa*.



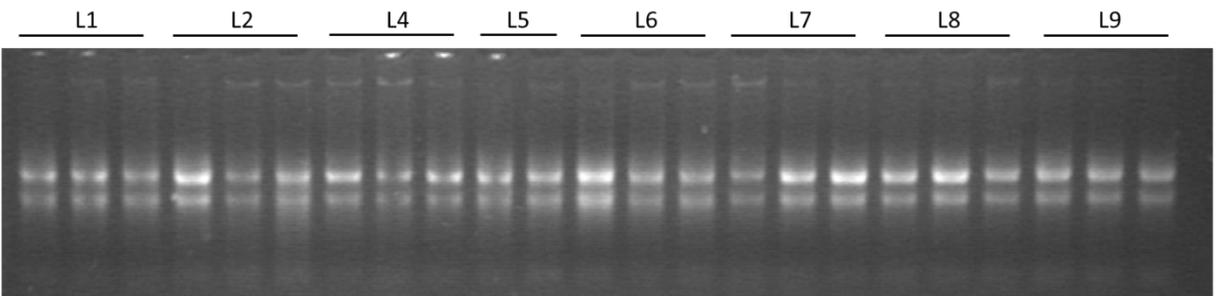
Cada barra representa el promedio de 4 placas de medio I (de inducción de callos), cada placa con 7 explantes de hojas de *A. deliciosa*.

Anexo 10. Gel ARN *Actinidia deliciosa*.

ARN *A. deliciosa* líneas AI4



ARN *A. deliciosa* líneas AI7



Anexo 11. Contenido de carotenoides de líneas transgénicas de *A. thaliana*.

