

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***PROSPECCIÓN ESTRATÉGICA PARA LA EDICIÓN DE GENES
REGULADORES NEGATIVOS A ESTRÉS POR SEQUIA O
SALINIDAD EN SOLANUM LYCOPERSICUM VARIEDAD
PONCHO NEGRO***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Bioquímica área de Especialización en
Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y Memoria para optar
al Título de Bioquímico por:

MAXIMILIANO ESTEBAN DÍAZ LEÓN

Director de Tesis: Dra. Claudia Renate Stange Klein

Santiago-Chile

Julio 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

MAXIMILIANO ESTEBAN DÍAZ LEÓN

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____

Director de Tesis:

Dra. Claudia Stange Klein _____

Co-director de Tesis:

Dr. Samuel Parra Aguilar _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lorena García Ning _____

Dr. Mario Chiong Lay _____

Dra. Lorena Pizarro Arcos _____

*Elegir a nuestra gente es lo más
cercano a controlar nuestro destino*

Randall Pearson

Agradecimientos:

Esta tesis marca el fin de una de las etapas más enriquecedoras que he atravesado en mi vida, no solo encontré un camino profesional en el cual decidí desarrollarme, sino que también conocí a un sinnúmero de personas que en mayor o menor medida influyeron en la persona que me he convertido hoy. Quiero agradecer en primer lugar a mi padre, que gracias a su dedicación y esfuerzo permitió concretar mis estudios lejos de mi ciudad de origen sin importar las dificultades que enfrentamos a lo largo de estos 8 años de estudios. Agradezco a mi abuela y tío por recibirme en mis primeros años de estudios, facilitando el inicio de mi carrera universitaria. Al dejar de vivir con mi abuela, emprendí el camino de levantar mi propio hogar, y tras varios años logré encontrar la calidez y confort con Barbara, Nacho y Juan, quienes se volvieron en personas fundamentales en vida y me acompañaron durante el proceso de desarrollo de mi tesis, quizá el lugar físico que compartimos ya no exista en el momento que lean esto, pero los recuerdos que generamos nos acompañaran el resto de nuestras vidas.

En segundo lugar, quiero reconocer a mis amigos de la carrera, con quienes nos autodenominamos como la “Toñaton”. Este grupo de personas, compuesto por Vale, Domi, Tito, Julio y Darío fueron quienes me inspiraron día a día a seguir en mis estudios y crecimos juntos a lo largo de la carrera. Ellos son los que entusiasman a sumergirme en las diversas áreas del mundo de la bioquímica y a explotar mis habilidades a tope. Espero llegar un día a ser tan brillante como ellos y que la vida nos siga reuniendo en este nuevo camino que recién empezamos a recorrer.

La universidad no solo me enriqueció a nivel profesional, sino que también en lo deportivo y personal. Quienes estuvieron conmigo estos años saben que me inicié en el mundo de la natación, en la Piscina Escolar, donde no solo aprendí a nadar, sino que conocí una hermosa comunidad que me llevo a dirigir la rama deportiva estudiantil e incluso ingresar a la selección de la UChile. Agradezco especialmente a Dani, Barbara, Paxsi y Pancho quienes me acompañaron en esta aventura paralela a mis estudios y que, a pesar de no haber estudiado algo relacionado a mi carrera, fueron un pilar fundamental durante el desarrollo de esta tesis. También agradecer a Gissela, Gabriel y Cristóbal, miembros del cuerpo técnico y de soporte de la selección universitaria, quienes en más de una ocasión extendieron su apoyo durante este tiempo.

Por último, quiero agradecer a mi directora, la Dra. Claudia Stange por permitirme formar parte de su grupo de investigación y la invitación a participar en el proyecto Anillo (ACT-192073), el cual financió este trabajo. Adicionalmente, a los miembros del grupo de investigación y el Centro de Biología Molecular Vegetal, particularmente al Dr. Samuel Parra, quien codirigió esta tesis; al Dr. Luis Felipe Quiroz, por ayudar a arrancar este trabajo en sus inicios; al Bq. Christian González y la MsC. Leticia Amaza, quienes me transmitieron su experiencia y ayudaron a definir la manera en que me desenvuelvo en un laboratorio; las Dras. Daniela Arias y Francisca Parada por su disposición a ayudarme a resolver problemas a medida que avanzaba en este trabajo; y a la Sra. Angelica Vega, por su permanente asistencia en el desarrollo de mis actividades. Sin duda este trabajo no se habría concretado sin la colaboración de todas estas personas. Infinitas gracias.

Índice General

Índice General	6
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras	9
Resumen	10
Abstract	11
1.-Introducción	12
1.1.- Cambio Climático.....	12
1.2.- Estrés Abiótico.....	12
1.3.- Mejoramiento Vegetal.....	14
1.4.- CRISPR-Cas9: plataforma de edición genética.	15
1.5.- Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>): modelo de estudio y cultivo de interés nacional	17
1.6.- Tomate var. Poncho Negro: variedad atractiva para mejoramiento vegetal	17
1.7.-Hipótesis y Objetivos de trabajo	19
1.7.1.-Hipótesis.....	19
1.7.2.-Objetivo General.....	19
1.7.3.-Objetivos Específicos	19
2.-Materiales y Métodos	20
2.1.-Materiales de Biología Molecular y Cultivo Celular	20
2.2.-Materiales Biológicos.....	20
2.3.-Metodos de Bioinformática	20
2.3.1.-Búsqueda bibliográfica	20
2.3.2.-Búsqueda de ortólogos.....	20
2.3.3.-Diseño de partidores para PCR	21

2.4.-Métodos de cultivo y transformación.....	23
2.4.1.-Cultivo bacteriano de <i>A. tumefaciens</i> GV3101 para transformación de tomate Poncho Negro.....	23
2.4.2.-Cultivo de tomate en invernadero	23
2.4.3.-Cultivo <i>in vitro</i> y transformación de tomate Poncho Negro.....	24
2.5.-Métodos de Biología Molecular.....	27
2.5.1.-Vector binario pGGK7.....	27
2.5.2.-Extracción de ácidos nucleicos	27
2.5.3.-Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.....	28
2.5.4.-Electroforesis en gel de agarosa.....	31
3.-Resultados	32
3.1.-Genes Reguladores Negativos	32
3.1.1.- <i>OsDIS1</i>	33
3.1.2.- <i>TaACO1</i>	36
3.1.3.-Análisis de expresión de genes ortólogos <i>OsDIS1</i> y <i>TaACO1</i>	39
3.2.-Regeneración <i>in vitro</i> y transformación de tomate Poncho Negro.....	42
3.2.1.-Regeneración y propagación clonal.....	42
3.2.2.-Transformación de tomate Poncho Negro	46
4.-Discusión	48
4.1.-Selección de genes y análisis bioinformático.....	48
4.2.-Ensayo agudo de estrés osmótico y salino	51
4.3.-Transformación y regeneración <i>in vitro</i> de tomate Poncho Negro.....	52
5.-Conclusiones	57
6.-Bibliografía.....	58

Índice de Tablas

Tabla 1.- Partidores para qPCR en tomate var. ACE	22
Tabla 2.- Partidores para qPCR para tomate var. Poncho Negro.....	22
Tabla 3.- Composición de medios de cultivo para la transformación y organogénesis somática de tomate var. Poncho Negro a partir de hoja y cotiledón.....	25
Tabla 4.- Composición de medios de cultivo para la transformación y organogénesis somática de tomate var.....	26
Tabla 5.- Programas de PCR de punto final.....	29
Tabla 6.- Genes reguladores negativos a sequía o salinidad candidatos a estudiar en proyecto PASSA.....	32
Tabla 7 Ensayo de regeneración in vitro de tomate Poncho Negro por organogénesis somática a partir de cotiledón e hipocótilo	46
Tabla 8.- Efecto del suplemento de sacarosa y hormonas en la regeneración <i>in vitro</i> de tomate PN a partir de cotiledón e hipocótilo	46

Índice de Figuras

Figura 1.- Mecanismo de acción de sistema CRISPR-Cas9.	16
Figura 2.- Esquema de construcción del ADN-T del vector pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2	27
Figura 3.- Estrategia de amplificación del gen <i>SIACO2</i> en tomate Poncho Negro.....	29
Figura 4.- <i>OsDIS1</i> , gen regulador negativo de la tolerancia a sequía en arroz	33
Figura 5.- Árbol filogenético de proteínas de los genes ortólogos de <i>OsDIS1</i>	34
Figura 6.- Expresión relativa in silico de genes de la familia SINA en raíces de tomate	35
Figura 7.- <i>TaACO1</i> , gen regulador negativo para la tolerancia a salinidad en trigo.....	36
Figura 8.- Árbol filogenético de proteínas de los genes ortólogos de <i>TaACO1</i>	38
Figura 9.- Expresión in silico de genes ACC oxidasa en raíces de tomate.....	38
Figura 10.- Análisis de expresión genes de la familia SINA y ACC oxidasa en raíces de tomate var. ACE bajo condiciones de estrés osmótico y salino agudos	40
Figura 11.- Análisis de expresión genes de la familia SINA y ACC oxidasa en raíces de tomate var. Poncho Negro bajo condiciones de estrés osmótico y salino agudos.....	41
Figura 12.- Efecto del suplemento de sacarosa y hormonas reguladoras del crecimiento en la regeneración in vitro de tomate PN a partir de hojas.....	43
Figura 13.- Efecto del suplemento de sacarosa y hormonas reguladoras del crecimiento en la regeneración in vitro de tomate PN a partir de tallo.....	44
Figura 14.- Regeneración y PCR de punto final de explantes de cotiledón de tomate PN transformados con pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2.....	47

Resumen

El cambio climático es un fenómeno global provocado por la acumulación de gases de efecto invernadero, el cual se encuentra asociado a mayores temperaturas y menores precipitaciones causando sequía y salinidad de los suelos, estreses abióticos que producen estrés osmótico en las plantas, afectando el desarrollo y rendimiento de los cultivos. Las plantas poseen mecanismos que les permiten adaptarse a condiciones temporales de sequía y baja salinidad. Durante este proceso se expresan genes que regulan negativamente a factores que promueven la tolerancia al estrés osmótico con el fin de recuperar la homeostasis una vez se retoma una condición ambiental normal. Experimentos de sobreexpresión de los reguladores negativos (RN) han mostrado que estos genes promueven la sensibilidad de la planta frente al estrés abiótico. Una de las principales estrategias para otorgar mayor tolerancia a los cultivos frente estrés abiótico es la edición de RNs mediante CRISPR-Cas9. El tomate es la hortaliza más cultivada en el mundo y tercera con mayor superficie en Chile; no obstante, las condiciones de sequía y salinidad que afectan la zona central de Chile amenazan su producción. El tomate Poncho Negro (PN) es un ecotipo local del Valle de Lluta, libre de protección intelectual y descrito como medianamente tolerante a sequía y salinidad. Si bien esta variedad es cultivada a pequeña escala, su mejoramiento genético podría incrementar su potencial al ser usado como portainjerto para variedades comerciales sensibles a sequía y sal. En base a lo anterior, en este trabajo estudiamos dos genes reguladores negativos a estrés por sequía y salinidad: *OsDIS1* y *TaACO1*, E3 ubiquitina ligasa y enzima participante de la biosíntesis de etileno respectivamente. Se identificaron y analizaron sus genes ortólogos en el genoma de referencia de tomate, seleccionándose los genes *SIDIS1*, *SISINA5*, *SISINAT2*, *SIACO1*, *SIACO2* y *SIACO3* para evaluar sus niveles de expresión *in silico* bajo condiciones normales de cultivo. En base a lo anterior, se cuantificó la expresión bajo condiciones agudas de estrés osmótico y salino mediante RT-qPCR de aquellos genes que se expresaran en raíz, seleccionándose *SIACO2* como candidato de edición ya que presentó mayor inducción en una de las condiciones de estrés estudiadas. Se estandarizaron las condiciones de propagación y regeneración *in vitro* del tomate PN. Finalmente, se transformaron explantes de PN para la edición del gen *SIACO2*, sin poder validar el *knockout* mediante PCR de punto final en el tejido transformante, por lo que no fue posible asegurar la edición del gen.

Abstract

Climate change is a global phenomenon caused by greenhouse gases accumulation, which is associated with higher temperatures and less precipitations, causing drought and soil salinity, abiotic stresses that generate osmotic stress in plants, impairing crop development and yield. Plants as sessile organisms must constantly adjust to their environment, for this they have developed mechanisms to adapt to temporal drought and low salinity conditions. During this process, genes that negatively regulate mechanisms which promote osmotic stress tolerance, are expressed aiming to recover homeostasis until normal environmental conditions are restored. It has been described that the overexpression of negative regulators (NR) promotes plant sensibility to abiotic stress; on the other hand, silencing these genes promotes tolerance. To improve plant abiotic stress tolerance, gene editing of NRs through CRISPR-Cas9 has become one of the main approaches to achieve this. Tomato was chosen as study model, as it is the most cultivated vegetable in the world and third with most surface cultivated in Chile; however, drought and salinity impair its yield. Tomato cv. Poncho Negro (PN) is a local ecotype from Lluta Valley, free of intellectual protection and described as moderately tolerant to drought and salinity. Therefore, genetic improvement of this variety will increase the value of a patrimonial variety with potential use as a commercial rootstock. Consequently, we studied two NR genes to drought and salinity stress: *OsDIS1* and *TaACO1*, an E3 ubiquitin ligase and an enzyme involved in ethylene biosynthesis, respectively. Then, we identified and analyzed their orthologues in the tomato reference genome, selecting *SIDIS1*, *SISINA5*, *SISINAT2*, *SIACO1*, *SIACO2* and *SIACO3* to evaluate its expression level under normal culture conditions *in silico*. Based on this, the expression under acute osmotic and salt stress was quantified through RT-qPCR of those genes that were expressed in roots, selecting *SIACO2* as a candidate for gene editing based on its observed induction under one of the stress conditions studied. Also, PN *in vitro* propagation and regeneration conditions were standardized. Finally, PN explants were transformed for *SIACO2* knockout, without being able to validate the deletion by endpoint PCR in the transformant tissue, therefore it was not possible to ensure the knockout of the gene.

1.-Introducción

1.1.- Cambio Climático

El cambio climático es un fenómeno global originado por la acumulación de gases de efecto invernadero emitidos principalmente por la actividad de una creciente población humana que han generado diversas consecuencias observadas a partir de los años 50, tales como el calentamiento progresivo de la atmósfera, disminución de las precipitaciones, aceleración del derretimiento de glaciares, aumento del nivel del mar, entre otros; efectos que se estima no podrán ser revertidos hasta dentro de varios siglos o milenios si se tomasen medidas inmediatamente (Masson-Delmotte et al., 2018; United Nations, 2015). Se proyecta que al término del siglo la temperatura aumente entre 1.0°C a 5.7°C (IPCC 2021); donde el aumento de 1.5°C produciría un incremento de las olas de calor, alargamiento de las estaciones cálidas y acortamiento de las frías, mientras que un aumento de al menos 2°C aumentaría aún más la frecuencia de los episodios de calor extremo afectando dramáticamente la agricultura (Masson-Delmotte et al., 2018; Shukla et al., 2019). Lo anterior se podría traducir en un aumento de la pérdida de agua por evapotranspiración, acrecentando la actual sequía (Hatfield et al., 2011; Masson-Delmotte et al., 2018; Shukla et al., 2019), como la mega sequía que afecta la zona central de Chile desde 2010 (Garreaud et al., 2020). Una de las estrategias para atenuarla es mediante el riego con agua subterránea; sin embargo, un uso intensivo de esta técnica conlleva a la salinización de la fuente acuífera, y en consecuencia de los suelos (Foster & Chilton, 2003). Ambos, salinidad y sequía, son factores que provocan estrés abiótico en los organismos vegetales.

1.2.- Estrés Abiótico

Las plantas como organismos sésiles deben adaptarse constantemente a las condiciones ambientales, debiendo alterar sus procesos fisiológicos y metabólicos para mantener su desarrollo. En ese sentido, cualquier cambio en el ambiente genera una presión en el organismo, referida como estrés abiótico, que rompe la homeostasis e induce los procesos de adaptación en la planta (Taiz & Zeiger, 2010). La sequía y salinidad son aquellos factores más importantes que afectan el desarrollo y rendimiento

de los cultivos, impactando negativamente procesos fisiológicos y bioquímicos de las plantas por efecto del estrés osmótico (Wojtyla et al., 2016; Yang & Guo, 2018), que representa más del 50% de la disminución de rendimiento de los cultivos (Pessarakli, 2016). Este efecto registrado se produce en base a una respuesta a nivel fisiológico, celular y molecular de las plantas, lo que les permite tolerar el estrés o en casos extremos desencadenar la muerte del organismo. A nivel molecular, esta respuesta adaptativa es generada por dos vías, aquellas independientes de la acción de ácido abscísico (ABA) y otras dependientes de ABA, fitohormona que regula procesos como la senescencia, respuesta a estrés abiótico y cierre estomático, entre otros (Chen et al., 2020; Zhu, 2002). En las cascadas de transducción de ambos mecanismos podemos encontrar la regulación de factores de transcripción, quinasas y fosfatasa, los cuales participan en la expresión de genes en respuesta a estrés osmótico. Un análisis de datos transcriptómicos donde comparan los grupos de genes en respuesta a estrés que se expresan en común en 9 especies de importancia agronómica, se describe la regulación positiva de genes pertenecientes a categorías ontológicas relacionadas a la reestructuración de la membrana y pared celular, biosíntesis de cera, organización de la pared celular y la biosíntesis de ácidos grasos, procesos que derivan en la tolerancia y sobrevivencia de plantas (Benny et al., 2019). Además de estos genes que promueven la tolerancia, existe un grupo de reguladores negativos (RN) que se inducen, los cuales están involucrados en procesos como el bloqueo o inhibición de los procesos asociados a la tolerancia a estrés osmótico, a la privación de agua, a vías de señalización por ABA y al estrés salino (Benny et al., 2019). Dentro de este grupo de genes, se destacan aquellos que promueven la síntesis de especies reactivas de oxígeno, disminuyen la actividad antioxidante, estimulan la muerte celular programada y/o provocan un desbalance en la homeostasis hormonal volviendo a las plantas más sensibles a estrés abiótico (Benny et al., 2019; Zafar et al., 2020). Múltiples son los genes que han sido estudiados como reguladores negativos a estrés abiótico, y se ha demostrado que el silenciamiento o *knockout* de ellos genera tolerancia en las plantas (Fang et al., 2015; Ning et al., 2011a; Zafar et al., 2020). A partir de lo anterior, se ha descrito la edición de estos genes RN como estrategia de mejoramiento genético para desarrollar cultivos más tolerantes a estrés abiótico, como aquel generado por sequía o salinidad (Zafar et al., 2020).

1.3.- Mejoramiento Vegetal

El mejoramiento vegetal es una estrategia utilizada durante la historia de la humanidad la cual ha ido evolucionando de la mano con los avances científico-tecnológicos de cada época con el fin de aportar a la seguridad alimentaria (Ahmar et al., 2020; Nerkar et al., 2022). Una de las estrategias de mejoramiento tradicional consiste en el cruzamiento asistido de dos individuos con el fin de seleccionar líneas con características deseadas; sin embargo, implican un prolongado periodo de desarrollo dado por el alto número de plantas segregantes y las características que se deben analizar en busca de caracteres mejorados (Breseghello & Coelho, 2013). Otra estrategia de mejoramiento vegetal tradicional es mediante la inducción de mutaciones al azar, la cual permite aumentar la diversidad genética. Estas mutaciones pueden ocurrir de manera espontánea en la naturaleza o pueden ser el resultado a la exposición de agentes químicos, físicos o agentes biológicos (Nerkar et al., 2022). Sin embargo, a pesar de ser una estrategia ampliamente utilizada desde los años 60, se requiere evaluar un gran número de plantas para identificar alguna mutante con caracteres mejorados (Sikora et al., 2011). Por otro lado, las estrategias de mejoramiento genético vegetal moderno utilizan a la bacteria *Agrobacterium* para insertar un gen de interés, generando un OGM (que incluye transgénicos, cisgénicos e intragénicos) (González-Calquín et al., 2022). Esto es posible dado que bacterias silvestres del género *Agrobacterium* (como *A. tumefaciens*) fueron modificadas para estos fines. *A. tumefaciens* silvestre induce tumores en la planta huésped al infectarla (De Cleene & De Ley, 1976; Krenek et al., 2015). Este fenotipo ocurre por la transferencia e inserción en el genoma del huésped de una porción del plásmido inductor de tumores (Ti), el ADN de transferencia (ADN-T), el cual codifica para los genes de síntesis de opinas, citoquininas y auxinas (Chilton et al., 1977; Gelvin, 2017; Krenek et al., 2015; Lemmers et al., 1980; Zambryski et al., 1980). Los avances en ingeniería genética han permitido generar un plásmido Ti recombinante que no genera patogenicidad y con potencial de uso en investigación y biotecnología al eliminar aquellos genes que inducen el desarrollo de tumores codificados en el ADN-T dejando solo disponible el mecanismo de transferencia de genes (Krenek et al., 2015; Zambryski et al., 1983). Así el uso de *Agrobacterium* se volvió un material indispensable en los laboratorios de biología vegetal, desarrollándose

diversos protocolos para la transformación de plantas (Krenek et al., 2015). Por cada evento de transformación se modifica el genoma de cada célula de manera independiente, por lo tanto, es necesario seleccionar las células transformadas y regenerar un individuo completo a partir de ellas, para ello se han descrito múltiples métodos, donde destacan la transformación de células germinales -también conocido como *floral dip*- y células somáticas, que se subdivide en dos tipos: organogénesis y embriogénesis (Duncan, 2011). La regeneración mediante organogénesis somática requiere la reprogramación del destino celular, lo cual se logra con el uso de medios nutritivos suplementados con hormonas, principalmente auxinas y citoquininas, que en distinta proporción permite la desdiferenciación y rediferenciación celular, regenerando así el individuo completo (Duncan, 2011). A pesar de lo anterior, las plantas obtenidas mediante la transformación estable por *Agrobacterium* presentan restricciones normativas para su liberación al mercado al ser consideradas OGM, transgénicos, cisgénicos o intragénicos, por lo que en legislaturas más restrictivas su uso se limita principalmente a la investigación (González-Calquín et al., 2022; Metje-Sprink et al., 2020).

1.4.- CRISPR-Cas9: plataforma de edición genética.

Debido a las normativas que regulan el uso de OGM surge como estrategia para mejoramiento vegetal el uso de tecnologías basadas en enzimas nucleasas, que al ser integradas a sistemas de transformación permiten realizar ediciones sitio dirigidas en el material genético del organismo objetivo y, luego, mediante selección perder el “cassette” inserto (Gaj et al., 2013; Nerkar et al., 2022). Las nucleasas realizan un corte en la doble hebra (DSB) de DNA, el cual es reparado por mecanismos endógenos de la célula, como la unión de los extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR) (Nerkar et al., 2022; Ranjha et al., 2018). Estas se utilizan para generar mutaciones puntuales (INDELS), eliminar grandes fragmentos del genoma o generar insertos en una posición determinada (Gaj et al., 2013; Nerkar et al., 2022). Uno de los sistemas de edición más destacados actualmente es CRISPR-Cas9, el cual permite hacer ediciones precisas, eficientes y de fácil manejo (Doudna & Charpentier, 2014). La edición bajo este sistema se basa en un mecanismo de defensa adaptativo de las bacterias, donde la proteína Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) cliva

secuencias de ADN guiada por un ARN antisentido, que permite el reconocimiento de patrones de ADN impropios de la bacteria (Makarova et al., 2006). Estos patrones se encuentran codificados en repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas, dando origen al acrónimo CRISPR por sus siglas en inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Barrangou et al., 2007; Marraffini & Sontheimer, 2008). El sistema optimizado para edición genética también funciona en plantas, utilizando un ARN guía (ARNg) diseñado de unos 20pb complementario al blanco y que permite a Cas9 ser dirigida de manera específica. El sistema de edición opera mediante el reconocimiento de la secuencia adyacente al protoespaciador (*Protospacer Adjacent Motif*, PAM) por Cas9 permitiéndolo su unión al ADN, luego Cas9 separa las hebras del ADN en los residuos posteriores al PAM y de ser complementaria la secuencia al ARNg estos hibridan, permitiendo la formación del heterodúplex ADN-ARN y desencadenar su actividad catalítica entre las posiciones tercera y cuarta río arriba al PAM (Figura 1) (Anders et al., 2014; Sternberg et al., 2014). A partir de lo anterior, la transformación mediada por *Agrobacterium* combinada con una plataforma de edición basada en CRISPR-Cas9 y la posterior cruza asistida permitiría desarrollar variedades vegetales editadas no transgénicas, al seleccionar aquellas líneas que pierden el inserto de T-DNA – que porta el gen de la Cas9 y sus ARNg – por segregación del loci hemicígoteo en una propagación sexual; permitiendo su distribución de acuerdo al marco establecido en la Resolución N°1.523/2001 del Ministerio de Agricultura (Biblioteca del Congreso Nacional, 2001) que regula la introducción al medio ambiente de organismos genéticamente modificados, generando nuevas alternativas de base científico-tecnológicas dentro del marco normativo del país.

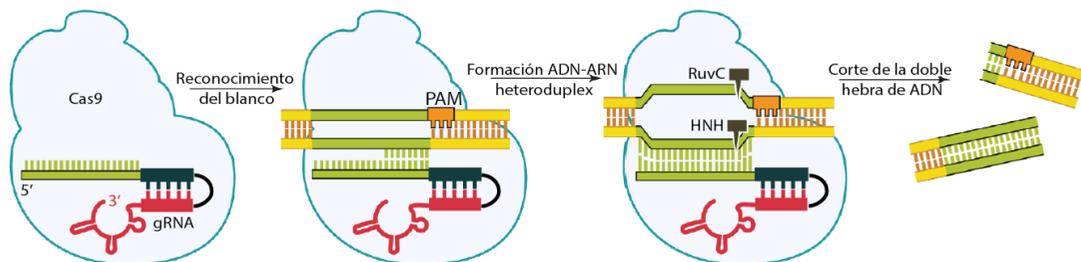


Figura 1.- Mecanismo de acción de sistema CRISPR-Cas9. El complejo Cas9 con el ARN guía (ARNg) reconoce en primera instancia la secuencia PAM, permitiendo su unión al ADN. Luego Cas9 estabiliza los primeros nucleótidos junto al PAM iniciando la separación de la doble hebra de ADN y el reconocimiento del sitio programado por el ARNg. De ser complementario el ARNg con la secuencia de ADN se lleva a la formación de un heterodúplex ADN-ARN para realizar el corte en la doble hebra de ADN entre las posiciones 3 y 4 río arriba al PAM por sus actividades nucleasa RuvC y HNH.

1.5.- Tomate (*Solanum lycopersicum*): modelo de estudio y cultivo de interés nacional

Uno de los modelos más importantes de estudio en la biología vegetal es el tomate (*Solanum lycopersicum*), siendo la hortaliza más cultivada a nivel mundial dado a su valor nutricional y buen posicionamiento gastronómico, presentándose en diversos formatos en el mercado. Presenta ciclos fenológicos acotados, iniciando el cultivo del primer fruto a partir de los 3 meses (Cordoba-Novoa et al., 2018), permitiendo así una rápida propagación de la especie. En Chile es la hortaliza con más superficie de cultivo cubriendo 13.070ha en 2020, equivalente al 14% de la superficie dedicada a la horticultura en dicho año, superando a cultivos como el choclo y lechuga, obteniendo una producción cercana a las 800.000 toneladas del fruto; y además representa importantes ingresos económicos, exportándose más de 143 millones de dólares en el periodo enero-noviembre 2021 (FAO, s. f.; Muñoz, 2021). El tomate es considerado como una especie semitolerante a la escasez de agua, sin embargo, la sequía permanente o prolongada pueden afectar gravemente la calidad y rendimiento del cultivo (Albornoz et al., 2007; Torres, 2017; Zhang et al., 2018), planteando así el desafío de generar cultivos más sustentables en el contexto del cambio climático y la necesidad de asegurar el acceso a alimentos de calidad para una población en continuo crecimiento (Murchie et al., 2009; United Nations, 2015; Zhang et al., 2018).

1.6.- Tomate var. Poncho Negro: variedad atractiva para mejoramiento vegetal

En el Valle de la Lluta, ubicado en la XV región de Arica y Parinacota, se cultivaba un ecotipo local de tomate, *Solanum lycopersicum* var. Poncho negro, (PN), introducido hace más de 50 años desde Cochabamba, Bolivia. Esta variedad logró adaptarse a los altos niveles de salinidad y metales pesados presentes en el suelo y agua de riego de esta zona desarrollando un fenotipo de tolerancia a estrés osmótico y salino (Albornoz et al., 2007; Angel et al., 2016; Bastías et al., 2020). Sin embargo, los frutos del Poncho Negro presentan una mala post cosecha que lo vuelven poco atractivo como variedad comercial, lo que provocó el desuso y su pérdida en el valle (Angel et al., 2016). Desde el año 2007 académicos de la Universidad de Tarapacá trabajan en la recuperación del PN, logrando iniciar su estudio, propagación y conservación; permitiendo el desarrollo

de iniciativas tales como su estudio en programas de fitomejoramiento tradicional, destacando el desarrollo de una nueva variedad denominada “Tunka Payani” que integra las cualidades organolépticas del PN y la mejor postcosecha de una variedad híbrida y también su uso como portainjerto (Bastías et al., 2020). Un portainjerto corresponde a una variedad (generalmente más rústica o silvestre) que se usa como base para el cultivo de una variedad comercial (injerto, porción aérea), siendo el portainjerto la que desarrolla su órgano radicular, donde la unión entre injerto y portainjerto forma una planta completa. Esta técnica es ampliamente utilizada en la agricultura, ya que permite conservar las características genéticas del injerto mediante la multiplicación de clones y acelerar la productividad al utilizar injertos adultos, y además otorga vigor al injerto al utilizar portainjertos tolerantes a estrés biótico y abiótico (Curzel et al., 2019; Williams et al., 2021). Se ha descrito que mediante esta técnica el sistema injerto-portainjerto combinan características autónomas, es decir que se desarrollan exclusivamente en el órgano en que se expresan, y no-autónomas que transitan a través del sistema dual y otorgan nuevas características al cultivo (Williams et al., 2021). En el caso de las características autónomas del portainjerto se puede destacar la tolerancia a estrés a sequía y salinidad que puede estar directamente ligada a la arquitectura de la raíz, absorción de iones, adaptaciones específicas en la expresión génica, entre otros (Williams et al., 2021).

Considerando que el PN es libre de protección intelectual por naturaleza, este permite proteger el desarrollo de nuevas variedades de portainjerto tolerantes a estrés abiótico. Es así como en el proyecto Anillo ACT192073, titulado Plant Abiotic Stress for a Sustainable Agriculture (PASSA), se propuso el objetivo de desarrollar nuevos portainjertos más tolerantes para sequía y salinidad mediante la edición por CRISPR/Cas9 de genes reguladores negativos a estrés salino y osmótico. Por ello en este trabajo de tesis se buscó indagar entre los genes reguladores negativos descritos en la literatura cuál sería el mejor blanco para generar un *knockout* en tomate PN e iniciar el proceso para obtener líneas editadas para dicho gen.

1.7.-Hipótesis y Objetivos de trabajo

1.7.1.-Hipótesis

La edición de genes reguladores negativos de la tolerancia a estrés por sequía o salinidad en tomate Poncho Negro permite el desarrollo de variedades más tolerantes a estrés abiótico.

1.7.2.-Objetivo General

Identificar genes reguladores negativos a la tolerancia a estrés por sequía o salinidad en tomate, cuantificar su expresión bajo estrés salino y osmótico y con ello seleccionar al mejor candidato para generar plantas de tomate Poncho Negro editadas genéticamente.

1.7.3.-Objetivos Específicos

OE1. Identificar genes candidatos reguladores negativos (RN) para la tolerancia a estrés por sequía o salinidad en tomate.

OE2. Cuantificar la expresión relativa de los genes candidatos RN en raíces de plantas de tomate PN y ACE sometidas a estrés agudo por salinidad o sequía.

OE3: Generar plantas editadas para genes RN en tomate var. Poncho Negro.

2.-Materiales y Métodos

2.1.-Materiales de Biología Molecular y Cultivo Celular

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para llevar a cabo las técnicas de biología molecular y cultivo celular de bacterias y plantas. Estos reactivos eran de marcas como Fermentas, Merck, Invitrogen, New England BioLabs, Promega, Axygen, Sigma-Aldrich y Phyto Technology Laboratories.

2.2.-Materiales Biológicos

Se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de las variedades Poncho Negro (concedida por Juan Pablo Martínez, INIA la Cruz) y ACE (Anasac), las que fueron cultivadas en invernadero de manera hidropónica o bien cultivadas *in vitro*.

2.3.-Metodos de Bioinformática

2.3.1.-Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda bibliográfica de genes que hayan sido caracterizados funcionalmente como reguladores negativos a estrés por salinidad o sequía en artículos de literatura primaria y revisiones, para ello se utilizaron buscadores en bases de datos como PubMed y Google Scholar. Se seleccionaron aquellos genes que se expresen de preferencia en raíces y que al ser inducidos en plantas generen susceptibilidad a salinidad o sequía.

2.3.2.-Búsqueda de ortólogos

A partir de los genes identificados en la literatura, se tomaron sus secuencias aminoacídicas y se utilizó la herramienta BLAST (tblastn) (Wheeler & Bhagwat, 2007) disponible en NCBI, para identificar los genes ortólogos en el genoma de referencia de tomate Heinz 1706. De los genes identificados, se elaboró un árbol filogenético en Phylogeny (phylogeny.fr) (Dereeper et al. 2008) con el análisis "One Click" para evaluar distancias filogenéticas entre cada uno de los genes. Para la selección de genes candidatos se consideró el porcentaje de identidad y cercanía filogenética contra las

secuencias de referencia, seleccionándose tres ortólogos para cada gen. Luego se alinearon las secuencias aminoacídicas de los genes seleccionados con CLUSTAL Omega (Madeira et al., 2022) para determinar la conservación de dominios, para ello se seleccionó un resultado de alineamiento Clustal con numeración de los residuos (*ClustalW with character counts*), se copió el alineamiento en Word y se destacaron aquellos residuos que coincidieran con la información arrojada en la pestaña “conserved domains” presente en la ficha del CDS de los genes *OsDIS1* y *SIACO2*.

Adicionalmente, se realizó una primera aproximación *in silico* de la expresión de los ortólogos seleccionados mediante el buscador eFP Browser (Universidad de Toronto, Canadá) (Ofori et al., 2018), plataforma que integra bases de datos transcriptómicas y las traduce en ilustraciones graficas para cada gen y tejido específico por cada estadio de desarrollo de la planta. Para su uso era necesario buscar el identificador del locus de cada gen en la nomenclatura utilizada en Sol Genomics Network (solgenomics.net) (SGN), sitio dedicado a los datos genómicos de las solanáceas, entre ellas el tomate. En SGN se realizó BLAST con las secuencias nucleotídicas tomadas de cada gen en NCBI, y así considerando el porcentaje homología más alto y cromosoma al que correspondía el alineamiento se identificó el locus ID de cada gen en la plataforma. Finalmente, en eFP se registraron los ID de cada gen y se realizó una búsqueda de expresión relativa en base a la fuente de datos “Rose Lab Atlas”, prestando atención a los resultados arrojados en la raíz de tomate.

2.3.3.-Diseño de partidores para PCR

A partir de las secuencias codificantes de los genes seleccionados se diseñaron partidores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la herramienta Primer-BLAST (Ye et al., 2012) considerando un tamaño aproximado de 20pb, GC cercano al 50% y un amplicón entre 150pb y 250pb. Luego se evaluó sus parámetros termodinámicos en Oligo Analyzer Tool disponible en el sitio web de Integrated DNA Technologies (IDT) y se solicitó su síntesis a IDT. Los partidores usados en esta tesis y su finalidad se encuentran en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1.- Partidores para qPCR en tomate var. ACE

Gen	ID NCBI	Orientación	Primer	Largo de fragmento
<i>SIDIS1</i>	101260503	Forward	CGA TGT CAA CCT GAG GTC ATT	177
		Reverse	CTG ATG GAT GGG TGG ATA C	
<i>SISINA5</i>	101263446	Forward	GTA CCT CGT TGC ACA CCT AAA	150
		Reverse	CAG AAC TGG TGA CCG AAA CA	
<i>SISINAT2</i>	101265083	Forward	GTG GCT GCA CGT TCA ATC	223
		Reverse	CCA TAA CCA CCA ACT TGT AG	
<i>SIACO2</i>	101251255	Forward	TTC AAG CCA AAG AGC CAA GA	188
		Reverse	TGT AGT AGG GAC GCA CAC TT	
<i>SIAct7</i>	101262163	Forward	TGT CCC TAT TTA CGA GGG TTA TGC	74
		Reverse	CAG TTA AAT CAC GAC CAG CAA GAT	
<i>SIUbq1</i>	101267758	Forward	GGG ATC CCA CCA GAT CAA CA	152
		Reverse	AGC AGC ACA CAG GAC ATT CA	
<i>SIPGK</i>	101254111	Forward	TGC TGG AAC GGA GGC TAT TG	212
		Reverse	TTG CTT AGG CGT CAT CCA GG	

Tabla 2.- Partidores para qPCR para tomate var. Poncho Negro

Gen	ID NCBI	Orientación	Primer	Largo de fragmento
<i>SIDIS1</i>	101260503	Forward	TGA GTC CCA ATG CTC CTT C	145
		Reverse	GCG ATG GTT GAA AGT ACT GC	
<i>SISINA5</i>	101263446	Forward	AGA CAG TTT AGA CGG GCT G	148
		Reverse	TCC CCA CGA TGA AGG AAG AT	
<i>SISINAT2</i>	101265083	Forward	TGC GAT TCA TGG GAG AGG AC	201
		Reverse	TAA GCT CTT CTC CGT TCC C	
<i>SIACO2</i>	101251255	Forward	ACT CCT CAA AGA CGG TCG AT	156
		Reverse	GCT AAT GAC ATC CGA GTC CC	
<i>SIAct7</i>	101262163	Forward	TGT CCC TAT TTA CGA GGG TTA TGC	74
		Reverse	CAG TTA AAT CAC GAC CAG CAA GAT	
<i>SIUbq1</i>	101267758	Forward	GGG ATC CCA CCA GAT CAA CA	152
		Reverse	AGC AGC ACA CAG GAC ATT CA	
<i>SIPGK</i>	101254111	Forward	TGC TGG AAC GGA GGC TAT TG	212
		Reverse	TTG CTT AGG CGT CAT CCA GG	

2.4.-Métodos de cultivo y transformación

2.4.1.-Cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 para transformación de tomate Poncho Negro

Treinta mL de medio Luria-Bertani líquido (LB; triptona 10g/L, extracto de levadura 5g/L y cloruro de sodio 10g/L) suplementado con gentamicina 50mg/L, espectinomicina 50mg/L y rifampicina 10mg/L se inocularon con 150µL de un precultivo de bacterias *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 transformada con el vector PGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2 (ver punto 2.5.1) y se cultivó durante dos días a 28°C en constante agitación hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.5-0.6. Posteriormente, se centrifugó a 3000g durante 15 minutos a 4°C y el precipitado obtenido se resuspendió en medio nutritivo Murashige y Skoog (MS) (PhytoTech Labs) (Murashige & Skoog, 1962) líquido suplementado con Acetosiringona 100µM más sacarosa al 1%. Finalmente, se midió nuevamente la D.O₆₀₀ para ajustar a un rango de 0.3-0.4.

2.4.2.-Cultivo de tomate en invernadero

2.4.2.1.-Cultivo hidropónico de tomate Poncho Negro y ACE

Se germinaron semillas de tomate PN y ACE en papel absorbente dentro de una placa Petri durante ocho días. Luego, fueron sembradas en lana de roca y dispuestas dentro de una bandeja de propagación con cubierta transparente y regadas con solución hidropónica (KNO₃ 0.125mM, Ca(NO₃)₂*4H₂O 0.15mM, MgSO₄*7H₂O 0.075mM, KH₂PO₄ 0.05mM, KCl 5µM, H₃BO₃ 5µM, MnSO₄*H₂O 1µM, ZnSO₄*7H₂O 200nM, CuSO₄ 150nM, Na₂O₃Si 10µM, Fe/DTPA 10µM, pH 6). Al cabo de una semana las plántulas fueron aclimatadas a las condiciones del invernadero (fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad, iluminadas con luz led blanca (intensidad 79.3 µMs⁻¹m⁻²), humedad relativa del 50% y a 20-22°C) de manera paulatina. Dos días después se separaron en bandejas individuales de cultivo hidropónico, el cual contaba con sistema de recirculación y oxigenación de la solución hidropónica de manera constante. Las plantas fueron crecidas hasta las 5 semanas para ensayo de estrés salino y osmótico.

2.4.2.2.-Ensayo de estrés agudo osmótico y salino en tomate Poncho Negro y ACE

Para el ensayo de estrés agudo se utilizaron plantas de tomate PN y ACE con 5 semanas de edad post germinación en cultivo hidropónico. El ensayo se dividió en 3 bandejas independientes, una por cada condición con 27 plantas cada uno: control o medio basal, el cual fue llenado con solución hidropónica; estrés salino, medio basal suplementado con 250mM NaCl; y estrés osmótico, medio basal suplementado con PEG 6000 (Merk) al 26,5% (Lan et al., 2020; Liu et al., 2015; Ma et al., 2019). Se recolectaron las raíces a las 0, 3, 6 y 24hrs posterior al inicio del ensayo (Liu et al., 2018; Ma et al., 2019), fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y luego almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

2.4.3.-Cultivo *in vitro* y transformación de tomate Poncho Negro

2.4.3.1.-Introducción de segmentos nodales

Para la introducción de estacas de campo se tomaron segmentos nodales de 2 a 3 cm de largo de plantas de tomate PN cultivados en invernadero, los que fueron esterilizados en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 8,25% v/v más captán 1X (fungicida) (Anasac). Se realizaron 3 enjuagues con agua estéril y se eliminó el exceso de agua posando las estacas sobre papel absorbente estéril. Luego, se depositaron en el medio de introducción o MI (Tablas 3 y 4) y fueron incubadas en una cámara de cultivo a fotoperiodo de 16 horas luz / 8 horas oscuridad a 22°C. Los brotes obtenidos por este medio fueron utilizados como material vegetal para propagación *in vitro* y transformación.

2.4.3.2.-Estandarización de la organogénesis somática de tomate Poncho Negro

El protocolo de organogénesis de tomate Poncho Negro fue modificado a partir de Arias et al., 2021 y Pino et al., 2010. Para evaluar las mejores condiciones de regeneración *in vitro* de tomate PN se tomaron explantes de hoja y tallo, de 1cm² y 1cm respectivamente, de plantas cultivadas *in vitro* y dispuestas en medio MS suplemento con 1-, 2- o 3% de sacarosa (sac) más dos combinaciones hormonales trans-zeatina (ZEA) con ácido indol-3-butírico (IBA) (M1 Tabla 3) o 6-bencilaminopurina (BAP) con IBA (M1 Tabla 4). El

medio nutritivo fue refrescado cada 4 semanas y se tomó registro fotográfico de las placas a 1 y 2 meses. Adicionalmente, se repitió la experiencia con explantes de cotiledón e hipocótilo de plántulas de 8 días post germinación crecidas *in vitro* en medio MG (Tablas 3 y 4). Se dispusieron los explantes en medio MS 1x con 1% sac y se analizó el efecto de las combinaciones hormonales ZEA más IBA (M1 Tabla 3) y BAP más IBA (M1 Tabla 4) en cotiledón y BAP más IBA (M1 Tabla 4) en hipocótilo. Se refrescó el medio nutritivo cada 2 semanas y se tomó registro fotográfico de las placas a 1 y 2 meses. Para cada ensayo se determinó el porcentaje de sobrevivencia de los explantes al primer y segundo mes, inducción de callos al primer mes e inducción de brotes al segundo mes, para ello se aplicaron las siguientes formulas:

$$(1) \% \text{ sobrevivencia} = (N^{\circ} \text{ explantes vivos} - N^{\circ} \text{ explantes iniciales}) * 100$$

$$(2) \% \text{ inducción de callos} = (N^{\circ} \text{ explantes con callos} - N^{\circ} \text{ explantes iniciales}) * 100$$

$$(3) \% \text{ inducción de brotes} = (N^{\circ} \text{ explantes con brotes} - N^{\circ} \text{ explantes iniciales}) * 100$$

Tabla 3.- Composición de medios de cultivo para la transformación y organogénesis somática de tomate var. Poncho Negro a partir de hoja y cotiledón. Nomenclatura de medios: MI (Introducción de segmento nodal), MG (Germinación), M1 (Pre-cultivo), M2 (Co-cultivo), M3 (Inducción de callo), ME (Elongación de brotes).

Composición	MI	MG	M1	M2	M3	ME
MS	4.4g/L	2.2g/L	4.4g/L	4.4g/L	4.4g/L	4.4g/L
Myo-inositol	180mg/L	180mg/L	180mg/L	180mg/L	180mg/L	180mg/L
Sacarosa	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L
Agar-Agar	7g/L	7g/L	7g/L	7g/L	7g/L	7g/L
BAP	2mg/L	-	-	-	-	-
ZEA	-	-	2mg/L	2mg/L	2mg/L	-
GA3	0.2mg/L	-	-	-	-	-
IBA	-	-	0.1mg/L	0.1mg/L	0.1mg/L	-
Acetosiringona	-	-	-	100uM	-	-
Timentin	-	-	-	-	300mg/L	-

Tabla 4.- Composición de medios de cultivo para la transformación y organogénesis somática de tomate var. Poncho Negro a partir de tallo e hipocótilo. Nomenclatura de medios: MI (Introducción de segmento nodal), MG (Germinación), M1 (Pre-cultivo), M2 (Co-cultivo), M3 (Inducción de callo), ME (Elongación de brotes).

Composición	MI	MG	M1	M2	M3	ME
MS	4.4g/L	2.2g/L	4.4g/L	4.4g/L	4.4g/L	4.4g/L
Myo-inositol	180mg/L	180mg/L	180mg/L	180mg/L	180mg/L	180mg/L
Sacarosa	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L	10g/L
Agar-Agar	7g/L	7g/L	7g/L	7g/L	7g/L	7g/L
BAP	2mg/L	-	2mg/L	2mg/L	2mg/L	-
GA3	0.2mg/L	-	-	-	-	-
IBA	-	-	0.1mg/L	0.1mg/L	0.1mg/L	-
Acetosiringona	-	-	-	100uM	-	-
Timentin	-	-	-	-	300mg/L	-

2.4.3.3.-Transformación de explantes y regeneración por organogénesis somática de tomate Poncho Negro

El protocolo de transformación fue modificado a partir de Arias et al., 2021 y Pino et al., 2010, utilizando el sistema de regeneración que se desprende del punto 2.4.2.2. El contenido de los medios de cultivo se detalla en la Tabla 3. Los explantes fueron cortados por la mitad y pre-cultivados en medio M1 por dos días, luego se sumergieron por 15-20 minutos en una solución que contiene *A. tumefaciens* GV3101::pMP90 transformada con el vector PGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2 (sección 2.5.1) y luego se traspasaron al medio de co-cultivo M2 y se mantuvieron durante dos días en oscuridad a 22°C en la cámara de cultivo. Posteriormente, los explantes transformados fueron limpiados con papel absorbente estéril con el objetivo de eliminar el exceso de *A. tumefaciens* y traspasados al medio de inducción de callo M3 suplementado con kanamicina (20mg/L), y dispuestos con su cara abaxial en contacto con el medio. Luego de 6 semanas, los explantes fueron traspasados a un medio M3 con kanamicina (40mg/L) con el fin de eliminar el número de callos sin transformar. Durante todo el proceso las placas fueron refrescadas cada dos semanas.

2.5.-Métodos de Biología Molecular

2.5.1.-Vector binario PGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2

El vector utilizado para la transformación estable de tomate PN es el vector binario pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2, el cual fue diseñado en el trabajo de Seminario de Título de Jorge Silva (2023) y el trabajo de Samuel Parra para el proyecto Anillo ACT-192073. Este vector posee la secuencia codificante para Cas9 y dos ARNg complementarios a la secuencia del gen *SIACO2* -uno a cada extremo del gen- con el fin de generar una delección de 2593pb de un total de 2854pb. Esta construcción posee entre los extremos RB y LB el gen *Cas9* dirigido por el promotor de Ubiquitina del perejil (*Petroselinum crispum*) con el terminador G7 (*t-G7*) de *Agrobacterium*. La construcción también contiene los ARNg junto a su Scaffold dirigidos por el promotor AtU6 (*pAtU6-26*) de *Arabidopsis thaliana* con terminador del ARN 35S (*t-35S*) del virus del mosaico de coliflor y finalmente el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II comandada por el promotor y terminador de la nopalina sintetasa (*p-NOS* y *t-NOS*) (Figura 2).



Figura 2.- Esquema de construcción del ADN-T del vector pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2. De izquierda a derecha: Borde Derecho (RB), construcción para expresión del gen para Cas9 (*pPcUBI*, *AtCas9*, *tG7*), construcción para expresión de los ARNg (*pAtU6-26*, *ARNg-Scaffold*, *ARNg-Scaffold*, *t35S*), construcción para otorgar resistencia a kanamicina (*pNOS*, *NptII*, *tNOS*).

2.5.2.-Extracción de ácidos nucleicos

2.5.2.1.-Extracción y cuantificación de ARN de raíz de tomate

Para la extracción de ARN se siguió el protocolo descrito en Arias et al., 2021. El tejido recolectado de los ensayos de estrés fue macerado en un mortero frío hasta la obtención de polvo fino en presencia N₂ líquido y luego se realizó la extracción de ARN con el uso de buffer CTAB (CTAB 2%, PVP40 (MP. 40.000) 2%, EDTA 25mM, NaCl 2M, TrisHCl 100mM (pH 8.0), trihidroclorato de espermidina 0.05% y β-mercaptoetanol 2%). Luego el ARN fue precipitado con LiCl 10M y el pellet resultante lavado con etanol 70%. Finalmente, se resuspendió en buffer TE (pH 7.5, Tris-HCL 10 mM (pH 8.0), EDTA 1

mM) y almacenado a -80°C hasta su uso. Para evaluar la integridad del ARN extraído se realizó electroforesis en gel de agarosa (punto 2.5.4) y se cuantificó en espectrofotómetro Epoch2 (Agilent), analizando su relación $A_{260/280}$ para evaluar contaminación.

2.5.2.1.-Extracción y cuantificación de ADN de callos de tomate Poncho Negro

Para la extracción de ADN a partir de callos regenerados de tomate PN se utilizó el kit FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen) y se siguió el protocolo definido por el fabricante. Luego, se evaluó la integridad del ADN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.5.4) y se cuantificó en espectrofotómetro Epoch2 (Agilent), analizando su relación $A_{260/280}$ para evaluar contaminación por proteínas.

2.5.3.-Reacción en cadena de la polimerasa, PCR

2.5.3.1.-Síntesis de ADNc de tomate

Con el objetivo de sintetizar la hebra de ADN complementaria (ADNc) al ARN mensajero de tomate, se realizaron reacciones de transcripción reversa (RT) utilizando la enzima Improm-II Reverse Transcription (Promega) de acuerdo a lo descrito en Arias et al., 2021. Primero, se tomó una alícuota de $2\mu\text{g}$ de ARN y se eliminaron trazas de ADN genómico mediante tratamiento por 40min con DNasa I (Thermo Fisher). Luego, una alícuota de $9\mu\text{L}$ (900ng) del ARN tratado con DNasa I se incubó con $1.5\mu\text{L}$ de oligo dT (Promega) a 70°C por 5min, luego fueron dejadas en hielo por 5min, y posteriormente se adicionó $10.5\mu\text{L}$ del mix de RT ImProm-II (Promega) ($4\mu\text{L}$ de buffer RT ImProm II 5x, $3\mu\text{L}$ de MgCl_2 50mM, $0.5\mu\text{L}$ de RNasin (Inhibidor de ARNasas), $1\mu\text{L}$ de dNTPs 10mM, $1\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas y $1\mu\text{L}$ de la enzima RT ImProm II). Se incubó a 25°C por 5min y finalmente se sintetizó la hebra de ADN complementaria por 60min a 42° .

2.5.3.2.-PCR de punto final

Para evaluar la calidad del cDNA e integridad del ADN genómico (ADNg) se amplificó el gen *SActina4* con los partidores *Forward* 5' CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT 3' y *Reverse* 5' GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT 3' por PCR de punto final con la enzima

SapphireAmp (Takara Bio) en un termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems) de acuerdo con el programa descrito en la Tabla 5 y se reveló el amplicón con electroforesis en gel de agarosa (sección 2.5.4).

Tabla 5.- Programas de PCR de punto final. En la tabla se describen los pasos para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las enzimas SapphireAmp (Takara) y Taq DNA Polymerase (Sigma). La temperatura de alineamiento de los partidores es específica para los partidores de cada gen, correspondiendo a 52°C para amplificar SIActina4 y 59°C para SIACO2 (Revisar punto 2.5.3).

Paso	SapphireAmp (Takara)		Taq DNA Polymerase (Sigma)	
	Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	94°C	30 seg	94°C	3 min
Denaturación	98°C	5 seg	94°C	45 seg
Alineamiento	X°C	5 seg	X°C	30 seg
Extensión	72°C	10 seg x Kb	72°C	90 seg x Kb
Extensión final	72°C	1 min	72°C	10 min

Adicionalmente, se amplificó el gen *SIACO2* con la enzima Taq DNA Polimerasa (Sigma) con los partidores *Forward* 5' ACC CAA ACA AAG CCT CAA TCT 3' y *Reverse* 5' CAG AAA CAC ATC TCA TTT TTG GGT 3' con el fin de determinar la edición del gen *SIACO2* (Programa de PCR en Tabla 5), esperando una banda de 2843pb para el gen silvestre y 250pb del mutante, producto de la diferencia entre 2843 pb y 2593 pb (Figura 3).

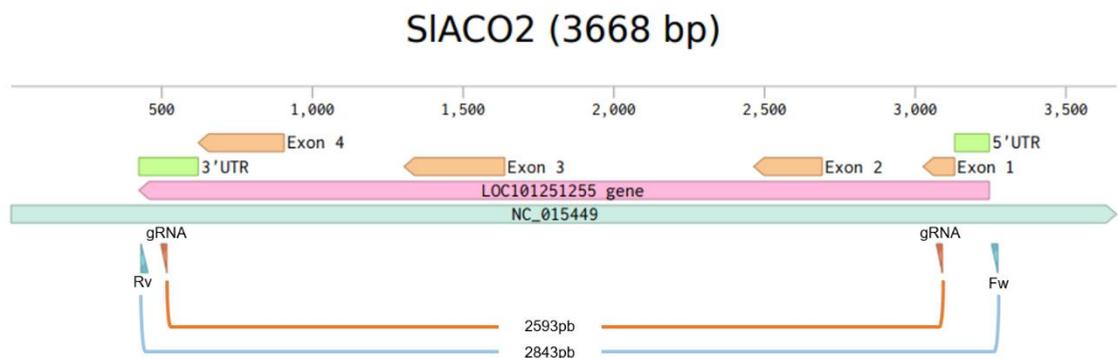


Figura 3.- Estrategia de amplificación del gen SIACO2 en tomate Poncho Negro. En la ilustración se observa una región de 3668pb del cromosoma 12 de tomate anotada como NC_015449 donde está codificado el gen *SIACO2* (ID:101251255), abarcando una longitud de 2854pb, de los cuales 951pb – divididos en 4 exones – codifican para la proteína SIACO2. Se diseñaron dos ARNg (gRNA, flechas naranjas) con el fin de generar una edición de 2593pb. Los dos partidores, fuera del área de corte, amplifican 2843pb en el gen silvestre o 250pb del mutante producto de la diferencia entre 2843 pb y 2593 pb.

2.5.3.3.-Evaluación de eficiencia de partidores para qPCR

Para evaluar la eficiencia de los sets de partidores para los genes a ser analizados por PCR cuantitativa (qPCR) (Tablas 1 y 2), se tomó una alícuota de 1µL de una dilución 1:10 del cDNA de tomate, se amplificó por PCR de punto final los amplicones para cada uno de éstos con la enzima SapphireAmp (Takara) y se reveló el producto por electroforesis en gel de agarosa (sección 2.5.4). Posteriormente, se purificó el producto de PCR con el kit E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (OMEGA Bio-tek) y se realizó una dilución 1:100 del purificado a la cual luego se le realizó siete diluciones seriadas a una relación 1:10. Después se hizo qPCR para cada una de las diluciones seriadas con el mix para qPCR Forget-Me-Not EvaGreen (Biotium) en el termociclador Stratagene Mx3000P. Se normalizó el umbral de fluorescencia (Ft) para cada placa de qPCR, se verificó la ausencia de productos inespecíficos de la reacción analizando la curva de disociación y se realizó la regresión lineal entre el logaritmo de la dilución y el ciclo umbral (Ct) para cada punto. Finalmente, se calculó la eficiencia con la siguiente ecuación:

$$Eficiencia (\%) = (10^{\frac{1}{pendiente}} - 1) * 100$$

La qPCR se realizó con aquellos partidores que poseen un porcentaje en el rango 80-100% de eficiencia.

2.5.3.4. qPCR de genes reguladores negativos candidatos en plantas de tomate sometidas a estrés salino y osmótico

La qPCR se realizó con diluciones 1:12 de cada ADNc de las muestras del ensayo (sección 2.4.2.2) con cada set de partidores para los genes *SIDIS1*, *SISINA5*, *SISINAT2* y *SIACO2* (Tablas 1 y 2) en el termociclador Stratagene Mx3000P utilizando el compuesto fluorescente EvaGreen (Biotium). Se normalizó el umbral de fluorescencia para cada placa de qPCR y finalmente se tabularon los valores de Ct de cada muestra y se analizó la expresión relativa de cada gen a partir del método Pfaffl (Pfaffl, 2001), según la siguiente ecuación:

$$(1) \text{ Razon de cambio} = \frac{E_{Gen\ de\ interés}^{\Delta Ct_{Gen\ de\ interés}}}{E_{Gen\ normalizador}^{\Delta Ct_{Gen\ normalizador}}}$$

Donde:

$$(2)\Delta Ct = \bar{x}Ct_{Muestra\ calibradora} - Ct$$

Correspondiendo las muestras del tiempo 0hrs a la muestra calibradora.

Para seleccionar el mejor gen normalizador se evaluaron los genes *SIAct7*, *SIUBQ* y *SI α Tub* (Tablas 1 y 2) los cuales se ha descrito presentan estabilidad bajo condiciones de estrés abiótico (Coker & Davies, 2003). Se les realizó qPCR con el cDNA de las muestras del ensayo, se normalizó Ft, se tabularon los valores de Ct y se analizó la estabilidad en la plataforma RefFinder (Xie et al., 2012), la cual utiliza cuatro métodos para evaluar estabilidad -geNORM, NormFinder, BestKeeper y delta-Ct- comparando cada gen y clasificándolos según la variabilidad que presenta el gen dentro de las condiciones estudiadas, indicando cual sería el más estable o con menor variabilidad dentro del grupo.

2.5.4.-Electroforesis en gel de agarosa

La integridad de los ácidos nucleicos extraídos y la presencia de productos de PCR fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa en un rango del 1% al 2%, dependiendo del tamaño esperado de las bandas. Al momento de preparar los geles se añadió bromuro de etidio (BrEt) a una concentración de 400ng/mL. Se utilizó el tampón de corrida TAE 1X (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM), y un tampón de carga 6X para las muestras (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilencianol, 15% glicerol) en la proporción 5:1. Para la migración electroforética se aplicaron entre 80 y 100 voltios durante 45 minutos para separar moléculas de ADN y 70 voltios durante 20 minutos para ARN. Posteriormente, se visualizaron las bandas bajo luz UV en un transiluminador DarkRoom Multigenius Syngene y se capturaron a través del programa GeneSnap de Syngene.

3.-Resultados

3.1.-Genes Reguladores Negativos

En el marco del proyecto PASSA, iniciamos la búsqueda de genes reguladores negativos (RN) en publicaciones científicas y base de datos de transcriptomas de diferentes plantas (Benny et al., 2019; Zafar et al., 2020) sometidas a estrés abiótico, seleccionando cerca de 50 genes RN. Estos genes los fuimos clasificando de acuerdo con (1) si se inducen o reprimen ante sequía o salinidad y (2) el efecto frente a estrés abiótico que genera su sobreexpresión o *knockout* en las plantas estudiadas. Considerando lo anterior, nuestro criterio de selección de los RN candidatos se basó en elegir aquellos genes cuyo análisis de expresión indicase que se inducen ante estrés osmótico o salino y que su análisis funcional demuestre que la sobreexpresión provoque susceptibilidad en la planta o, de forma contraria, el *knockout* o silenciamiento otorgue tolerancia a esos estímulos; seleccionándose 5 genes para su estudio (Tabla 6), tres de ellos con actividad E3 ubiquitin ligasa y dos involucrados en la ruta de la biosíntesis del etileno. En este trabajo de tesis nos enfocamos en el estudio de los genes *OsDIS1* y *TaACO1*, mientras que los otros han sido abordados por otros estudiantes del proyecto.

Tabla 6.- Genes reguladores negativos a sequía o salinidad candidatos a estudiar en proyecto PASSA. En la tabla se describe un grupo de genes reguladores negativos a estrés salino u osmótico, cuya sobreexpresión produzca susceptibilidad en la planta y su silenciamiento o knockout mayor tolerancia ante dichos estreses.

Gen	Descrito en	Nombre completo	Referencias
<i>OsSRFP1</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i> Stress-related RING Finger Protein 1	Fang et al, 2015; Zafar et al, 2019.
<i>OsDIS1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Drought Induced SINA Protein 1	Ning et al, 2011 a; Ning et al, 2011b; Zafar et al, 2019.
<i>TaACO1</i>	<i>Triticum aestivum</i>	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Chen et al, 2014; Benny et al, 2019
<i>OsiSAP7</i>	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	Stress Associated Protein 7	Sharma et al, 2015; Zafar et al, 2019.
<i>AtACS6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	Benny et al, 2019

3.1.1.-*OsDIS1*

OsDIS1 pertenece a la familia de proteínas SINA que corresponde a un grupo acotado de proteínas con actividad E3 ubiquitina ligasa que poseen un dominio RING y SINA. Se ha descrito que este grupo de proteínas regulan procesos en el desarrollo y la respuesta a estrés en plantas (Li et al., 2020; Wang et al., 2018). *OsDIS1*, un gen identificado y caracterizado en arroz (*Oriza sativa*) (Ning et al., 2011a; Ning et al., 2011b) que codifica para la proteína SINA 1 inducida por sequía (*OsDIS1* por sus siglas en inglés). Se ha descrito que ésta interactúa con *OsSKIPa* y *OsNek6*, proteínas que inducen de manera directa o indirecta la expresión de genes en respuesta a sequía, ubiquitinando y enviando a degradación vía proteasoma 26S a dichos elementos (Figura 4A, Modificado de Ning et al., 2011b) (Ning et al., 2011b). Ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de este gen en arroz muestran que las líneas silenciadas tienen mayor sobrevivencia después de un evento de sequía y aquellas sobreexpresoras no logran recuperarse (Figura 4B, Ning et al. 2011a). Además, análisis de expresión muestran que *OsDIS1* es inducido en sequía (Ning et al., 2011a).

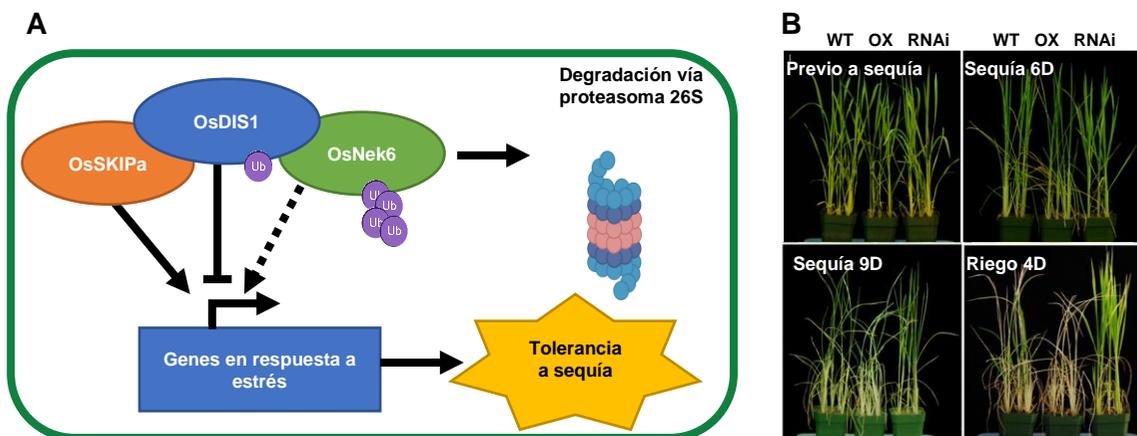


Figura 4.- *OsDIS1*, gen regulador negativo de la tolerancia a sequía en arroz. (A) *OsDIS1* es una proteína con actividad E3 ubiquitina ligasa que interactúa con *OsSKIPa* y *OsNek6*, factor de transcripción y proteína quinasa respectivamente, los que regulan positivamente la expresión de genes que otorgan tolerancia a sequía. En Ning et al., 2011b se describe que *OsDIS1* ubiquitina *OsNek6* lo señala para degradación vía proteasoma 26S, actuando, así como regulador negativo a la tolerancia a sequía. (B) Ensayos de sequía prolongada en líneas sobreexpresoras (OX) y silenciadoras (RNAi) para *OsDIS1* en *Oriza sativa*, demuestran que la sobreexpresión de este gen disminuye la sobrevivencia de las plantas de arroz y el silenciamiento la aumenta al recuperar el riego respecto al control (WT) (Ning et al. 2011a).

Adicionalmente, se ha descrito un ortólogo de *OsDIS1* en trigo, el gen *TaDIS1* (*Triticum aestivum*) (Liu et al., 2018). Estudios de expresión muestran que *TaDIS1* es inducido

frente a sequía, salinidad y ABA (Liu et al., 2018). Teniendo en consideración estos antecedentes, que coinciden con nuestra definición de RN, se buscaron ortólogos de *OsDIS1* en el genoma de referencia de tomate Heinz 1706 mediante el uso de BLAST disponible en el sitio web del NCBI, encontrando alineamientos significativos con cobertura e identidad superior al 50% en 6 de los 12 cromosomas de tomate y se buscaron los genes que coincidían con estos alineamientos, encontrando 13 genes homólogos a *OsDIS1*. Se obtuvieron los códigos de acceso de estos y se descartaron aquellos anotados como *SINA-like* debido al menor tamaño de sus proteínas, observando diferencias mayores a 50aa respecto *OsDIS1* (301aa), y al momento de elaborar un árbol filogenético estas secuencias agrupaban en un clado distinto (información sin mostrar); quedando 8 restantes los cuales son *SISINA1/2/3/4/5/6*, *SISINAT2* y *SIDIS1*. Con estos genes se obtuvieron sus secuencias aminoacídicas y se elaboró un árbol filogenético a través de alineamiento múltiple (Figura 5). Se observa que, de las 8 proteínas, *SIDIS1* forma una rama junto a *OsDIS1*, indicando que estas proteínas están altamente emparentadas entre sí. Si analizamos el resto del árbol desde este punto, podemos observar que hacia arriba se forma una nueva rama que contiene 5 miembros de la familia SINA (*SISINA1/2/3/4/6*), mientras que hacia la raíz encontramos a *SISINA5* y *SISINAT2* siendo elementos que se desprenden como primeras ramificaciones del árbol. En base a ello, se consideró analizar a *SIDIS1* por su cercanía con *OsDIS1*, y *SISINA5* y *SISINAT2* que al ser proteínas con características ancestrales podrían conservar identidades que caracterizan funcionalmente a *OsDIS1*.

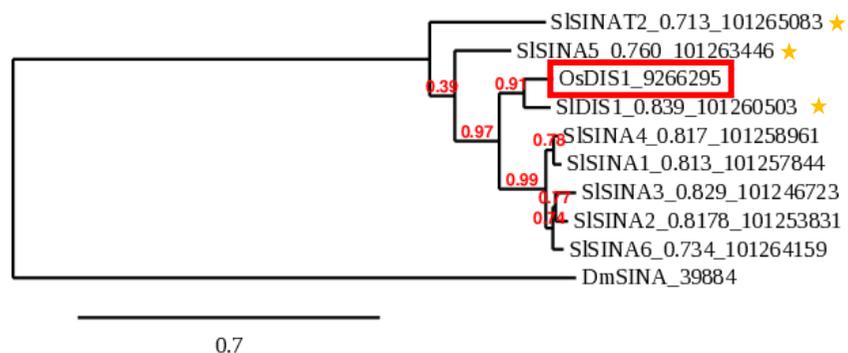


Figura 5.- Árbol filogenético de proteínas de los genes ortólogos de *OsDIS1*. Árbol filogenético elaborado con secuencias aminoacídicas de proteínas de la familia SINA, enraizado con la secuencia aminoacídica del gen *DmSINA*. Para cada proteína se identifica el nombre, seguido el porcentaje de identidad contra *OsDIS1* y luego el ID de NCBI de su gen. Encerrado en el recuadro rojo se encuentra *OsDIS1*, descrito como regulador negativo para sequía en arroz (Ning et al., 2011a; Ning et al., 2011b), y la estrella amarilla indica los genes seleccionados para su análisis en esta tesis.

En ese sentido, cabe destacar que *SIDIS1*, *SISINA5* y *SISINAT2* poseen 83.9%, 76% y 71,3% de identidad aminoacídica con *OsDIS1*, los dominios que caracterizan a esta proteína -SINA y RING- y los residuos que otorgan sus diversas funciones son altamente conservados entre estas 3 proteínas de tomate (Figura S1); así también conservan la His71, necesaria para la actividad de esta familia proteica (Ning et al, 2011b), por lo que conservarían su actividad catalítica. Al agregar más elementos a este análisis – *SISINA3* y *SISINA4*, aquellos con mayor homología en la rama superior –, observamos que la única región funcional que presenta variabilidad es aquella que genera la interfaz de dímero (Figura S1), clave para la interacción proteína-proteína, donde *SIDIS1* conserva 11 de los 13 aminoácidos (aa) respecto *OsDIS1*; *SISINAT2* y *SISINA5* conservan 9aa; *SISINA4* 8aa y *SISINA3* 7aa, lo que refuerza la selección de *SIDIS1*, *SISINA5* y *SISINAT2* como candidatos para evaluar como RN en tomate debido a que conservan más residuos responsables de la interacción proteína-proteína.

Adicionalmente, se hizo una aproximación a su expresión en raíz bajo condiciones normales de cultivo utilizando el buscador eFPBrowser (Figura 6) donde se destaca que, entre los tres genes seleccionados, *SIDIS1* y *SISINAT2* se expresan 0.63 y 3.22 veces más que *SIPHGPx*, gen normalizador de la plataforma, mientras que *SISINA5* posee una expresión relativa similar que el normalizador (-0.08 veces).

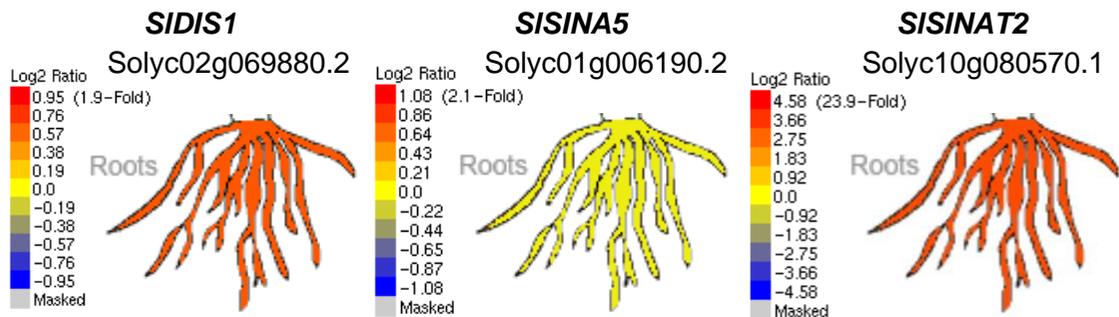


Figura 6.- Expresión relativa *in silico* de genes de la familia SINA en raíces de tomate. Representaciones graficas fluorescentes electrónicas (eFP) en raíz de tomate cultivados en condiciones normales. A la izquierda se observa en escala de colores la expresión relativa a *SIPHGPx* (glutación peroxidasa), a la derecha la representación grafica de una raíz de tomate y por encima de ambos el nombre de gen al que corresponde el conjunto y su código SGN.

En base a ello escogimos los tres genes para determinar los niveles de expresión frente a estrés salino y osmótico (ver sección 3.1.3), un parámetro/criterio determinante para ser seleccionado como candidato a ser editado de tal modo que se genere un efecto de tolerancia a salinidad o sequía, similar a lo descrito para *OsDIS1* (Ning et al., 2011a).

3.1.2.-*TaACO1*

El gen *TaACO1* de trigo (*Triticum aestivum*) codifica para la ACC oxidasa (ACO), que cataliza el último paso de la ruta de síntesis de etileno (Figura 7A). El etileno es una hormona gaseosa que dirige el desarrollo de la planta, la maduración de frutos y respuestas ante estrés biótico y abiótico. En particular, el etileno es un regulador negativo a la respuesta ante estrés salino en raíces. Su ruta de biosíntesis comienza a partir de la metionina y se requiere de la acción de tres enzimas para la obtención de etileno, siendo las más importantes la ACC sintasa (ACS) y la ACC oxidasa (ACO). Se ha descrito que el gen que codifica para la ACO en trigo (*Triticum aestivum*) (*TaACO1*) se reprime ante estrés abiótico, particularmente aquel inducido por sequía, salinidad y

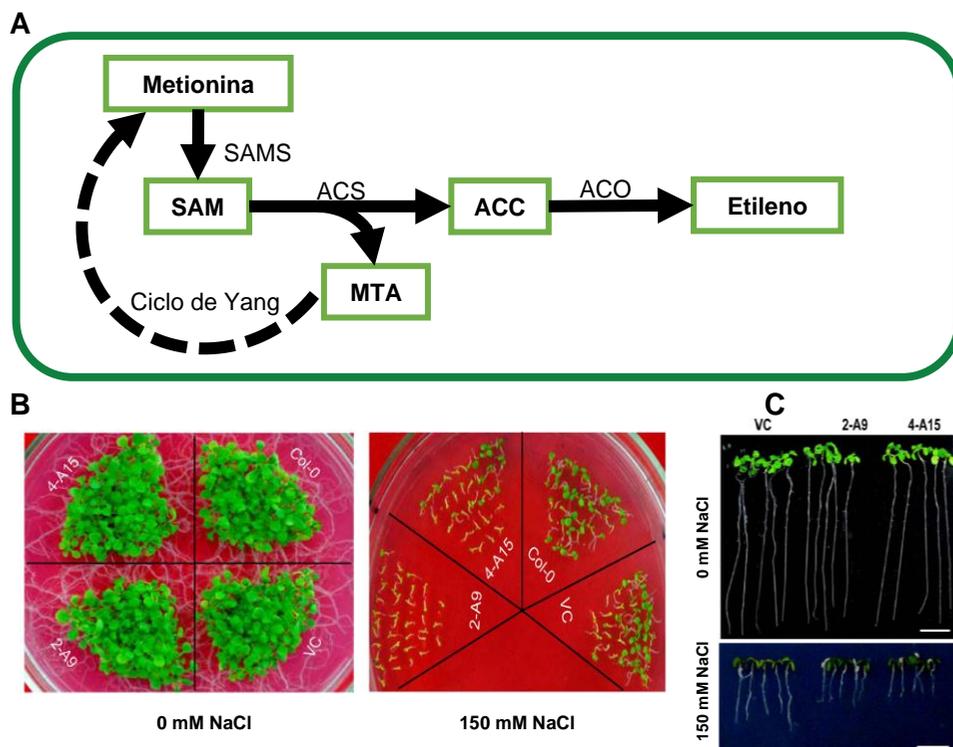


Figura 7.- *TaACO1*, gen regulador negativo para la tolerancia a salinidad en trigo. (A) Ruta de la biosíntesis del etileno. El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina, que con la acción de la SAM-sintetasa (SAMS) se le añade una metionina, formando S-adenosil-L-metionina (SAM); luego se forma 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) gracias a la acción de la ACC-sintetasa (ACS) el cual es posteriormente oxidado por la ACC-oxidasa (ACO) para formar etileno. Adicionalmente, la ACS tiene una vía alternativa, formando 5'-metiltioadenosina (MTA), permitiendo reciclar este compuesto a metionina mediante el Ciclo de Yang. (B y C) Comparación de la germinación y largo de raíz de líneas de trigo Col-0, vector sin inserto (VC) y sobreexpresoras de *TaACO1* (2-A9 y 4-A15) cultivadas *in vitro* y sometidas a 150 mM de NaCl (Chen et al. 2014). Se observa que las líneas sobreexpresoras tardan más en germinar y presentan una raíz más corta respecto a los controles bajo la condición salina (150 mM NaCl).

ABA (Chen et al., 2014). Sin embargo, al expresar constitutivamente este gen en *Arabidopsis thaliana* y analizar el efecto de la salinidad sobre la germinación de semillas, largo de raíz principal y verdor de los cotiledones, observaron un menor desarrollo de la *Arabidopsis* sobreexpresoras del gen (Figuras 7B y 7C).

Al igual que en la sección anterior, se buscaron ortólogos a *TaACO1* en el genoma de referencia de tomate utilizando BLAST de NCBI. La búsqueda arrojó alineamientos significativos en los 12 cromosomas del tomate y un *scaffold* sin integrar, es decir, dicha secuencia, hasta la última versión publicada del genoma de referencia de tomate (SL4.0), no ha sido posible ensamblar dentro de ninguno de los cromosomas. Luego se filtró seleccionando aquellas que tuvieran un porcentaje de identidad superior al 40% y cobertura mayor a 50%, quedando alineamientos en 6 cromosomas, de los cuales solo 4 codificaban 7 genes anotados como ACC oxidasas (*SIACO1/2/3/4/5/6/7*). Se tomaron las secuencias aminoacídicas de estos genes y se elaboró un árbol filogenético a través de alineamiento múltiple (Figura 8). Adicionalmente, en un estudio publicado de un transcriptoma de variadas especies vegetales, entre ellas el tomate, sometidas a sequía (Benny et al., 2019) identificamos ortólogos de *TaACO1* diferencialmente expresados; sin embargo, estos estaban con su código de acceso para la plataforma SGN (Solyc12g005940.1 y Solyc02g036350.2). Al no tener un conversor para obtener el código del gen en NCBI fue necesario buscar las secuencias codificantes de estos genes en SGN y con ellas realizar BLAST en NCBI, encontrando que el código Solyc12g005940.1 corresponde a *SIACO2* y Solyc02g036350.2 a *SIACO6*. Considerando lo anterior y según lo publicado en Benny et al. 2019 ante sequía el gen *SIACO2* presenta una regulación positiva en su expresión y *SIACO6* una regulación negativa. Un antecedente importante que destacar es que Chen et al. 2014 describe que *TaACO1* es un gen que no se induce bajo estrés abiótico; en ese sentido, *SIACO7*, el ortólogo más cercano a *TaACO1* (Figura 8), podría comportarse de la misma forma, idea que toma fuerza al no encontrarse en la lista de los genes diferencialmente expresados en Benny et al. 2019. Es por lo anterior que seleccionamos el gen *SIACO2* como principal candidato a evaluar debido a que éste se regula de manera positiva frente a sequía en tomate, y así también a sus dos parálogos más cercanos *SIACO1* y *SIACO3* (Figura 8). Con ello se realizó alineamiento múltiple en CLUSTAL Omega con

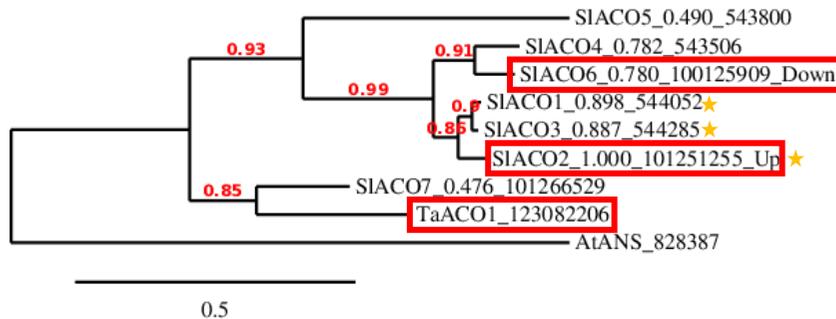


Figura 8.- Árbol filogenético de proteínas de los genes ortólogos de *TaACO1*. Árbol filogenético elaborado con secuencias aminoacídicas de proteínas de la familia PLN02299, cuales codifican los genes ACC oxidasa en distintas especies. Este árbol fue enraizado con la secuencia aminoacídica del gen *AtANS*, seleccionada por homología estructural. Para cada proteína se identifica el nombre, seguido el porcentaje de identidad contra *SIACO2* y luego el ID de NCBI de su gen. Dentro del cuadro rojo se encuentran aquellos descritos en la literatura: *TaACO1*, descrito como regulador negativo para salinidad en trigo (Chen et al. 2014); *SIACO2*, el cual se regula positivamente en hojas de plantas de tomate sometidas a sequía (Benny et al. 2019); y, *SIACO6*, que se regula negativamente en hojas de tomate bajo sequía (Benny et al. 2019). La estrella amarilla indica los genes seleccionados para su análisis en esta tesis.

las secuencias aminoacídicas de los genes *SIACO1/2/3* para evaluar la conservación de dominios y aminoácidos clave para su actividad (Figura S2), observando que las tres proteínas son altamente conservadas entre sí; y al comparar con *TaACO1* y *SIACO7*, observamos que estas últimas serían insensibles a glutationilación, poseen modificaciones en sitios importantes para la actividad enzimática y un inserto de 9aa próximo al extremo amino terminal de la proteína (Figura S2).

El análisis de la expresión de estos genes en raíz de tomate bajo condiciones normales de cultivo en eFP (Figura 9) se destaca que, entre los tres genes seleccionados, *SIACO2* se expresa 2.35 veces más que *SIPHGPx* y *SIACO1/3* se expresan 3.78 y 0.54 veces menos respectivamente que el gen *SIPHGPx*; seleccionándose solo *SIACO2* para evaluar su expresión en plantas de tomate sometidas a estrés agudo osmótico y salino.

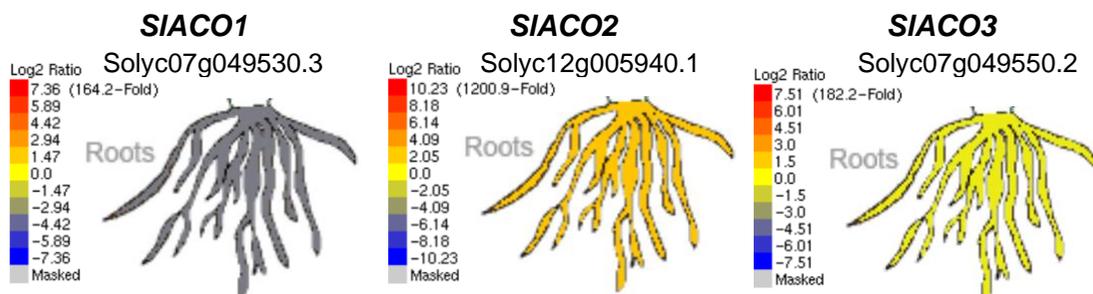


Figura 9.- Expresión *in silico* de genes ACC oxidasa en raíces de tomate. Representaciones graficas fluorescentes electrónicas (eFP) en raíz de tomate cultivados en condiciones normales. A la izquierda se observa en escala de colores la expresión relativa a *SIPHGPx* (glutatin peroxidasa), a la derecha la representacion grafica de una raíz de tomate y por encima de ambos el nombre de gen al que corresponde el conjunto y su código SGN.

3.1.3.-Análisis de expresión de genes ortólogos *OsDIS1* y *TaACO1*

Con el fin de poder evaluar la expresión de los genes seleccionados en los puntos anteriores se realizaron ensayos agudos de estrés osmótico y salino, PEG 6000 al 26,5% (estrés osmótico que simula sequía) y NaCl 250mM respectivamente, en un sistema hidropónico (sección 2.4.2.2) por un periodo de 24hrs en dos variedades de tomate –Poncho Negro y ACE –, tomando sus raíces como tejido de análisis por ser aquel que enfrenta en primera instancia estos estreses. Se extrajo ARN, se sintetizó el ADNc y se realizó qPCR según se indica en las secciones 2.5.2.1 y 2.5.3.

Las concentraciones de PEG 6000 y NaCl se eligieron en base al ensayo de Lan et al., 2020 donde estudiaron el efecto de estos osmolitos bajo condiciones isoosmóticas, que en el caso de existir diferencia en la respuesta entre ambas condiciones esta pueda atribuirse al componente iónico del estrés salino. Adicionalmente, se realizaron análisis en la variedad ACE (variedad de tomate comercial) con el fin de evaluar si la respuesta generada ante el estrés en cada una de las variedades afecta la expresión de los genes de manera específica para PN o es compartida con otra variedad de tomate.

Con el fin de disminuir el error en un experimento de comparación de ciclo umbral es necesario seleccionar un gen normalizador que se mantenga estable en las condiciones analizadas (“Applied Biosystems Real-Time PCR Systems Reagent Guide” 2010), por ello evaluamos mediante RT-qPCR tres genes normalizadores “*housekeeping*” descritos en la literatura – *SAct7*, *SIUBQ* y *SlaTUB* – (Coker & Davies, 2003) para seleccionar el mejor gen normalizador para el ensayo. La plataforma RefFinder (métodos sección 2.5.3.3) (Dudziak et al., 2020; Xie et al., 2012) permite evaluar la estabilidad de los genes mediante un ranking de la variabilidad de cada uno con sus valores de Ct en las condiciones estudiadas. Se realizó un análisis en RefFinder cuyo resumen indicó que en ambos genotipos (ACE y PN) el gen *SAct7* sería el más estable en las condiciones estudiadas (Figuras S3 y S4). Con lo anterior se normalizó cada experimento de qPCR con los datos de *SAct7* para determinar la expresión relativa de los genes *SIDIS1*, *SISINA5*, *SISINAT2* y *SIACO2* de acuerdo con el método Pfaffl (Pfaffl, 2001), obteniendo como resultado las veces de cambio de expresión a las 3, 6 y 24hrs en los tratamientos de estrés osmótico y salino (métodos sección 2.5.3.3) (Figuras 10 y 11).

En el ensayo de tomate ACE (Figura 10), se puede observar que *SIDIS1* es inducido bajo condiciones de salinidad 1.5 y 2 veces a las 3 y 24hrs, así también 2 veces en la condición PEG a las 24hrs. Para el caso de *SISINA5* muestra una disminución significativa de su expresión relativa a las 6hrs post tratamiento con NaCl y PEG; por su parte *SISINAT2*, se induce 2.5 y 2 veces a las 3 y 6hrs en tratamiento con PEG, pero no en condición de salinidad. Finalmente, *SIACO2* se induce de manera creciente y constante en salinidad, superando las 2 veces respecto al control a las 24hrs y 1.5 veces en tratamiento con PEG a las 3hrs postratamiento.

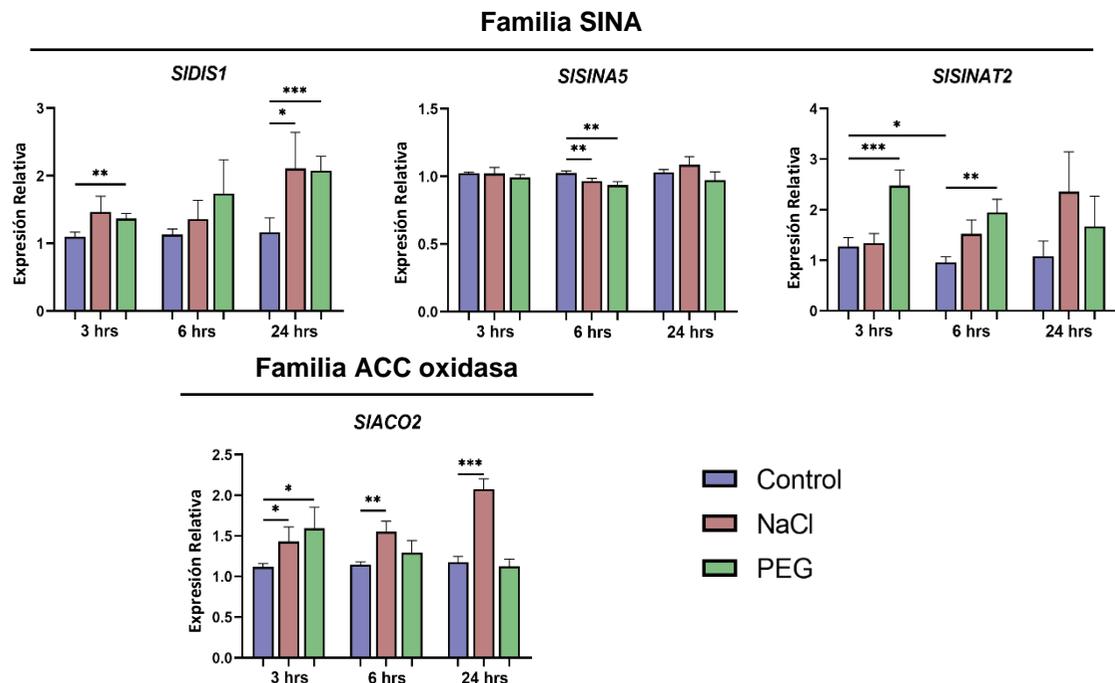


Figura 10.- Análisis de expresión genes de la familia SINA y ACC oxidasa en raíces de tomate var. ACE bajo condiciones de estrés osmótico y salino agudos. El ARN total fue extraído de mezcla de raíces de tres plantas de tomate var. ACE de 5 semanas de edad crecidas en solución hidropónica a las 0, 3, 6 y 24hrs y expuestas a un suplemento con polietilenglicol (PEG) 6000 al 26,5% por estrés osmótico y cloruro de sodio (NaCl) 250mM por estrés salino, manteniendo un grupo control en medio hidropónico. Se muestra la expresión relativa por RT-qPCR de genes de la familia *SINA* – *SIDIS1*, *SISINA5* y *SISINAT2* – y *ACC oxidasa* – *SIACO2* – a las 3, 6 y 24hrs de iniciado el tratamiento. Se calculó la expresión relativa utilizando el gen *SIAct4* como control endógeno y se calibró los valores a las 3, 6 y 24hrs con el promedio de las muestras tomadas a las 0hrs. Se realizó análisis estadístico por ANOVA de Brown-Forsythe y Welch y un post test de Dunnett * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p < 0.001$.

Por otro lado, en la variedad Poncho Negro el gen *SIDIS1* disminuye significativamente su expresión a las 3hrs de tratamiento con PEG y salinidad (Figura 11); la expresión de *SISINA5* aumenta a las 3hrs post tratamiento de salinidad, aunque en horas posteriores no se logra observar una inducción en las condiciones de estrés dado que los controles se inducen a 6 y 24hrs postratamiento. Por su parte, *SISINAT2* se induce 1.5 veces a las 3hrs en PEG y 1.3 a las 24hrs en NaCl; y *SIACO2* se induce en PEG 4 veces a las 3hrs, alcanzando las 6 veces a las 6hrs de tratamiento. Este gen no muestra una inducción en tratamiento con salinidad a ningún tiempo evaluado. Se destaca que los controles también muestran una inducción significativa de este gen en el tiempo.

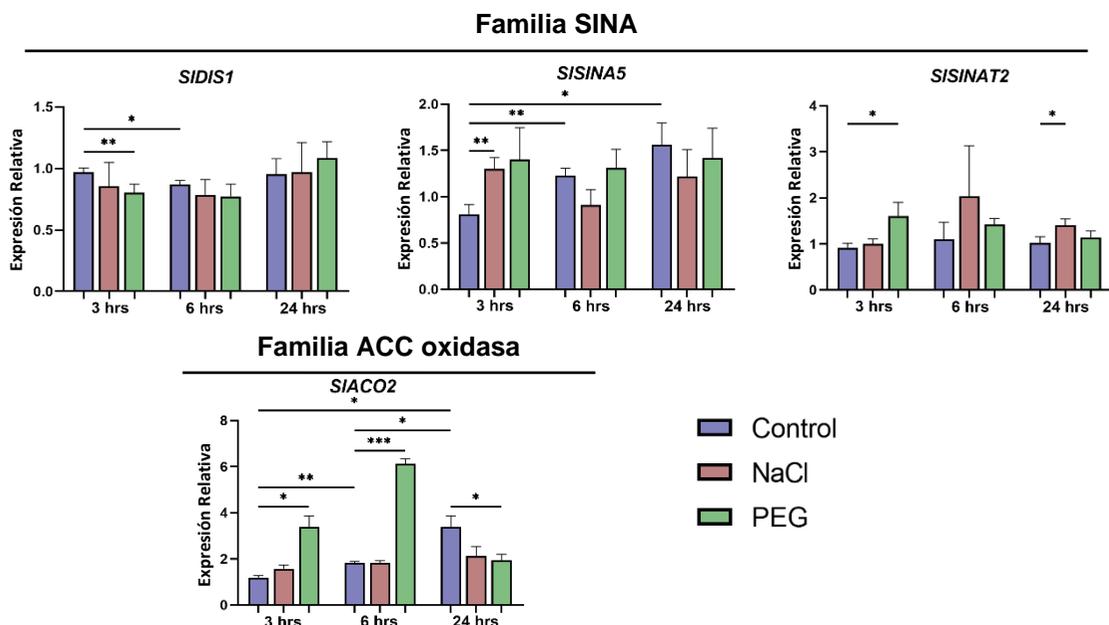


Figura 11.- Análisis de expresión genes de la familia SINA y ACC oxidasa en raíces de tomate var. Poncho Negro bajo condiciones de estrés osmótico y salino agudos. El ARN total fue extraído de mezcla de raíces de tres plantas de tomate var. Poncho Negro de 5 semanas de edad crecidas en solución hidropónica a las 0, 3, 6 y 24hrs y expuestas a un suplemento con polietilenglicol (PEG) 6000 al 26,5% por estrés osmótico y cloruro de sodio (NaCl) 250mM por estrés salino, manteniendo un grupo control en medio hidropónico. Se muestra la expresión relativa por RT-qPCR de genes de la familia SINA – *SIDIS1*, *SISINA5* y *SISINAT2* – y ACC oxidasa – *SIACO2* – a las 3, 6 y 24hrs de iniciado el tratamiento. Se calculó la expresión relativa utilizando el gen *SIAct4* como control endógeno y se calibró los valores a las 3, 6 y 24hrs con el promedio de las muestras tomadas a las 0hrs. Se realizó análisis estadístico por ANOVA de Brown-Forsythe y Welch y un post test de Dunnett * $p < 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p < 0.001$.

Llama la atención que la expresión de los genes es diferente en ambas variedades. Por un lado, *SIDIS1* es inducido sólo en la variedad de tomate ACE en ambas condiciones de estrés. *SISINAT2* se induce en ambos cultivares, no obstante, en ACE se induce significativamente sólo bajo estrés osmótico y en PN lo hace en ambos estreses, pero

en menor magnitud y no es persistente en el tiempo. Adicionalmente, *SISINA5* no responde a ninguno de los estreses estudiados en ambos cultivares de tomate. Por el otro lado, *SIACO2* se induce en ambos cultivares de tomate, solo que en ACE responde bajo ambos factores, marcando una mayor tendencia con estrés salino, y el PN sólo con estrés osmótico y en gran magnitud. Considerando que nuestro objetivo es transformar PN, y que el gen que presenta mayor expresión es *SIACO2*, decidimos generar vectores de edición para este gen para editar tomate Poncho Negro.

3.2.-Regeneración *in vitro* y transformación de tomate Poncho Negro

3.2.1.-Regeneración y propagación clonal

Para transformar una especie vegetal se debe contar con el protocolo de cultivo *in vitro* y propagación clonal. Debido a que no contábamos con el protocolo para PN, fue necesario estandarizarlo en esta tesis. A partir de la literatura disponible del tomate Poncho Negro no encontramos estudios para basar su regeneración *in vitro*, por ello fue necesario evaluar medios *in vitro* publicados para otras variedades de *Solanum lycopersicum* (Arias et al., 2021; Saeed et al., 2019; Titeli et al., 2021) los que fueron adaptados para PN, evaluando distintas concentraciones de sacarosa (sac) y hormonas reguladoras del crecimiento (HRC) en el medio nutritivo MS (Murashige & Skoog, 1962).

En un primer ensayo se evaluó la regeneración en explantes de hoja y tallo de tomate PN, en tres concentraciones de sac 10-, 20- y 30g/L (equivalente a 1-, 2- y 3% P/V) y dos combinaciones de HRC: BAP 2mg/L más IBA 0.1mg/L (en adelante BAP+IBA) y ZEA 2mg/L más IBA 0.1mg/L (ZEA+IBA) (Tablas 1 y 2), donde BAP y ZEA son citoquininas e IBA una auxina. Se registró la sobrevida, inducción de callos y brotes al primer y segundo mes respectivamente (Figuras 12 y 13 y Tablas S2, S3, S4 y S5) comparando con el medio control MS (Medio Basal, MB) sin HRC.

En el ensayo con explantes de hoja, al primer mes se puede observar inducción de callos en los tratamientos con HRC al 1% y 3% sac, siendo aquel con mayor rendimiento ZEA+IBA a 1% sac, alcanzando un 83% de inducción de callos (Figura 12A y Tabla S2), manteniendo el 100% de sobrevida (Figura 12B y Tabla S2). Luego, al segundo mes se observó inducción de brotes en ZEA+IBA al 1% y 3% sac y BAP+IBA al 1% sac, siendo

la primera combinación de HRC la que más indujo la formación de brotes, alcanzando 20% en el tratamiento con 1% y 3% sac (Figura 12C y Tabla S3). Al determinar el porcentaje de sobrevivida, aquellos explantes en BAP+IBA presentan 70% en 1% sac, y 40% en 2% y 3% sac, mientras que ZEA+IBA presenta un porcentaje inferior al 15% en las tres condiciones de sacarosa (Figura 12D y Tabla S3). Cabe destacar que a lo largo del experimento los explantes cultivados en los medios con mayor concentración de sacarosa (2% y 3%) mostraban signos de senescencia reflejado en su coloración amarilla (Tablas S2 y S3). Adicionalmente, al menos el 50% de los explantes murieron en cada una de las condiciones de este ensayo, a excepción de BAP+IBA al 1% sac. Ningún control (MB) mostró señales de respuesta al cultivo y al finalizar el análisis no permanecieron vivos. Ya que lo más relevante es obtener callos y brotes, la combinación ZEA+IBA sac 1% es la más apropiada al usar hojas como explantes, aunque es necesario ajustar las condiciones de cultivo para evitar la muerte del tejido.

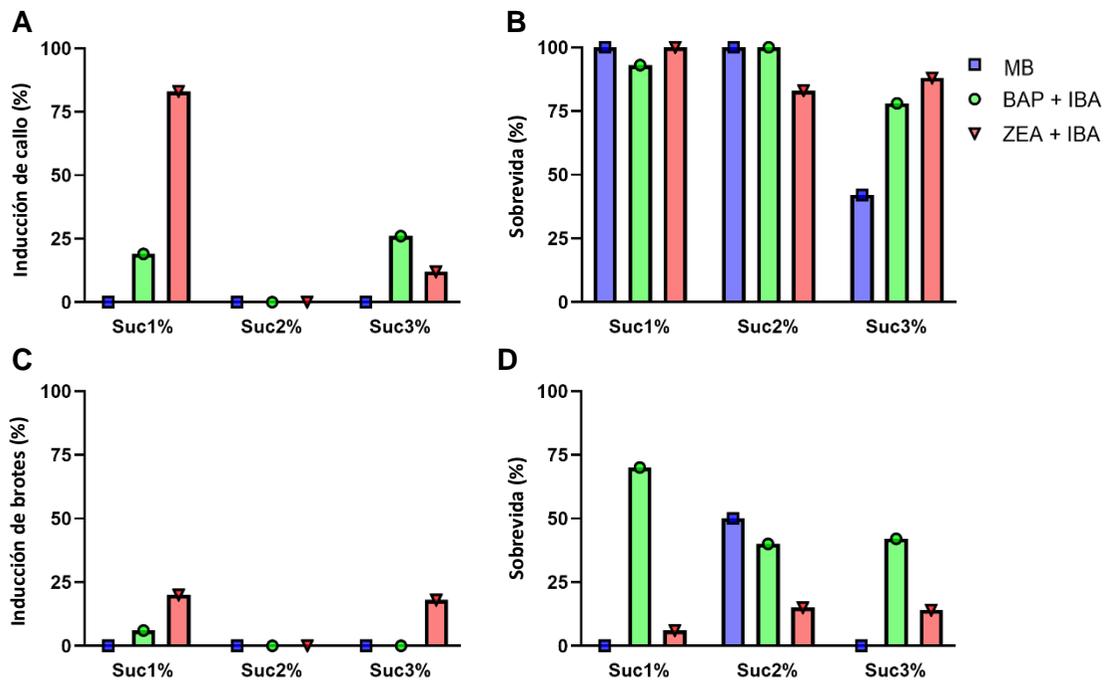


Figura 12.- Efecto del suplemento de sacarosa y hormonas reguladoras del crecimiento en la regeneración *in vitro* de tomate PN a partir de hojas. (A) Porcentaje de explantes con inducción de callo a partir de hojas de tomate Poncho Negro a 1 mes de iniciado el tratamiento. (B) Porcentaje de sobrevivida de explantes de hoja a 1 mes de iniciado el tratamiento. (C) Porcentaje de explantes con inducción de brotes a 2 meses de tratamiento. (D) Porcentaje de sobrevivida de explantes a 2 meses de tratamiento. MB, medio basal MS; BAP + IBA, medio basal suplementado con BAP 2mg/L e IBA 0.1mg/L; ZEA + IBA, medio basal suplementado con ZEA 2mg/L e IBA 0.1mg/L

Por otro lado, al usar tallos como explantes al cabo del primer mes se puede observar inducción de callos en 5 de los 6 tratamientos, siendo aquel con mayor rendimiento BAP+IBA a 1% sac, alcanzando un 66%, seguido por ZEA+IBA a la misma concentración de sacarosa con un 50% (Figura 13A y Tabla S4); luego, al segundo mes se pudo observar inducción de brotes en el tratamiento con BAP+IBA, donde se obtuvo un 25% y 23% en medio a 1% y 2% sac, y ZEA+IBA a 1% sac, alcanzando un 18% (Figura 13C y Tabla S5). Cabe destacar que el suplemento con ZEA+IBA afectó la sobrevivencia de los explantes desde el primer mes, observando la muerte de cerca del 50% del tejido al primer mes y el 90% al segundo (Figuras 13B y 12D y Tablas S4 y S5). Ningún control (MB) demostró respuesta al cultivo y al segundo mes de análisis solo en la condición al 2% de sacarosa cerca de la mitad de los explantes seguía vivo. Considerando estos resultados, al usar tallo como explante la mejor combinación sería BAP+IBA sac 1%.

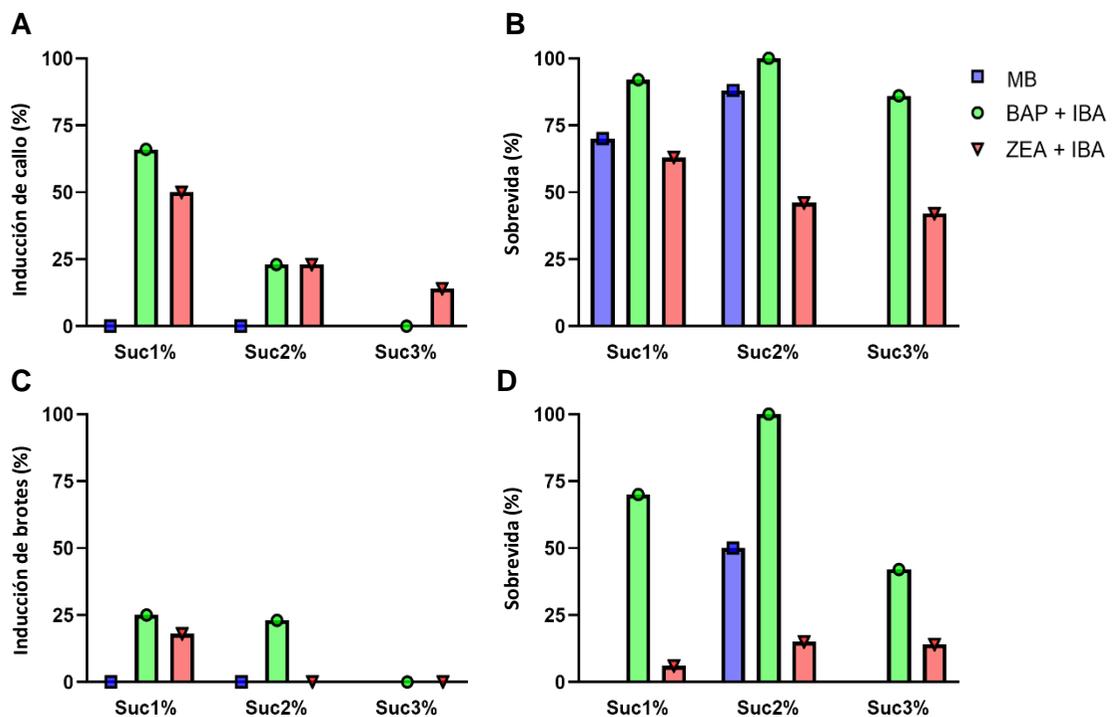


Figura 13.- Efecto del suplemento de sacarosa y hormonas reguladoras del crecimiento en la regeneración *in vitro* de tomate PN a partir de tallo. (A) Porcentaje de explantes con inducción de callo a partir de tallos de tomate Poncho Negro a 1 mes de iniciado el tratamiento. (B) Porcentaje de sobrevivencia de explantes de tallo a 1 mes de iniciado el tratamiento. (C) Porcentaje de explantes con inducción de brotes a 2 meses de tratamiento. (D) Porcentaje de sobrevivencia de explantes a 2 meses de tratamiento. MB, medio basal MS; BAP + IBA, medio basal suplementado con BAP 2mg/L e IBA 0.1mg/L; ZEA + IBA, medio basal suplementado con ZEA 2mg/L e IBA 0.1mg/L

Debido a que en la literatura se menciona mayor plasticidad para regeneración *in vitro* de tomate a partir de cotiledón e hipocótilo (Titeli et al., 2021), es que con los resultados anteriores se decidió repetir la experiencia con estos tejidos del tomate PN. Considerando los resultados previos, se utilizó un suplemento de sacarosa al 1% en medio MS y se evaluó el efecto que tiene las combinaciones de BAP+IBA en ambos tejidos y ZEA+IBA solo en cotiledones en mismas concentraciones que el ensayo anterior (Tablas 1 y 2). En este ensayo no se consideraron controles sin hormonas debido a la baja disponibilidad de material vegetal en el laboratorio en el momento de la realización del ensayo, y que los explantes de hoja y tallo en dicha condición no sobreviven a los 2 meses de ensayo como se pudo ver en las Figuras 12D y 13D. En el caso de los cotiledones (Tablas 7 y 8) no se observan diferencias significativas entre ambas combinaciones de hormonas en la inducción de callo y sobrevida al primer mes; no obstante, al revisar los resultados al segundo mes se observa que el tejido cultivado con BAP+IBA presenta un 21% de inducción de brotes, con un brote por explante en promedio, y del total de explantes (n=24) sobrevivió el 58%, mientras que aquellos cultivados en ZEA+IBA un 78% presenta brotes, incluso más de uno por explante, y sobrevive el total de explantes (n=23). Respecto al cultivo de hipocótilo (Tablas 7 y 8), al primer mes se puede observar respuesta al cultivo con HRC con el engrosamiento del tejido, no obstante, solo el 50% presenta callo, manteniendo una sobrevida del 100% de los explantes (n=26); luego al segundo mes, solo un explante (4%) presenta un brote incipiente, manteniendo un 38% de sobrevida. Se destaca de esta experiencia la regeneración de PN a partir de explantes de cotiledón con suplemento ZEA+IBA como mejor estrategia para llevar adelante la regeneración por organogénesis en tomate PN, debido a su alta tasa de inducción de callo (100%) y brotes (78%) y sobrevida (100%), efecto que no se pudo observar de la misma magnitud bajo el efecto de la combinación BAP+IBA. Adicionalmente, se descarta la regeneración a partir de hipocótilo, al menos bajo las condiciones analizadas, debido a su baja respuesta al tratamiento.

Tabla 7 Ensayo de regeneración in vitro de tomate Poncho Negro por organogénesis somática a partir de cotiledón e hipocótilo. Se muestran fotografías representativas de los explantes de cotiledón e hipocótilo al primer y segundo mes de cultivo en las distintas combinaciones de fitohormonas (BAP/IBA y ZEA/IBA). El medio basal utilizado para este ensayo está compuesto por medio MS 1x (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 1% de sacarosa.

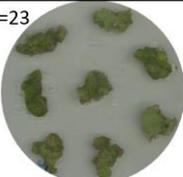
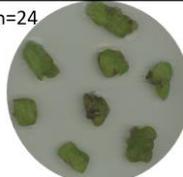
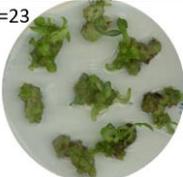
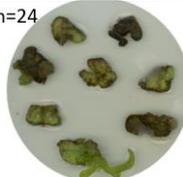
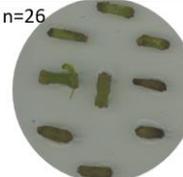
		Cotiledón		Hipocótilo
Tratamiento Hormonal	Tiempo	ZEA 2mg/L IBA 0.1mg/L	BAP 2mg/L IBA 0.1mg/L	BAP 2mg/L IBA 0.1mg/L
		1 Mes	n=23 	n=24 
2 Meses	n=23 	n=24 	n=26 	

Tabla 8.- Efecto del suplemento de sacarosa y hormonas en la regeneración in vitro de tomate PN a partir de cotiledón e hipocótilo

Tejido	Tratamiento Hormonal	Número de explantes	Inducción de callo (1 mes) (%)	Sobrevida (1 mes) (%)	Inducción de brotes (2 meses) (%)	Sobrevida (2 meses) (%)
Cotiledon	BAP+IBA	24	100	100	21	58
	ZEA+IBA	23	100	100	78	100
Hypocotilo	BAP + IBA	26	50	100	4	38

3.2.2.-Transformación de tomate Poncho Negro

Con los resultados anteriormente señalados se decidió transformar cotiledones de tomate PN debido a su alta respuesta a la organogénesis somática bajo las fitohormonas ZEA a 2mg/L e IBA a 0.1mg/L cultivados en medio MS 1x y suplemento de sacarosa al 1%. Se transformó un total de 155 explantes de cotiledón con el vector pGGK7:AtCas9:2xARNg/SIACO2, el cual porta el gen que codifica para la proteína Cas9 y dos ARNg diseñados para realizar una delección de 2593pb del gen *SIACO2* (método 2.5.1) (Figuras 2 y 3). Los explantes se transformaron de acuerdo con lo descrito en el método 2.4.3.3 y se cultivaron hasta las 8 semanas post transformación, obteniendo un callo incipiente o bien cotiledones que han comenzado a engrosar, sin desarrollo de

brotos (Figuras 14A y 14B). Para determinar la efectividad del proceso de edición, se tomaron seis callos de dos meses post transformación, se extrajo ADN (sección 3.2.2) y se realizó PCR de punto final para amplificar el gen *SIACO2* (sección 2.5.3.2), esperando obtener fragmentos de PCR de 2843pb (versión silvestre) o de menor tamaño producto de la mutación por uno de los ARNg o de 250pb que corresponde a la condición en que ambos ARNg fueron efectivos en la edición (Figura 3). En el gel de agarosa resuelto con el producto de PCR se obtuvo una banda de aproximadamente 2800pb en las 6 muestras transformantes y en el control silvestre (WT); no obstante, no se logró apreciar la banda esperada de 250pb ni intermedias en ninguna de las muestras transformantes (Figura 14C).

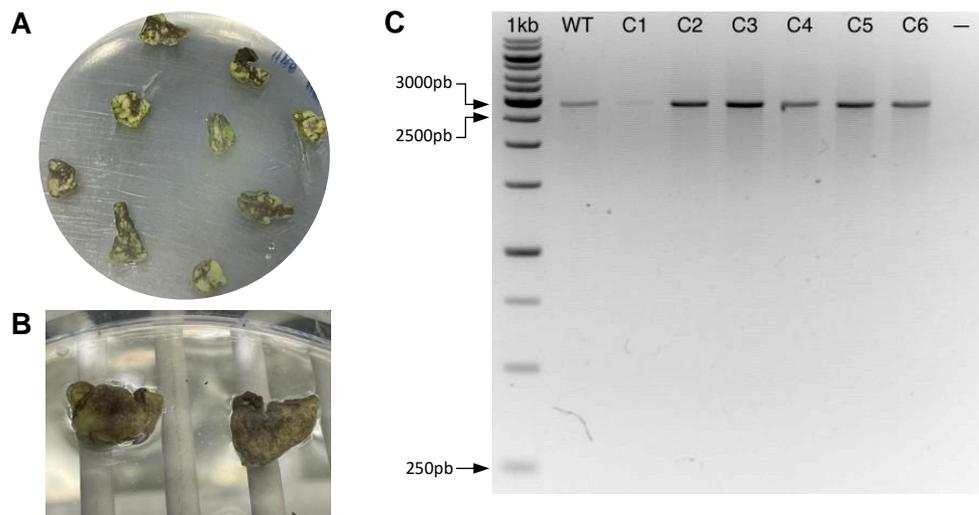


Figura 14.- Regeneración y PCR de punto final de explantes de cotiledón de tomate PN transformados con pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2. (A) Explantes de cotiledón 2 semanas post transformación con cepa *A. tumefaciens* pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2. (B) Explantes 2 meses post transformación. (C) PCR de punto final del gen *SIACO2* para validación de edición por CRISPR/Cas-9. De izquierda a derecha 1Kb: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder; WT: Control del producto silvestre obtenido a partir de muestras sin transformar; C1-6: Muestras de callo transformantes para el vector pGGK7:AtCas9:2xARNgSIACO2; -: control negativo para la reacción de PCR (reacción sin ADN, solo agua).

4.-Discusión

4.1.-Selección de genes y análisis bioinformático

Múltiples son las vías de señalización que se activan en las plantas bajo estímulos de estrés, por ello es importante identificar genes clave que regulen estas respuestas para elaborar una estrategia y otorgar mayor tolerancia ante estos estímulos (Benny et al., 2019; Zafar et al., 2020). Muchos genes han sido vinculados a las vías de regulación de la respuesta generada por el estrés frente a sequía o salinidad, y en este estudio se identificaron 54 genes (Tabla S1) descritos en diversos modelos de estudio. Por ello, resulta clave evaluar en primera instancia si existe literatura que indique si otorgan tolerancia o susceptibilidad, su inducción de expresión bajo estrés y finalmente si se encuentran codificados en nuestro modelo de estudio, que en este caso es el genoma de referencia de tomate. En Zafar et al. 2020 se describen dos grandes categorías de genes según su función que podrían ser objetivo para desarrollar cultivos más tolerantes a estrés abiótico: aquellos que cumplen una función estructural y otros regulatorios. La primera hace referencia a aquellos genes que participan en determinados procesos que afectan a la tolerancia al estrés abiótico, tales como el metabolismo de especies reactivas de oxígeno (ROS) , el balance hormonal de la planta y aquellos involucrados en la degradación de proteínas relacionadas a los procesos de tolerancia a estrés; por otro lado, los genes regulatorios hace referencia a aquellos que codifican a factores de transcripción, fosfatasas, quinasas y miARN, los cuales regulan la expresión de muchos genes río abajo y activan múltiples vías de estrés (Zafar et al., 2020). En base a lo anterior, en esta tesis se puso particular atención en aquellos genes con función estructural cuya inducción produjese susceptibilidad en las plantas; considerando que de generarse el *knockout* de un gen regulatorio, como un factor de transcripción, el riesgo de efectos pleiotrópicos indeseados en el proceso de desarrollo sería mayor que el de un gen estructural por la magnitud de procesos involucrados en cada uno de ellos.

Entre el grupo de genes mencionado, logramos identificar 5 genes reguladores negativos a estrés por sequía o salinidad que tuviesen un rol estructural en la planta, y que además se inducen en condiciones estrés (Tabla 6). Tres de ellos poseen actividad E3 ubiquitina ligasa, por lo que están involucrados en la señalización de degradación de

proteínas que otorguen tolerancia a la planta bajo estrés abiótico; y, dos de ellos forman parte de la ruta de biosíntesis del etileno, hormona gaseosa vinculada a la susceptibilidad ante estrés abiótico en plantas (Khan et al., 2017). En esta tesis se describió el rol de los genes *OsDIS1* (Ning et al., 2011a; Chen et al., 2011b; Zafar et al., 2020) y *TaACO1* (Benny et al., 2019; Chen et al., 2014), y sus estudios relacionados de sobreexpresión y/o silenciamiento/*knockout* de estos genes (Figuras 4 y 7) nos permitió seleccionarlos para identificar sus ortólogos en el genoma de referencia de tomate (*Solanum lycopersicum*), encontrando 8 del gen *OsDIS1* y 7 de *TaACO1*.

Entre los 8 ortólogos de *OsDIS1*, una de las proteínas codificadas en tomate está anotada como *SIDIS1*, la cual agrupa en un mismo clado con *OsDIS1* (Figura 5), siendo antecedente suficiente para su selección y análisis. Cabe destacar que hay un grupo de 5 proteínas – *SISINA1/2/3/4/6* – que agrupan dentro de un clado distinto y a un nivel superior a *OsDIS1*, los que además presentan distancias filogenéticas acotadas entre sí. Los 2 miembros restantes – *SISINA5* y *SISINAT2* – no agrupan con otras proteínas y se encuentran en niveles inferiores a *OsDIS1*. Al analizar un alineamiento múltiple de las 3 proteínas con mayor homología (*SIDIS1*, *SISINA3* y *SINA4*) y aquellas que están hacia la base del árbol filogenético (*SISINA5* y *SISINAT2*), podemos observar que los 5 miembros conservan los residuos que otorgan las funciones de unión de Zinc en los dominios *RING* y *SINA*, y de unión de sustrato en este último; no obstante, observamos alta variabilidad en los residuos responsables de la interacción proteína-proteína, denominada interfaz de dímero, cuya variabilidad podría responder a especificidad a ciertas familias de cofactores que podrían participar en el proceso de ubiquitinación y proteínas blanco que podrían ubiquitinar cada una de estas proteínas (Polekhina et al., 2002). En ese sentido, en base a lo observado en el árbol filogenético y al número de residuos aminoacídicos conservados en la interfaz de dímero se optó por estudiar las proteínas *SISINA5/T2* como posibles RN. Adicionalmente, diversos estudios vinculan a los genes de la familia *SINA* al desarrollo y respuesta frente a estrés abiótico en plantas (Zhang et al., 2019), motivo adicional por el cual se extiende la búsqueda más allá del ortólogo *SIDIS1* con el fin de caracterizar su comportamiento bajo estrés osmótico y salino.

Por otro lado, entre los 7 ortólogos de *TaACO1* pudimos observar un comportamiento similar al descrito en Houben y Van de Poel 2019, donde elaboran un árbol filogenético con las secuencias aminoacídicas de ACC oxidasas de distintas especies y describen 3 tipos, donde SIACO1/2/3/4/6 pertenecen aquellas de Tipo I, SIACO5 al Tipo II y SIACO7 al Tipo III. En este estudio también observamos que SIACO1/2/3/4/6 agrupan dentro de un mismo clado, mientras que SIACO5 y SIACO7 están de manera independiente, concluyendo que se repite el patrón descrito previamente. Cabe destacar que en el clado formado por 5 proteínas hay dos grupos, uno compuesto por SIACO1/2/3 y otro por SIACO4/6. Dentro de este árbol filogenético, *TaACO1* se encuentra formando un clado con SIACO7, aunque presentan grandes distancias filogenéticas entre sí. A pesar de lo anterior, decidimos no estudiar *SIACO7* debido a que en el estudio llevado a cabo por Chen et al. 2014 describen que *TaACO1* no se induce bajo salinidad, incluso disminuye su expresión frente a estrés, por lo que nuestra hipótesis lleva a que puede presentar un comportamiento similar. No obstante, a partir de los datos publicados en Benny et al. 2019 encontramos que *SIACO2* se induce bajo sequía y *SIACO4* se reprime, por dicho antecedente es que se seleccionó *SIACO2* para ser analizada en PN junto a *SIACO1/3* por agrupar con este gen, hipotetizando que los miembros de este subgrupo se inducirían bajo las mismas condiciones. Al revisar el alineamiento múltiple de las proteínas codificadas por estos 3 genes más *TaACO1* y *SIACO7* (Figura S2), podemos confirmar que SIACO1/2/3 corresponden a ACC oxidasas del tipo I, mientras que SIACO7 y *TaACO1* del tipo III, destacando que esta última no había sido catalogada previamente (Houben & Van de Poel, 2019). Teniendo como referencia *SIACO2* observamos que SIACO7 y *TaACO1* no conservan el residuo que permite la glutationilación (C60), modificación postraduccional que podría modular la actividad o estabilidad de la enzima volviéndola insensible a esta (Houben & Van de Poel, 2019). Así también, hay varios residuos importantes para la actividad enzimática que no se encuentran conservadas en estas proteínas. No obstante, las 5 proteínas son funcionales para la síntesis de etileno, y sería la abundancia de esta hormona responsable de la regulación negativa a estrés salino (Chen et al., 2014), por lo que validar la inducción de uno de estos genes es suficiente para otorgar el rol como RN.

En el análisis de expresión relativa de los 6 genes seleccionados – *SIDIS1*, *SISINA5/T2*, *SIACO1/2/3* – en condiciones normales de cultivo de tomate mediante eFP Browser, encontramos que sólo *SIDIS1*, *SISINAT2* y *SIACO2* poseen un nivel expresión basal elevado en raíces de tomate (Figuras 7 y 9), lo que podría revelar que estos genes cumplen un rol en el desarrollo de este tejido. Por otro lado, no sería ese el caso con los genes *SIACO1/3* que presentan un nivel de expresión inferior en raíz (-3.78 y -0.54 veces) (Figura 9), y que pareciese ser que su función está orientado a la maduración del fruto del tomate, donde sí presentan valores positivos (información no presentada), por lo que se decidió no persistir con el estudio de estos genes. Situación similar sucedió con *SISINA5*, no obstante, su expresión similar al normalizador (-0.08 veces) (Figura 6) indica que algún grado de participación posee en el desarrollo radicular. Por lo anterior, se continuó analizando la expresión de los genes *SIDIS1*, *SISINA5/T2* y *SIACO2* en condiciones agudas de estrés osmótico y salino.

4.2.-Ensayo de estrés osmótico y salino

El análisis de expresión de los genes *SIDIS1*, *SISINA5*, *SISINAT2* y *SIACO2* bajo condiciones agudas de estrés salino y osmótico nos da luces, en primera instancia, que las variedades PN y ACE responden de distinta forma con cada uno de estos genes respecto al tipo de estrés (Figuras 10 y 11). La diferencia en nivel y patrón de expresión de los genes evaluados podría señalar que la participación de ellos en el mecanismo de respuesta a estrés salino e hídrico puede ser algo propio de cada variedad de tomate (Huanca-Mamani et al., 2018). En relación a esto, un punto a destacar fue la escasa respuesta del PN al estrés salino en los genes estudiados, sólo se indujo *SISINAT2*, lo cual podría deberse a la presión dada por las condiciones de cultivo en el valle de Lluta que hayan generado mecanismos de tolerancia a salinidad, no presentes en los cultivares comerciales y que evitan la activación de los genes RN estudiados (Bastías et al., 2020; Huanca-Mamani et al., 2018). También llama la atención que todos los genes, salvo *SISINA5*, se inducen preferentemente bajo estrés osmótico que salino. Entre ellos, *SISINAT2* y *SIACO2* se expresan en ambas variedades en estrés osmótico y cada uno de ellos en salinidad en PN o ACE, indicando que estos podrían cumplir un rol en la regulación de la respuesta frente a estos estreses.

Considerando que *SIACO2* se induce en mayor magnitud en PN que los otros genes estudiados y que la síntesis de etileno cumpliría un rol negativo en la respuesta frente a estrés abiótico, podríamos considerar que la edición del gen *SIACO2* en tomate PN permitiría aumentar el umbral de tolerancia a sequía de esta variedad (Chen et al. 2014; Zafar et al. 2020), estableciendo así una estrategia para generar un *knockout* de este gen (Figura 3) con el vector binario pGGK7:AtCas9:2xARNg*SIACO2* descrito en el punto 2.5.1

4.3.-Transformación y regeneración *in vitro* de tomate Poncho Negro

Con el fin de llevar adelante con éxito la edición del tomate PN, fue necesario evaluar distintas estrategias de regeneración *in vitro* del tomate mediante organogénesis somática. En un comienzo, por disponibilidad de material vegetal y por experiencias previas (Colomer, 2017), se decidió evaluar la regeneración *in vitro* usando hojas y tallos de tomate PN como explantes. Evaluamos el efecto de la concentración de sacarosa (1%, 2% y 3% p/V) y dos combinaciones hormonales (BAP + IBA y ZEA + IBA) (Figuras 12 y 13 y Tablas S2, S3, S4 y S5) basándonos en protocolos desarrollados para otras variedades de tomate (Arias et al., 2021; Saeed et al., 2019; Titeli et al., 2021).

Lo primero que nos sorprendió de este ensayo fue el efecto negativo en la regeneración de los explantes de PN bajo una concentración creciente de sacarosa, lo que difiere significativamente a la experiencia de nuestro grupo en la regeneración de tomate microtom (Arias, 2016), el cual se lleva a cabo al 3%. Cabe destacar que, este resultado fue clave para ajustar el protocolo de propagación clonal *in vitro* del tomate PN, donde las plantas que cultivábamos al 3% de sac desarrollaban de manera explosiva raíces por sobre el medio de cultivo, fenotipo que desapareció en su totalidad al disminuir su concentración (información sin mostrar). En segundo lugar, es necesario destacar la importancia del desarrollo de la técnica de cultivo *in vitro* previo al desarrollo de ensayos de larga duración y alto volumen, dado que por la falta de experiencia se perdió gran parte de los explantes del ensayo llevado a cabo en hoja bajo la condición de ZEA+IBA sac 1%; no obstante, los resultados cualitativos previos a la pérdida permitieron continuar con los análisis de dicha combinación hormonal en cotiledones. En tercer lugar, nuestra experiencia previa en los experimentos de regeneración en tomate nos

indicaba que es posible llevar adelante la regeneración con un refresco de medio cada 1 mes, no obstante, al aplicar esto en PN (hoja y tallo) observamos que el tejido no se sostenía a los dos meses. Pino et al., 2010 señala que durante el cultivo del tejido realizó subcultivos cada 10 días, por lo que basándonos en la experiencia adquirida en nuestro primer ensayo de regeneración y lo descrito en literatura se decidió acelerar el refresco de los medios de cultivo a cada 2 semanas para el segundo ensayo llevado a cabo en cotiledón e hipocótilo, observando mayor sobrevivencia de los explantes y respuesta de los cotiledones al cultivo (Figuras 12D y 13D y Tablas 7 y 8).

En relación con los resultados desprendidos de la organogénesis a partir de tallo, es interesante evidenciar las diferencias en base a los distintos tratamientos hormonales, donde BAP+IBA impulsó un mecanismo indirecto, es decir, vía la formación de callo; mientras que ZEA+IBA lo hizo de forma directa, induciendo la formación de brotes, desde el primer mes de cultivo (Figura S4). Esto es importante para definir la estrategia que se quiere llevar a cabo en la transformación, dado que la vía directa permite obtener brotes en menor tiempo, mientras que la indirecta requiere más tiempo, pero con la ventaja de propagar mediante la división del callo en el proceso. Adicionalmente, para la regeneración a partir de tallo es necesario tener especial cuidado en la selección del tejido, debido a que en el ensayo realizado con ZEA+IBA 1% sac se cultivó un explante que conservaba un meristema axilar (Figura S5), motivo por el que se indujo el desarrollo de un brote con mayor facilidad al activarse las células meristemáticas por acción del suplemento hormonal, pudiendo confundirse esto con una organogénesis directa. Cabe destacar que miembros de nuestro grupo intentaron transformar explantes de tallo de PN para la edición de otros genes con diversos protocolos basados en *A. tumefaciens* sin lograr una transformación exitosa (información sin mostrar), desprendiendo la hipótesis que este tejido sería recalcitrante a la transformación, motivo por el cual se desistió a la transformación de tallo en esta tesis. A pesar de lo anterior y en consideración a la respuesta observada a la regeneración en tallo, se decidió evaluar la regeneración en hipocótilo y el tratamiento con BAP+IBA, con la hipótesis de desarrollar un mecanismo indirecto, no obstante, los resultados obtenidos no fueron lo esperado dado por la escasa respuesta a la regeneración (Tablas 7 y 8), descartando también esta alternativa de regeneración.

Por otro lado, la organogénesis a partir de hoja fue lograda por un mecanismo indirecto en ambas combinaciones hormonales, presentando aparentemente una mayor respuesta al tratamiento de ZEA+IBA por la alta tasa de desarrollo de callo obtenida (Figura 12A), no obstante, el bajo número de explantes analizados (n=6) y la baja sobrevivencia al segundo mes no permite obtener conclusiones significativas de este ensayo. Por otro lado, el tratamiento BAP+IBA nos presenta tejido con mayor sobrevivencia a lo largo del tratamiento, pero baja respuesta de regeneración, lo que de igual forma no responde a las exigencias de un trabajo de mejoramiento genético vegetal, debido a que el periodo analizado ya es extenso y se desconoce cuánto tiempo más sería necesario para el desarrollo de órganos en caso de que su respuesta fuese más lenta al tratamiento hormonal. A pesar de todo lo expuesto, esta experiencia se repitió en cotiledones, modificando la frecuencia de refresco del medio (cada 1 mes a 2 semanas), logrando un alto nivel de respuesta a la callogénesis y formación de brotes en el tratamiento por ZEA+IBA (Tablas 7 y 8), obteniendo inclusive callos con más de un brote; mientras que BAP+IBA desarrolló una baja respuesta a la formación de callo y los brotes obtenidos no superaban la unidad por callo, a eso sumado una menor tasa de sobrevivencia en el cultivo.

En general, nuestra experiencia en la regeneración por organogénesis somática de tomate PN nos lleva a considerar que el tejido foliar (hojas y cotiledones) es más lábil a generar respuesta bajo la influencia de la citoquinina Zeatina; mientras que el tallo responde a ambas citoquininas utilizadas, solo que el mecanismo -si es directo o indirecto- difiere según la hormona. Finalmente, si omitimos la diferencia en la frecuencia de refresco del medio de cultivo aplicado entre los ensayos realizados con hoja/tallo y cotiledón/hipocótilo, la regeneración por organogénesis de tomate PN se podría resumir de la siguiente manera:

$\text{cotiledón}_{\text{ZEA/IBA}} > \text{cotiledón}_{\text{BAP/IBA}} \geq \text{tallo}_{\text{BAP/IBA}} \geq \text{tallo}_{\text{ZEA/IBA}} > \text{hoja}_{\text{ZEA/IBA}} > \text{hoja}_{\text{BAP/IBA}} > \text{hipocotilo}_{\text{BAP/IBA}}$

Siendo cotiledón el mejor tejido para llevar adelante una estrategia de regeneración por organogénesis bajo el tratamiento ZEA+IBA, e hipocótilo bajo BAP+IBA el peor.

En consideración a lo anterior, se transformaron cotiledones con el vector pGGK7:AtCas9:2xARNgS/ACO2 de acuerdo con lo descrito en el punto 2.4.3.3. Transcurrido 6 semanas se obtuvieron explantes que presentaban los primeros signos de respuesta al tratamiento hormonal, es decir mayor grosor y densidad. Lo anterior no fue sorpresa para nuestro grupo debido a que el uso de antibióticos afecta la capacidad de regeneración del tejido vegetal (Gerszberg & Grzegorzczk-Karolak, 2019). Debido a la imposibilidad de extender en tiempo el cultivo del tejido transformante se procesaron 6 muestras, extrayendo su ADN y realizando PCR para amplificar el gen S/ACO2 (Método 2.5.3.2), logrando amplificar una sola banda de 2800pb aproximadamente, al igual que el control silvestre (Figura 14). La ausencia de la banda de 250pb esperada indica que la estrategia de generar la delección de 2593pb en el gen S/ACO2 no fue efectiva en los explantes transformantes analizados, esto posiblemente puede ser a la baja probabilidad de ocurrir la reparación uniendo extremos distantes entre sí (Doll et al., 2019); y, debido a que la técnica no es lo suficientemente sensible para diferenciar cambios del rango de 10pb no fue posible detectar mutaciones del tipo INDELS. Considerando que es más probable generar este tipo de mutaciones se podría evaluar la función de los ARNg mediante un ensayo de detección de regiones sin aparear (mismatch), la búsqueda de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o secuenciación. La primera de ellas se realiza con la enzima de restricción T7E1 que reconoce las deformidades en la doble hebra de ADN, por lo que productos de PCR donde hubiese una mezcla del gen silvestre y mutante se generarían *mismatches* en la doble hebra de ADN, siendo reconocidas por T7E1, generando una mezcla de fragmentos de distinto tamaño (Vouillot et al., 2015). Por otro lado, se podría realizar la búsqueda de sitios para enzimas de restricción cercanas a los sitios de corte de los ARNg y realizar análisis de digestión enzimática, que al generarse una modificación del tipo INDELS produciría la pérdida del motivo y así la tolerancia a la enzima de restricción (Etaware, 2021). Por último, la secuenciación permitirá identificar la región del gen que fue afectada a edición y también el tipo de modificación que sufrió, pudiendo proyectar como se podría alterar la traducción de la proteína.

En conjunto estos resultados no permiten validar la hipótesis de esta tesis debido a que las técnicas disponibles para determinar la edición del gen no eran lo suficientemente sensibles para evaluar mutaciones puntuales del tipo INDELS, dependiendo finalmente de la deleción de 2593pb, evento que sucede con una baja probabilidad de éxito. A esto se suma que, para aumentar la probabilidad de amplificar una secuencia modificada es necesario enriquecer el tejido transformado, es decir, regenerar una planta completa, lo que no se pudo lograr en este trabajo donde, por falta de tiempo, se evaluó la edición en un callo incipiente obtenido a los dos meses post transformación. Para poder tener una línea regenerada es necesario disponer de al menos 6 meses para su regeneración y propagación, y los análisis moleculares un mes adicional; por lo que se requería de al menos 5 meses más para mejorar los resultados expuestos. Adicional a esto, es necesario caracterizar las eventuales líneas regeneradas para evaluar el efecto del *knockout* del gen *SIACO2* sobre la tolerancia a sequía y salinidad

5.-Conclusiones

- Se identificaron y seleccionaron los ortólogos *SIDIS1*, *SISINAT2*, *SISINA5* y *SIACO2* en tomate de dos genes reguladores negativos descritos en la literatura – *OsDIS1* y *TaACO1*.
- Considerando la expresión de *SIDIS1*, *SISINAT2*, *SISINA5* y *SIACO2* bajo condiciones agudas de estrés osmótico y salino en raíces de tomate PN y ACE, muestra que ambos genotipos responden de manera diferencial al estrés.
- Dado que solo *SIACO2* se induce de manera significativa y en más de un tiempo de estudio bajo estrés osmótico en PN, se seleccionó para desarrollar una estrategia para su edición en PN.
- La estandarización de la regeneración por organogénesis somática de PN, permite seleccionar el medio MS 1x suplementado con 1% de sacarosa, requiriendo el refresco de medio cada dos semanas; y el uso de cotiledones cultivados con un suplemento hormonal de ZEA 2 mg/L e IBA 0.1 mg/L.
- Los análisis moleculares realizados con callos transformados no permitieron discriminar entre aquellos *knockout* y silvestres. Se recomienda evaluar con otras técnicas la generación de INDELS en las muestras transformantes.

6.-Bibliografía

- Ahmar, S., Gill, R. A., Jung, K.-H., Faheem, A., Qasim, M. U., Mubeen, M., & Zhou, W. (2020). Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2590.
- Albornoz, F., Torres, A., Tapia, M. L., & Acevedo, E. (2007). Cultivo DE tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) hidropónico con Agua desalinizada y desborificada en El Valle DE lluta. *Idesia*, *25*(2). <https://doi.org/10.4067/s0718-34292007000200010>
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, *513*(7519), 569–573.
- Angel, Y., Esteban, W., Bustos, R., Pacheco, P., Hurtado, E., & Bastías, E. (2016). Tomate “Poncho negro”: Historia y rescate de un cultivo olvidado. *Idesia*, *34*(ahead), 0–0.
- Arias, D. (2016). *Transformación estable de Solanum lycopersicum (tomate) con genes claves de la vía de síntesis de carotenoides, Psy2 y Lcyb de Daucus carota y Crtl de Xanthophyllomyces dendrorhous* (C. Stange, Ed.) [Master en Ciencias Biológicas]. Universidad de Chile.
- Arias, D., Arenas-M, A., Flores-Ortiz, C., Peirano, C., Handford, M., & Stange, C. (2021). *Daucus carota* DcPSY2 and DcLCYB1 as Tools for Carotenoid Metabolic Engineering to Improve the Nutritional Value of Fruits. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 677553.

- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712.
- Bastías, E., Angel, Y., Esteban, W., Bustos, R., Hurtado, E., & Pacheco, P. (2020). *TOMATE “PONCHO NEGRO”* (M. Manzur, R. Ortiz, & F. Tiara, Eds.). Universidad de Tarapacá.
- Benny, J., Pisciotta, A., Caruso, T., & Martinelli, F. (2019). Identification of key genes and its chromosome regions linked to drought responses in leaves across different crops through meta-analysis of RNA-Seq data. *BMC Plant Biology*, 19(1), 194.
- Biblioteca del Congreso Nacional. (2001, julio 14). *Resolucion-1523 EXENTA 14-JUL-2001 MINISTERIO DE AGRICULTURA, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO, DIRECCIÓN NACIONAL - Ley Chile - Biblioteca del Congreso Nacional*. <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=187630>
- Breseghele, F., & Coelho, A. S. G. (2013). Traditional and modern plant breeding methods with examples in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(35), 8277–8286.
- Chen, D., Ma, X., Li, C., Zhang, W., Xia, G., & Wang, M. (2014). A wheat aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene, TaACO1, negatively regulates salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 33(11), 1815–1827.
- Chen, K., Li, G.-J., Bressan, R. A., Song, C.-P., Zhu, J.-K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25–54.

- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merio, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, *11*(2), 263–271.
- Coker, J. S., & Davies, E. (2003). Selection of candidate housekeeping controls in tomato plants using EST data. *BioTechniques*, *35*(4), 740–742, 744, 746 passim.
- Cordoba-Novoa, H. A., Gómez, S. V., & Núñez, C. E. (2018). Yield and phenology evaluation of three tomato cherry genotypes (*Solanum lycopersicum* L.) under greenhouse conditions. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, *12*(1), 113–125.
- Curzel, V., Paredes, M. D. L. A., & Achem, M. (2019). *BOLETÍN DE FRUTICULTURA N°14*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Argentina. https://inta.gob.ar/sites/default/files/boletin_de_fruticultura_14.pdf
- De Cleene, M., & De Ley, J. (1976). The host range of crown gall. *The Botanical review; interpreting botanical progress*, *42*(4), 389–466.
- Doll, N. M., Gilles, L. M., Gérentes, M.-F., Richard, C., Just, J., Fierlej, Y., Borrelli, V. M. G., Gendrot, G., Ingram, G. C., Rogowsky, P. M., & Widiez, T. (2019). Single and multiple gene knockouts by CRISPR-Cas9 in maize. *Plant Cell Reports*, *38*(4), 487–501.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6213), 1258096.

- Dudziak, K., Sozoniuk, M., Szczerba, H., Kuzdraliński, A., Kowalczyk, K., Börner, A., & Nowak, M. (2020). Identification of stable reference genes for qPCR studies in common wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings under short-term drought stress. *Plant Methods*, 16(1), 58.
- Duncan, D. R. (2011). Organogenesis and Embryogenesis in Plant Genetic Transformation. En Y. Dan & D. W. Ow (Eds.), *Historical Technology Developments in Plant Transformation* (pp. 46-54 (9)). Bentham Science Publishers.
- Etaware, P. M. (2021). The effects of the phytochemistry of cocoa on the food chemistry of chocolate(s) and how disease resistance in cocoa can be improved using CRISPR/Cas9 technology. *Food Chemistry*, 3, 100043.
- Fang, H., Meng, Q., Xu, J., Tang, H., Tang, S., Zhang, H., & Huang, J. (2015). Knock-down of stress inducible OsSRFP1 encoding an E3 ubiquitin ligase with transcriptional activation activity confers abiotic stress tolerance through enhancing antioxidant protection in rice. *Plant Molecular Biology*, 87(4–5), 441–458.
- FAO. (s. f.). *Crops and livestock products* [Data set]. Recuperado 24 de enero de 2022, de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Foster, S. S. D., & Chilton, P. J. (2003). Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1440), 1957–1972.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., & Barbas, C. F., 3rd. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31(7), 397–405.

- Garreaud, R. D., Boisier, J. P., Rondanelli, R., Montecinos, A., Sepúlveda, H. H., & Veloso-Aguila, D. (2020). The Central Chile Mega Drought (2010–2018): A climate dynamics perspective. *International Journal of Climatology: A Journal of the Royal Meteorological Society*, *40*(1), 421–439.
- Gelvin, S. B. (2017). Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, *51*, 195–217.
- Gerszberg, A., & Grzegorzczak-Karolak, I. (2019). Influence of Selected Antibiotics on the Tomato Regeneration in In Vitro Cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *47*(3), 558–564.
- González-Calquín, C., Univaso, L., & Stange, C. (2022). Cisgenesis and Intragenesis as a Biotechnological Tool to Improve Abiotic Stress Tolerance in Commercial Crops. En A. Chaurasia & C. Kole (Eds.), *Cisgenic Crops: Potential and Prospects* (pp. 169–181). Springer International Publishing.
- Hatfield, J. L., Boote, K. J., Kimball, B. A., Ziska, L. H., Izaurralde, R. C., Ort, D., Thomson, A. M., & Wolfe, D. (2011). Climate impacts on agriculture: Implications for crop production. *Agronomy Journal*, *103*(2), 351–370.
- Houben, M., & Van de Poel, B. (2019). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 695.
- Huanca-Mamani, W., Arias-Carrasco, R., Cárdenas-Ninasivincha, S., Rojas-Herrera, M., Sepúlveda-Hermosilla, G., Caris-Maldonado, J., Bastías, E., & Maracaja-Coutinho, V. (2018). Long non-coding RNAs responsive to salt and boron stress in the hyper-arid lluteño maize from Atacama desert. *Genes*, *9*(3), 170.

- Khan, N. A., Khan, M. I. R., Ferrante, A., & Poor, P. (2017). Editorial: Ethylene: A key regulatory molecule in plants. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1782.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Duskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 2), 1024–1042.
- Lan, C.-Y., Lin, K.-H., Chen, C.-L., Huang, W.-D., & Chen, C.-C. (2020). Comparisons of chlorophyll fluorescence and physiological characteristics of wheat seedlings influenced by Iso-osmotic stresses from polyethylene glycol and sodium chloride. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 10(3), 325.
- Lemmers, M., De Beuckeleer, M., Holsters, M., Zambryski, P., Depicker, A., Hernalsteens, J. P., Van Montagu, M., & Schell, J. (1980). Internal organization, boundaries and integration of Ti-plasmid DNA in nopaline grown gall tumours. *Journal of Molecular Biology*, 144(3), 353–376.
- Li, H.-L., Wang, X., Ji, X.-L., Qiao, Z.-W., You, C.-X., & Hao, Y.-J. (2020). Genome-wide identification of apple ubiquitin SINA E3 ligase and functional characterization of MdSINA2. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1109.
- Liu, H., Sultan, M. A. R. F., Liu, X. L., Zhang, J., Yu, F., & Zhao, H. X. (2015). Physiological and comparative proteomic analysis reveals different drought responses in roots and leaves of drought-tolerant wild wheat (*Triticum boeoticum*). *PloS One*, 10(4), e0121852.

- Liu, Y., Li, L., Zhang, L., Lv, Q., Zhao, Y., & Li, X. (2018). Isolation and identification of wheat gene TaDIS1 encoding a RING finger domain protein, which negatively regulates drought stress tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 275, 49–59.
- Ma, Y., Wang, L., Wang, J., Zhong, Y., & Cheng, Z.-M. M. (2019). Isolation and expression analysis of Salt Overly Sensitive gene family in grapevine (*Vitisvinifera*) in response to salt and PEG stress. *PloS One*, 14(3), e0212666.
- Madeira, F., Pearce, M., Tivey, A. R. N., Basutkar, P., Lee, J., Edbali, O., Madhusoodanan, N., Kolesnikov, A., & Lopez, R. (2022). Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W276–W279.
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I., & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, 1, 7.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843–1845.
- Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H.-O., Roberts, D. C., Skea, J., Shukla, P. R., Pirani, A., Moufouma-Okia, W., Péan, C., Pidcock, R., Connors, S., Robin Matthews, J. B., Chen, Y., Zhou, X., Gomis, M., Lonnoy, E., Maycock, T., Tignor, M., & Waterfield, T. (2018). *Summary for Policymakers. In: Global Warming of 1.5°C*. IPCC.

- Metje-Sprink, J., Sprink, T., & Hartung, F. (2020). Genome-edited plants in the field. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 1–6.
- Muñoz, M. (2021, diciembre 24). *Boletín de hortalizas, diciembre 2021*. ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-hortalizas-diciembre-2021>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
- Murchie, E. H., Pinto, M., & Horton, P. (2009). Agriculture and the new challenges for photosynthesis research. *The New Phytologist*, 181(3), 532–552.
- Nerkar, G., Devarumath, S., Purankar, M., Kumar, A., Valarmathi, R., Devarumath, R., & Appunu, C. (2022). Advances in Crop Breeding Through Precision Genome Editing. *Frontiers in Genetics*, 13, 880195.
- Ning, Y., Jantasuriyarat, C., Zhao, Q., Zhang, H., Chen, S., Liu, J., Liu, L., Tang, S., Park, C. H., Wang, X., Liu, X., Dai, L., Xie, Q., & Wang, G.-L. (2011a). The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice. *Plant Physiology*, 157(1), 242–255.
- Ning, Y., Xie, Q., & Wang, G.-L. (2011b). OsDIS1-mediated stress response pathway in rice. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1684–1686.
- Ofori, P. A., Mizuno, A., Suzuki, M., Martinoia, E., Reuscher, S., Aoki, K., Shibata, D., Otagaki, S., Matsumoto, S., & Shiratake, K. (2018). Genome-wide analysis of ATP binding cassette (ABC) transporters in tomato. *PLoS One*, 13(7), e0200854.
- Pessarakli, M. (Ed.). (2016). *Handbook of plant and crop stress*. CRC Press.

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pino, L. E., Lombardi-Crestana, S., Azevedo, M. S., Scotton, D. C., Borgo, L., Quecini, V., Figueira, A., & Peres, L. E. (2010). The Rg1 allele as a valuable tool for genetic transformation of the tomato “Micro-Tom” model system. *Plant Methods*, 6(1), 23.
- Polekhina, G., House, C. M., Traficante, N., Mackay, J. P., Relaix, F., Sassoon, D. A., Parker, M. W., & Bowtell, D. D. L. (2002). Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nature Structural Biology*, 9(1), 68–75.
- Ranjha, L., Howard, S. M., & Cejka, P. (2018). Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma*, 127(2), 187–214.
- Saeed, W., Naseem, S., Gohar, D., & Ali, Z. (2019). Efficient and reproducible somatic embryogenesis and micropropagation in tomato via novel structures - Rhizoid Tubers. *PloS One*, 14(5), e0215929.
- Shukla, P. R., Skea, J., Buendia, E. C., Masson-Delmotte, V., Pörtner, H.-O., Roberts, D., Zhai, P., Slade, R., Connors, S., van Diemen, R., Ferrat, M., Haughey, E., Luz, S., Neogi, S., Pathak, M., Petzold, J., Pereira, J. P., Vyas, P., Huntley, E., ... Malley, J. (2019). *Summary for Policymakers. In: Climate Change and Land*. IPCC.
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J., & Olsson, O. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International Journal of Plant Genomics*, 2011, 314829.

- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62–67.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant physiology* 5th edition sinauer Associates. *Inc. Publishunder land Massac husetts.*
- Titeli, V. S., Zafeiriou, I., Laskaridou, A., Menexes, G., Madesis, P., Stavridou, E., & Nianiou-Obeidat, I. (2021). Development of a Simple and Low-Resource Regeneration System of Two Greek Tomato Varieties. *Agriculture*. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050412>
- Torres, A. (2017). *Manual de cultivo del Tomate al aire libre* (Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 376). INIA. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/6707>
- United Nations. (2015). *World Population Prospects: The 2015 Revision* (Key Findings and Advance Tables, Working Paper No. ESA/P/WP.241).
- Vouillot, L., Thélie, A., & Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3*, *5*(3), 407–415.
- Wang, W., Fan, Y., Niu, X., Miao, M., Kud, J., Zhou, B., Zeng, L., Liu, Y., & Xiao, F. (2018). Functional analysis of the seven in absentia ubiquitin ligase family in tomato. *Plant, Cell & Environment*, *41*(3), 689–703.
- Wheeler, D., & Bhagwat, M. (2007). BLAST QuickStart: example-driven web-based BLAST tutorial. *Methods in Molecular Biology*, *395*, 149–176.
- Williams, B., Ahsan, M. U., & Frank, M. H. (2021). Getting to the root of grafting-induced traits. *Current Opinion in Plant Biology*, *59*, 101988.

- Wojtyła, Ł., Lechowska, K., Kubala, S., & Garnczarska, M. (2016). Molecular processes induced in primed seeds-increasing the potential to stabilize crop yields under drought conditions. *Journal of Plant Physiology*, *203*, 116–126.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., & Zhang, B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Molecular Biology*, *80*(1), 75–84.
- Yang, Y., & Guo, Y. (2018). Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *The New Phytologist*, *217*(2), 523–539.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, *13*(1), 134.
- Zafar, S. A., Zaidi, S. S.-E.-A., Gaba, Y., Singla-Pareek, S. L., Dhankher, O. P., Li, X., Mansoor, S., & Pareek, A. (2020). Engineering abiotic stress tolerance via CRISPR/ Cas-mediated genome editing. *Journal of Experimental Botany*, *71*(2), 470–479.
- Zambryski, P., Holsters, M., Kruger, K., Depicker, A., Schell, J., Van Montagu, M., & Goodman, H. M. (1980). Tumor DNA structure in plant cells transformed by *A. tumefaciens*. *Science (New York, N.Y.)*, *209*(4463), 1385–1391.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M. V., & Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, *2*(12), 2143–2150.

- Zhang, C., Hao, Z., Ning, Y., & Wang, G.-L. (2019). SINA E3 Ubiquitin Ligases: Versatile Moderators of Plant Growth and Stress Response. *Molecular Plant*, 12(5), 610–612.
- Zhang, H., Li, Y., & Zhu, J.-K. (2018). Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture. *Nature Plants*, 4(12), 989–996.
- Zhu, J.-K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 247–273.

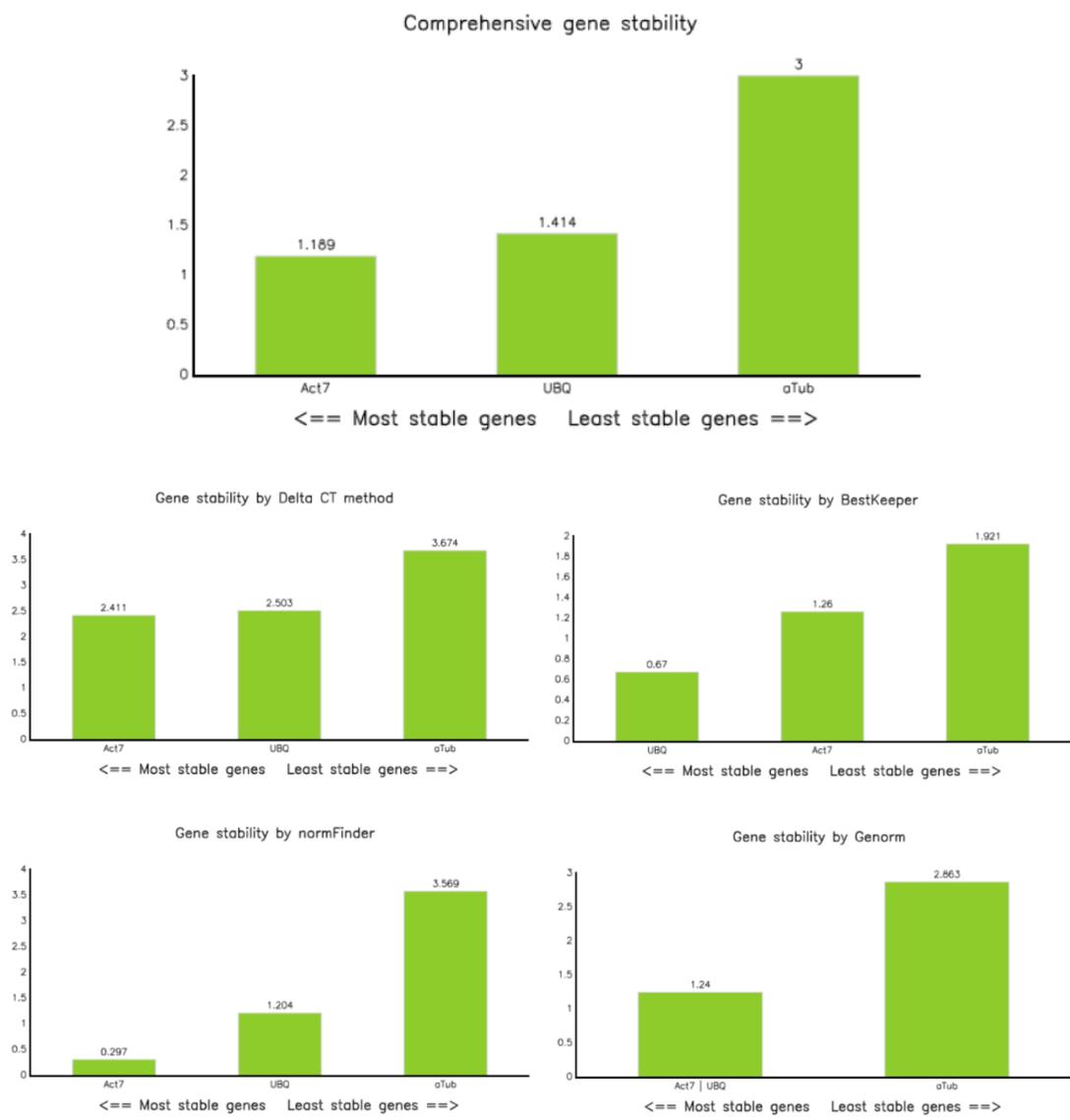


Figura S3.-Resultados de RefFinder para la estabilidad de genes normalizadores en tomate ACE. Recuadro superior muestra el resumen de los resultados en base al algoritmo de RefFinder. El resto de los gráficos muestran los resultados de los métodos del Delta Ct, BestKeeper, normFinder y Genorm de manera individualizada. En todos los gráficos, valores de menor magnitud indican mayor estabilidad de los genes; por otro lado, mayor magnitud se correlaciona a menor estabilidad.

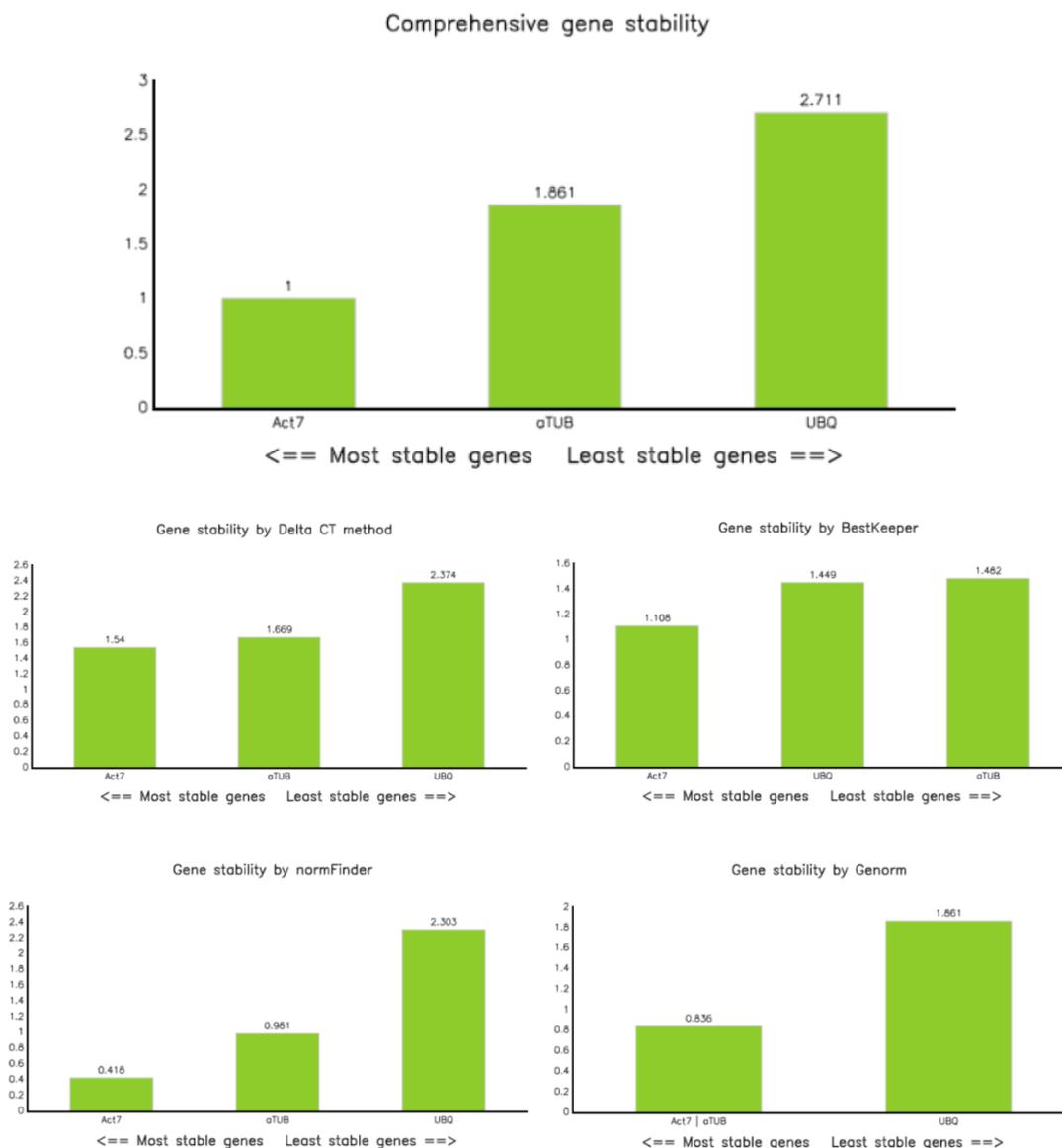


Figura S4.-Resultados de RefFinder para la estabilidad de genes normalizadores en tomate Poncho Negro. Recuadro superior muestra el resumen de los resultados en base al algoritmo de RefFinder. El resto de los gráficos muestran los resultados de los métodos del Delta Ct, BestKeeper, normFinder y Genorm de manera individualizada. En todos los gráficos, valores de menor magnitud indican mayor estabilidad de los genes; por otro lado, mayor magnitud se correlaciona a menor estabilidad.

Tabla S1.- Genes reguladores negativos a estrés en la literatura. Se tabula una lista de genes reguladores negativos a estrés abiótico, donde se señala si su expresión posee regulación positiva (+) o negativa (-) ante estrés salino o hídrico, el efecto que produce en la planta (tolerancia o susceptibilidad), el factor al que responde y la literatura donde se menciona.

Nombre	Expresión bajo estrés	Tolerancia o susceptibilidad al ser inducido	Factor	Referencias
<i>Homeobox 7</i>	(+)	T	Sequía y ABA	Soderma et al. 1996; Georgi et al. 2019; Benny et al. 2019
<i>Alfin5</i>	(+) (-)	T/S	Sequía y salinidad	Bastola et al. 1998; Winicov et al. 2000; Benny et al. 2019
<i>ERF1</i>	(+)	T	Etileno	Cheng et al. 2013; Xing et al. 2017; Benny et al. 2019
<i>APK2B</i>	(+)	T	?	Benny et al. 2019
<i>WRKY20</i>	(+)	T	Sal y ABA	Luo et al. 2013; Zhu et al. 2019; Benny et al. 2019
<i>LOS1</i>	(+)	S	Frío	Benny et al. 2019
<i>HSP90.4</i>	(+)	T	Calor	Benny et al. 2019
<i>ATL5</i>	(-)	?	Factor de transcripción	Luo et al. 2013; Zhu et al. 2019; Benny et al. 2019
<i>TTL1</i>	(-)	T	Sequía y salinidad	Benny et al. 2019
<i>WDR5A</i>	(+)	?	Cromatina	Benny et al. 2019
<i>ASHH1</i>	(+)	?	Cromatina	Benny et al. 2019
<i>AREB3</i>	(-)	T	ABA	Benny et al. 2019
<i>PP2AA2</i>	(-)	?	?	Benny e al. 2019
<i>SNF7</i>	(-)	T	Frio	Noman et al. 2017; Benny et al. 2019
<i>BAG6</i>	(+)	S	Apoptosis	Doukhanina et al. 2006; Benny et al. 2019
<i>ERF4</i>	(+)	T	Sequía y salinidad	Yang et al. 2005; Benny et al. 2019
<i>ABA2</i>	(+)	T	Sequía y frío	Peleg et al. 2011; Benny et al. 2019
<i>SDG26</i>	(+)	?	?	Benny et al. 2019
<i>WRKY53</i>	(+)	T	Sequía	Van Eck et al. 2014; Benny et al. 2019
<i>ESE3</i>	(+)	T	Salinidad	Sham et al. 2015; Benny et al. 2019
<i>SOS3</i>	(+)	T	Salinidad	Kim et al. 2013; Benny et al. 2019
<i>ACS12</i>	(-)	S	Sequía y etileno	Benny et al. 2019
<i>SAT32</i>	(-)	T	Salinidad	Park et al. 2009; Benny et al. 2019
<i>HSP70-2</i>	(-)	T	Salinidad y calor	Leng et al. 2016
<i>J20</i>	(-)	?	Chaperona	Benny et al. 2019
<i>CDKA-1; CDC2</i>	(-)	T	Sequía y salinidad	Ye et al. 2016; Benny et al. 2019
<i>GR1</i>	(+)	T	Sequía, salinidad y ROS	Gill et al. 2013; Benny et al. 2019

<i>CCD4</i>	(-)	T	Sequía y salinidad	Wang et al. 2013; Benny et al. 2019
<i>HVA22A</i>	(-)	T	Sequía y salinidad	Gomes Ferreira. 2019; Benny et al. 2019
<i>AREB3</i>	(-)	T	Sequía y salinidad	Akpınar et al. 2012; Benny et al. 2019
<i>ACS12</i>	(-)	T	Etileno	Chae et al. 2005; Benny et al. 2019
<i>EAT1/ACO2</i>	(+)	S	Sequía	Benny et al. 2019
<i>ERD4</i>	(-)	T	Sequía	Benny et al. 2019
<i>AT5G64030</i>	(-)	?	?	Benny et al. 2019
<i>HVA22</i>	(-)	?	?	Benny et al. 2019
<i>ERD15</i>	(-)	T	Sequía	Aalto et al. 2012; Benny et al. 2019
<i>STT3A</i>	(-)	T	Sequía y salinidad	Koiwa et al. 2003; Benny et al. 2019
<i>AT1G26850</i>	(-)	?	Sequía	Benny et al. 2019
<i>DIL9-3</i>	(+)	T	Sequía	Qin et al. 2014; Benny et al. 2019
<i>SRFP1</i>	(-)	S	Salinidad	Fang et al. 2015; Zafar et al. 2019
<i>DIS1</i>	(+)	S	Sequía	Ning et al. 2011a; Ning et al. 2011b; Zafar et al. 2019
<i>DST</i>	(+)	S	Sequía y salinidad	Huang et al. 2014; Zafar et al. 2019
<i>ANAC069</i>	(+)	S	Sequía y salinidad	He et al. 2016; Zafar et al. 2019
<i>MYB44</i>	(+)	T	Sequía y salinidad	Persak et al. 2014; Zafar et al. 2019
<i>NAL7</i>	(+)	T	Sequía	Peralta et al. 2018
<i>PAO1</i>	(+)	T	Poliaminas	Hao et al. 2018
<i>NPR1</i>	(+)	T	Sequía	Li et al. 2019
<i>MYB10</i>	(+)	S	Sequía y ABA	Gao et al. 2016; Zafar et al. 2019
<i>GhSARP1</i>	(+)	S	Salinidad	Liu et al. 2016; Zafar et al. 2019
<i>SAP7</i>	(+)	S	Sequía	Sharma et al. 2015; Zafar et al. 2019
<i>MODD</i>	(+)	S	Sequía	Ning et al. 2011; Yan et al. 2018
<i>ACS6</i>	(+)	S	Sequía y salinidad	Dong et al. 2011; Benny et al. 2019

Tabla S2.- Ensayo de regeneración *in vitro* de tomate Poncho Negro por organogénesis somática a partir de hojas (1 mes). Se muestran fotografías representativas de los explantes luego de 1 mes cultivados en las distintas combinaciones de sacarosa (Sac) (1-3% p/V) y fitohormonas (BAP/IBA y ZEA/IBA). Como control negativo a la organogénesis somática se utilizaron placas suplementadas con sacarosa (1-3%) pero sin suplemento hormonal.

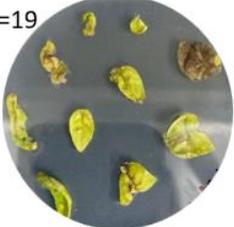
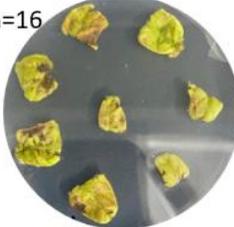
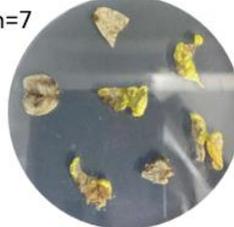
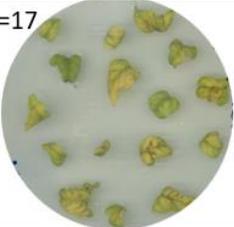
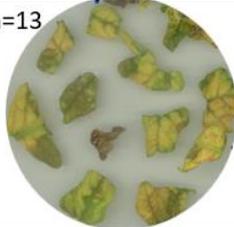
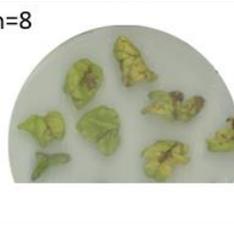
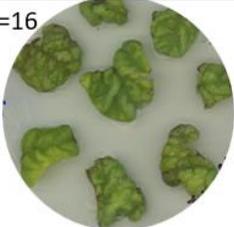
Medio Basal	BAP 2mg/L IBA 0.1mg/L	ZEA 2mg/L IBA 0.1mg/L	Control sin Tratamiento Hormonal
MS 1x Sac 3%	n=19 	n=16 	n=7 
MS 1x Sac 2%	n=17 	n=13 	n=8 
MS 1x Sac 1%	n=16 	n=6 	n=7 

Tabla S3.- Ensayo de regeneración *in vitro* de tomate Poncho Negro por organogénesis somática a partir de hojas (2 mes). Se muestran fotografías representativas de los explantes luego de 1 mes cultivados en las distintas combinaciones de sacarosa (Sac) (1-3% p/V) y fitohormonas (BAP/IBA y ZEA/IBA). Como control negativo a la organogénesis somática se utilizaron placas suplementadas con sacarosa (1-3%) pero sin suplemento hormonal.

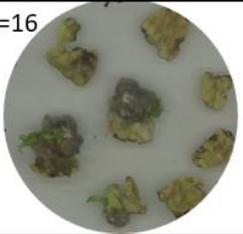
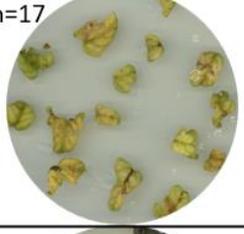
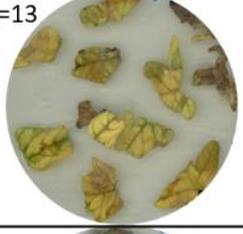
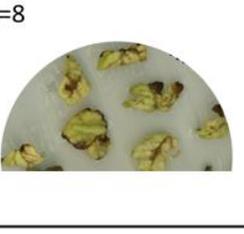
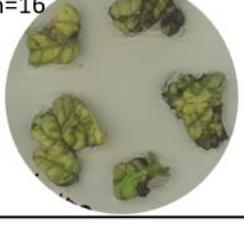
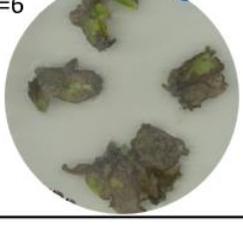
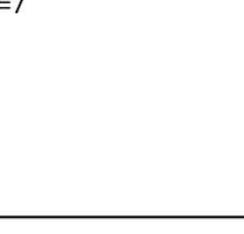
Medio Basal	BAP 2mg/L IBA 0.1mg/L	ZEA 2mg/L IBA 0.1mg/L	Control sin Tratamiento Hormonal
MS 1x Sac 3%	n=19 	n=16 	n=7 
MS 1x Sac 2%	n=17 	n=13 	n=8 
MS 1x Sac 1%	n=16 	n=6 	n=7 

Tabla S4.- Ensayo de regeneración *in vitro* de tomate Poncho Negro por organogénesis somática a partir de tallos (1 mes) Se muestran fotografías representativas de los explantes luego de 2 meses cultivados en las distintas combinaciones de sacarosa (Sac) (1-3% p/V) y fitohormonas (BAP/IBA y ZEA/IBA). Como control negativo a la organogénesis somática se utilizaron placas suplementadas con sacarosa (1-3%) pero sin suplemento hormonal.

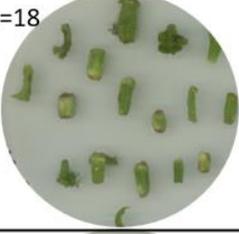
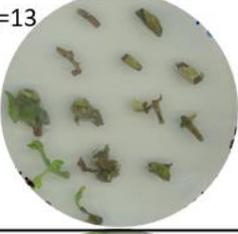
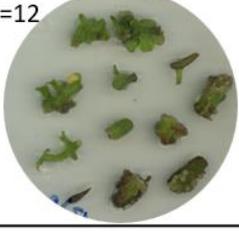
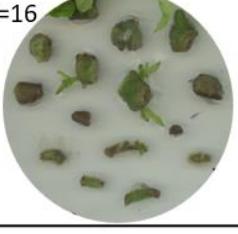
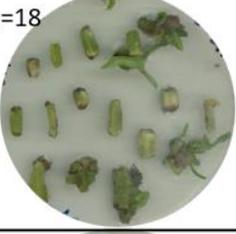
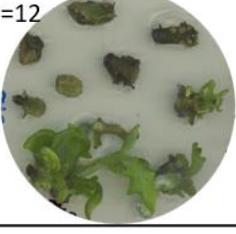
Medio Basal	BAP 2mg/L IBA 0.1mg/L	ZEA 2mg/L IBA 0.1mg/L	Control sin Tratamiento Hormonal
MS 1x Sac 3%	n=7 	n=7 	n=0
MS 1x Sac 2%	n=18 	n=13 	n=8 
MS 1x Sac 1%	n=12 	n=16 	n=10 

Tabla S5.- Ensayo de regeneración *in vitro* de tomate Poncho Negro por organogénesis somática a partir de tallos (2 meses). Se muestran fotografías representativas de los explantes luego de 2 meses cultivados en las distintas combinaciones de sacarosa (Sac) (1-3% p/V) y fitohormonas (BAP/IBA y ZEA/IBA). Como control negativo a la organogénesis somática se utilizaron placas suplementadas con sacarosa (1-3%) pero sin suplemento hormonal.

Medio Basal	BAP 2mg/L IBA 0.1mg/L	ZEA 2mg/L IBA 0.1mg/L	Control sin Tratamiento Hormonal
MS 1x Sac 3%	n=7 	n=7 	n=0 
MS 1x Sac 2%	n=18 	n=13 	n=8 
MS 1x Sac 1%	n=12 	n=16 	n=10 