

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

“Estrategia Biotecnológica para la identificación y selección de genes que codifican para reguladores negativos de estrés salino e hídrico en Kiwi, variedad *Hayward (Actinidia deliciosa)*.”

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

Magíster en Ciencias Biológicas.

Por

Vincenzo Porcile Saavedra

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.

Agosto, 2023

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

Vincenzo Porcile Saavedra

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

.....

Director de Tesis:

Dra. Claudia Stange

Co-Director de Tesis

Dr. Samuel Parra

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Michael Handford

Dr. Marcelo Baeza

Índice de Materias

Lista de Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
1 Introducción	1
1.1 Hipótesis	5
1.2 Objetivo General	5
1.3 Objetivos Específicos	6
2 Materiales y Métodos	7
2.1 Materiales	7
2.2 Análisis bioinformáticos	7
2.3 Diseño de partidores	8
2.4 Métodos de cultivo y transformación	8
2.4.1 Cultivo de cepas bacterianas	8
2.4.2 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes	9
2.4.3 Obtención de secuencia codificante de <i>AdSAP7</i>	10
2.4.4 Clonamiento del gen <i>AdSAP7</i> en el vector pCR8	11
2.4.5 Extracción de ADN plasmidial mediante EZNA Mini Kit	13
2.4.6 Verificación del inserto y su direccionalidad mediante digestión enzimática del ADN plasmidial	13
2.4.7 Secuenciación del vector pCR8- <i>AdSap7</i>	13
2.4.8 Clonación de fragmento de interés en el vector de destinación pGWB5: Recombinación por tecnología Gateway®	14
2.4.9 Preparación del cultivo bacteriano de <i>A. tumefaciens</i> cepa GV3101 para la transformación de plantas de tabaco	16
2.5 Cultivos y transformaciones vegetales	17
2.5.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Actinidia deliciosa</i>	17
2.5.2 Cultivo, transformación y organogénesis somática de <i>Nicotiana tabacum</i>	17
2.5.3 Localización subcelular mediante transformación transitoria de hojas de <i>N. tabacum</i>	18
2.6 Ensayos de estrés por sequía y salinidad de plántulas de <i>A. deliciosa</i>	19
2.7 Extracción de ácidos nucleicos	20
2.7.1 Extracción de ADN genómico	20

2.7.2	Extracción de ARN total a partir de tejido vegetal de <i>A. deliciosa</i>	21
2.7.3	Tratamiento del RNA total con DNasa I	22
2.7.4	Síntesis de ADNc	22
2.8	<i>PCR y qRT-PCR</i>	23
2.8.1	PCR Convencional utilizando ADNg o ADNc como molde	23
2.8.2	PCR de colonias bacterianas	24
2.8.3	RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)	24
2.9	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	26
2.10	Microscopía	27
2.11	Análisis de transgenia (genotipificación de plantas)	27
3	Resultados	33
3.1	Selección de genes candidatos mediante análisis filogenéticos y análisis de dominios conservados	33
3.2	Niveles de expresión de los genes <i>AdSAP7</i> , <i>AdACS6</i> , <i>AdSRFP1</i> y <i>AdSARP1</i> en plantas de <i>A. deliciosa</i> var. Hayward sometidas a tratamiento por sequía y salinidad	41
3.3	Clonamiento del gen <i>AdSAP7</i> en el vector pCR8	47
3.4	Generación de un vector binario para la expresión de <i>AdSAP7</i> en plantas de tabaco	50
3.5	Determinar la localización subcelular de <i>AdSAP7</i> : GFP mediante Transformación transitoria de hojas de <i>N. tabacum</i>	51
3.6	Transformación estable de plantas de <i>N. tabacum</i>	53
3.7	Análisis de transgenia	¡Error! Marcador no definido.
4	Discusión	56
4.1	Selección de genes candidatos	56
4.2	Niveles de expresión de los genes <i>AdSAP7</i> , <i>AdACS6</i> , <i>AdSRFP1</i> y <i>AdSARP1</i> en plantas de <i>A. deliciosa</i> var. Hayward sometidas a tratamiento por sequía y salinidad	58
4.3	Transformación de explantes de <i>N. tabacum</i>	¡Error! Marcador no definido.
5	Conclusiones	64
6	Bibliografía	65

Lista de Tablas

Tabla 1: Resistencia a antibiótico de los vectores usados en este trabajo	28
Tabla 2: Mezcla de reacción usada para amplificar el ADNc de <i>AdSAP7</i>	28
Tabla 3: Mezcla de reacción para adición de adeninas a un fragmento amplificado por PCR	28
Tabla 4: Mezclas de reacción para las digestiones enzimáticas.....	29
Tabla 5: Medios de cultivo de plantas de kiwi (A.d) y tabaco (N.t)	29
Tabla 6: Programas de PCR	30
Tabla 7: Partidores utilizados durante este trabajo.....	31
Tabla 8. Lista de genes candidatos como reguladores negativos en plantas bajo estrés. Estos genes se expresan en respuesta a condiciones estrés abiótico y pueden generar susceptibilidad en las plantas al ser sobreexpresados, lo que los convierte en candidatos para la edición genética mediante herramientas como CRISPR/Cas9 (Bermúdez y col. 2016).	34
Tabla 9. Lista de genes ortólogos en Kiwi var. <i>chinensis</i> seleccionados en base a análisis bioinformáticos. * indica los genes que se utilizaron en esta tesis para el estudio de expresión relativa.....	41
Tabla 10: Datos obtenidos de espectrofotómetro Epoch2. Control (Tiempo 0), NaCl (Tratamiento Salino), PEG (Tratamiento Sequia).	78

Lista de Figuras

- Figura 1. Señalización de estrés abiótico mediada por OsSAP7.** Bajo condiciones no estresadas y estresadas, OsSAP7 media la ubiquitinación de reguladores positivos del estrés abiótico, como los factores de transcripción inducidos por ABA, ABFs. OsSAP7 está compuesto por dominios A20 y AN1 requeridos para la ubiquitinación, y el NLS para la localización nuclear. El dominio AN1 permite tanto la localización nuclear como citoplasmática. Adaptado de Giri y col. 2015. 4
- Figura 2. Esquema de vector pCR®8.**..... 12
- Figura 3. vector usado en este trabajo y recombinación Gateway.** A: Vector pGWB5. B: esquema de la recombinación. La enzima LR clonasa permite el intercambio del inserto desde el vector de entrada hacia el vector de expresión, generando el clon de expresión y un subproducto. 16
- Figura 4. Esquema de ensayo de estrés agudo por salinidad y sequía en kiwi Hw y análisis de niveles de expresión relativa de los genes *AdSAP7*, *AdACS6*, *AdSARP1* y *AdSRFP1*.**..... 20
- Figura 5. Árbol filogenético y alineamiento de SAP7.** Alineamientos y análisis de dominios conservados de SAP7. La estrella indica la secuencia OsiSAP7 descrita en la Tabla 8. Árbol enraizado con proteína SAP7 de *Cándida africana*. 39% de identidad de SAP7 con CEY00Acc13435_LG12, 39% de identidad de SAP7 con CEY00Acc22733_LG20 y 40% de identidad del SAP7 con CEY00Acc24625_LG22. Todas las secuencias poseen los dominios zf-A20 y ZnF_AN1, descritos en 3.1. 36
- Figura 6. Árbol filogenético y alineamiento de SRFP1.** Alineamientos y análisis de dominios conservados de SRFP1. La estrella indica la secuencia OsSRFP1 descrita en la Tabla 8. Árbol enraizado con proteína SRFP1 de *Nematostella vectensis*. 69% de identidad de SRFP1 con CEY00Acc06449_L6, 74% de identidad del SRFP1 con CEY00Acc22532_L20, 77% de identidad del SRFP1 con CEY00Acc19615_L17 y 68% de identidad del SRFP1 con CEY00Acc27241_L24. Todas las secuencias poseen los dominios zf-CHY, Zinc_Ribbon_6 y RINNG_UBOX, descritos en 4.1, excepto la secuencia CEY00Acc19614. 38
- Figura 7. Árbol filogenético y alineamiento de ACS6.** Alineamientos y análisis de dominios conservados de ACS6. La estrella indica la secuencia AtACS6 (tabla 8). Árbol enraizado con proteína ACS6 de *Eriobotrya japonica*. 63,52% de identidad de ACS6 con CEY00Acc15646_LG14, 62% de identidad del ACS6 con CEY00Acc20046_LG18 y 58% de identidad del ACS6 con CEY00Acc19838_LG18. Todas las secuencias poseen el dominio PLN02450, descrito en 4.1, excepto la secuencia CEY00Acc09164. 39

Figura 8. Árbol filogenético y alineamiento de SARP1. Alineamientos y análisis de dominios conservados de SARP1. La estrella indica la secuencia GhSARP1 descrita en la Tabla 8. Árbol enraizado con proteína SARP1 de *Spiroplasma citri*. 45% de identidad de SARP1 con CEY00Acc32410_LG28, 59% de identidad del SARP1 con CEY00Acc31756_LG28, 74% de identidad del SARP1 con CEY00Acc02875_LG3 y 72% de identidad del SARP1 con CEY00Acc01630_LG2. Todas las secuencias poseen el dominio RING_H2-PA, descrito en 4.1..... 40

Figura 9. Resultados del análisis utilizando la herramienta RefFinder para la selección de genes de referencia. RefFinder combina los resultados de estos cuatro métodos y asigna un valor de estabilidad de referencia a cada gen. Cuanto más bajo sea el valor de RefFinder, más estable se considera el gen de referencia. Resultados muestran que el gen *AdGAPDH* es el más estable y adecuado como gen normalizador en qRT-PCR..... 43

Figura 10. Expresión relativa del gen *AdNCED3* bajo estrés salino y sequía aguda. *AdNCED3* fue inducido en hojas de plantas *in vitro* a las 6, 24 y 48 horas después del tratamiento PEG 6.000 al 20% p/v y 200 mM NaCl. *AdGAPDH* se utilizó como normalizador y las 0 horas (T0, control) como calibrador. Los datos representan la media \pm desviación estándar (SD) (n = 6). Se determinó la diferencia estadística utilizando ANOVA de Brown-Forsythe y Welch. * p < 0.05, ** p > 0.01 y *** p < 0.001.44

Figura 11. Expresión relativa de genes bajo estrés salino y sequía aguda. A) expresión relativa de *AdACS6*, B) *AdSAP7*, C) *AdSRFP1* y D) *AdSARP1* en hojas de plantas de kiwi *in vitro* bajo tratamiento a las 6, 24 y 48 horas de 250 mM NaCl y PEG 6.000 al 20% p/v. *AdGAPDH* se utilizó como normalizador y las 0 horas (Control) como calibrador. Los datos representan la media \pm desviación estándar (SD) (n = 6). Se determinó la diferencia estadística utilizando ANOVA de Brown-Forsythe y Welch. * p < 0.05, ** p > 0.01 y *** p < 0.001. 46

Figura 12. Digestión enzimática del ADN plasmidial extraído desde las colonias pCR8-SAP7. A la izquierda se muestra el patrón de digestión esperado obtenido mediante el software Snapgene (GSL Biotech) si las colonias poseen el inserto. A la derecha la digestión de colonias 1.5, 1.6, 2.4 y 3.5 con EcoRI. Las flechas indican los tamaños de 3000 pb y 500 pb. 1 kb: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder. 48

Figura 13. Digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias pCR8-SAP7 con la enzima Avall. Patrón esperado (A) simulado mediante el software Snapgene (GSL Biotech) y en B) el patrón obtenido luego de 3 horas de incubación de las colonias 1.5, 1.6, 2.4 y 3.5 con Avall.1 Kb: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder. 49

Figura 14. Alineamiento aminoacídico de AdSAP7 de *A. chinensis* var. *chinensis*, *A. deliciosa* var. *Hayward* y colonia 3.5 secuenciada (SAP7_Clon). SAP7_Chinensis: Secuencia obtenida desde la base de datos NCBI (ID de acceso: Red5_PS1_1.69.0); SAP7_Hayward: Secuencia obtenida desde proyecto Anillo (PASSA ACT 192073); SAP7_Clon: Secuencia obtenida desde los cromatogramas correspondientes a la colonia 3.5, mediante el software SnapGene 3.2.1 (GSL Biotech).
.....50

Figura 15. Digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias pSAP7: GFP con la enzima EcoRI. Patrón (A) simulado mediante el software Snapgene (GSL Biotech) esperando las bandas de ≈3000 y 504 pb y B) el patrón obtenido luego incubación de las colonias P1.1; P2.1; P3.1; P4.1; P4.2; P5.2; P6.1 y P6.2 con la enzima EcoRI. En cuadro rojo: colonias seleccionadas para siguiente etapa: P2.1 y P4.1 MP: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.51

Figura 16. PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con vector pSAP7: GFP. C1-C5: colonias analizadas mediante amplificación del gen AdSAP7 de 500pb. C+: control positivo de la reacción (vector pCR8-SAP7), C-: control negativo de la reacción (reacción sin ADN, solo agua). MP: marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder.51

Figura 17. Localización subcelular de AdSAP7: GFP en hojas de tabaco. Se infiltraron hojas de plantas de tabaco con suspensiones de *A. tumefaciens* que portaban el constructo AdSAP7: GFP donde está bajo expresión el promotor 35S. Se determinó la fluorescencia después de 3 días en microscopía confocal bajo luz de excitación de 489 nm. (A) AdSAP7: GFP localización nuclear; (B) AdSAP7: GFP localización citoplasmática; (C) 35S: GFP control localización citoplasmática; (D) 35S: PIF3 Control localización nuclear.....52

Figura 18. Obtención de plantas de tabaco transgénicas para el gen AdSAP7. A: Explantes transformados y controles tras 1 semana de cultivo en Medio N.t I; B: Aparición de plántulas luego de 6 semanas de cultivo (Medio II); C: Elongación y enraizamiento de plántulas en frascos con Medio N.t III tras 9 semanas de cultivo (≈5 cm de altura).....54

Figura 19. Genotipificación de las plantas de tabaco transformadas con la construcción pAdSAP7. A: amplificación del gen *18S* en 13 líneas transformantes de tabaco con pGWB5/AdSAP7. Fragmento esperado; 196 pb, B: Amplificación de *nptII* (resistencia a Higromicina) en las mismas líneas. La imagen de abajo corresponde a la versión con relieve que entrega el Software GeneSnap 7.12 (Syngene), incluyendo ADNg de tabaco WT y el control negativo, con los partidores *HptII* F y *HptII* R (Tabla 7). Fragmento esperado: 666 pb.....55

Figura 20. Procedimiento y perfil del qRTPCR del gen *AdGAPDH*. A) Procedimiento in silico y en gel del partido qPCR_GAPDH. B) Curva de disociación para el gen *AdGAPDH*. C) Gráfico de amplificación del gen. D) Curva estándar con valores eficiencia: 102.1% y RSq: 0.997.79

Lista de Abreviaturas

- 2,4-D : Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
- 5'NTR : Región no traducible en el extremo 5'
- ABA : Ácido Abscísico
- BLASTn : Herramienta de alineamiento básico local de nucleótidos
- ADNc : Ácido desoxirribonucleico copia
- Ct : Ciclo umbral por sobre la fluorescencia basal
- CTAB : Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- ADN : Ácido desoxirribonucleico
- ADNasa : Desoxi-ribonucleasa
- dNTP : Desoxinucleótido trifosfato
- D.O. : Densidad Óptica
- GA3 : Ácido giberélico
- Kb : kilobase
- Medio LB : Medio Luria Bertani
- pb : pares de bases
- PCR : Reacción en cadena de la Polimerasa
- ARN : Ácido ribonucleico

- ADNp : ADN plasmidial
- ARNasa : Ribonucleasa
- RT : Transcripción Reversa o transcriptasa reversa
- μ L : microlitro

Resumen

Los efectos del cambio climático, que incluyen variaciones significativas e irreversibles en la temperatura, están impactando la tierra y a la producción agrícola. La salinidad y sequía de suelos son los estreses abióticos que mas daño han causado al crecimiento y la producción de alimento. En este contexto, las tecnologías de edición genética, como CRISPR/Cas9, junto con el estudio de genomas, adquieren un papel fundamental para generar variedades de cultivos de importancia para el consumo humano que sean tolerantes al estrés hídrico y salino. Entre ellos destaca *Actinidia deliciosa* (kiwi), una fruta de gran importancia en Chile debido a su valor nutricional y su contribución al desarrollo agrícola del país. Por ello, se podrían generar plantas de kiwi tolerantes a estrés abiótico usando CRISPR.

En esta tesis identificamos y seleccionamos tres genes candidatos a ser editados que codificarían para ubiquitinas ligasas (*AdSRFP1*, *AdSAP7* y *AdSARP1*) y un gen que codificaría para una enzima de síntesis etileno (*AdACS6*), ya que pueden actuar como reguladores negativos (RN) en la respuesta al estrés en kiwi *Hayward* y que pueden ser blanco de edición. Se determinó que los niveles de expresión de estos genes en plantas de *Actinidia deliciosa* var. *Hayward* aumentan en respuesta al estrés por sequía y salinidad. Además, se clonó el gen *AdSAP7* ya que presentaba los mayores niveles de expresión y se generó un vector para su expresión en plantas. Se determinó que *AdSAP7: GFP* posee localización citoplasmática y nuclear, concordante con la función ubiquitin ligasa a la que codificaría. Se finalizó la tesis con la obtención de plantas de tabaco transformantes para *SAP7* que serán usadas para futuros ensayos funcionales

y finalizar la caracterización del gen. Para esto se propone un futuro ensayo crónico con las plantas transgénicas aclimatadas en tierra. Los resultados de este estudio permiten concluir que la estrategia empleada posibilita la identificación y selección de genes RN como potenciales candidatos a edición génica. Esto, a su vez, abre nuevas perspectivas para mejorar la tolerancia al estrés en cultivos agrícolas y proporciona un mayor entendimiento sobre los mecanismos de adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas.

Abstract

The effects of climate change, which encompass significant and irreversible temperature variations, are impacting the land and agricultural production. Soil salinity and drought are the abiotic stresses that have caused the most damage to growth and food production. In this context, genetic editing technologies such as CRISPR/Cas9, coupled with genome studies, play a fundamental role in enabling the generation of crop varieties crucial for human consumption that are stress-tolerant, particularly to water and salinity stress. Among these, *Actinidia deliciosa* (kiwifruit), a fruit of great economic significance in Chile due to its nutritional value and contribution to the country's agricultural development, stands out. Thus, it is conceivable to engineer kiwifruit plants tolerant to abiotic stress using CRISPR.

In this thesis, we identified and selected four candidate genes for editing that encode for ubiquitin ligases (*AdSRFP1*, *AdSAP7*, and *AdSARP1*) and the ethylene synthesis enzyme *AdACS6*. These genes were chosen as potential targets due to their role as negative regulators in the stress response of *Hayward* kiwifruit, and their potential suitability for editing. It was determined that the expression levels of these genes in *Actinidia deliciosa* var. *Hayward* plants increased in response to drought and salinity stress. Additionally, the *AdSAP7* gene was cloned due to its higher expression levels, and a vector for its expression in plants was generated. It was found that *AdSAP7*: GFP had cytoplasmic and nuclear localization, consistent with its predicted function as a ubiquitin ligase. The thesis concluded with the successful generation of transformed tobacco plants for *SAP7*, which will be used for future functional assays and to

complete the gene characterization. A future chronic assay with acclimatized transgenic plants in soil is proposed for this purpose. The results of this study lead to the conclusion that the employed strategy enables the identification and selection of negative regulator genes as potential candidates for genetic editing.

1 Introducción

Desde el siglo pasado, los niveles de CO₂ han aumentado progresivamente, en consecuencia, las temperaturas globales se han intensificado dramáticamente (Jansson y col. 2020), lo que ha favorecido la desertificación, que se caracteriza por la alta salinidad de suelos y por la escasez de agua en diversas zonas del mundo (Zhang y col. 2018; Raza y col. 2019). Este fenómeno ambiental, conocido como estrés abiótico, amenaza gravemente la agricultura, ya que es la principal causa de pérdida de cultivos a nivel mundial, reduciendo en promedio más del 50% del rendimiento de los cultivos más importantes (Wang y col. 2003).

En Chile se pronostica para el 2050 una reducción del 15-20% en la precipitación anual (Garreaud y col. 2015) lo que preocupa en el rubro agrícola, pues, el país se caracteriza por ser un importante productor de fruta fresca, destacando *A. deliciosa* (kiwi), siendo el 3er productor mundial de Kiwi, puesto que produce el 17% de este cultivo, especialmente *A. deliciosa* (Bravo, 2014). El kiwi es sensible a las bajas temperaturas (Gostincar y Yuste Pérez, 2006) y a la salinidad, estrés abiótico que limitan el rendimiento fotosintético (Chartzoulakis y col. 1995) lo cual reduce el crecimiento, afectando significativamente la producción de este cultivo.

Los estreses hídrico y salino desencadenan señales en las plantas, lo que se traduce en respuestas que generan cambios en la expresión y regulación de ciertos genes involucrados en su tolerancia (Moreno 2009). En medio de esta respuesta hay expresión de genes que regulan negativamente la tolerancia promoviendo la muerte

celular, afectando la planta en condiciones de estrés, lo que hace interesante estudiar su funcionalidad para una posible edición de estos y así favorecer la respuesta de tolerancia en las plantas frente a estrés hídrico y salino. En este sentido, la edición genética conlleva editar el genoma de la planta generando variedades en poco tiempo y sin necesidad de integrar de manera estable material genético exógeno (Metje-Spink y col. 2019). Dentro del nuevo grupo de técnicas de edición génica, destaca la herramienta CRISPR/Cas9, la que se basa en la formación de un complejo compuesto por un RNA guía (gRNA) y la proteína Cas9 (Hryhorowicz y col. 2017). Cas9 realiza un corte en ambas hebras del ADN, generando extremos romos, lo que lleva a la reparación del corte en el ADN mediante el sistema “non-homologous end joining” (NHEJ), donde comúnmente ocurren errores tipo indel, generando una mutación, lo que puede llevar a la pérdida de la función del gen blanco afectando su marco de lectura abierto (ORF) (Kathodia y col. 2016).

CRISPR/Cas9 se ha utilizado en diversos modelos vegetales para la mutación o edición (knockout) de genes (Brooks y col. 2014), por esta razón, se podría usar en genes reguladores negativos (RN) de respuesta a estrés originado por la sequía y la salinidad. Por ejemplo, el gen *OsRFP1* (“*Orzya sativa* Stress-related RING Finger Protein 1”), se expresa tanto en raíces como en hojas de arroz bajo condiciones de estrés salino y codifica para una ubiquitin ligasa E3 que al sobreexpresarse en arroz produce sensibilidad a estrés salino (Fang y col. 2015) por lo que se convierte en un candidato ideal a estudiar y editar.

Así mismo, el gen *OsiSAP7* actúa como un regulador negativo de la señalización de estrés por ABA y confiere sensibilidad al estrés por déficit de agua. En un estudio de Sharma y colaboradores del 2015 se vio que la sobreexpresión de este gen en plantas

de *Arabidopsis* resultó en una insensibilidad al tratamiento con ABA en la etapa de germinación de las semillas y una mayor sensibilidad al estrés por déficit de agua en etapas posteriores del desarrollo, esto debido a que el ácido abscísico (ABA) regula la expresión de varios genes requeridos para tolerar al estrés. Algunos de los genes que se sabe que responden al ABA incluyen a los *ABF3* y *ABF4* (Figura 1). Estos genes codifican para factores de transcripción bZIP (proteínas de unión a elementos de respuesta de proteínas básicas) que se activan en respuesta al ABA y se unen a elementos de respuesta al ABA (*ABREs*) en los promotores de genes necesarios para conferir tolerancia a estrés salino e hídrico como acuaporinas, proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (late embryogenesis abundant, LEA, por sus siglas del inglés), etc. (Peleg y col. 2011).

El mecanismo de acción de *SAP7* aún no se comprende completamente. Sin embargo, se ha observado que *OsiSAP7* regula negativamente la expresión de genes que responden al estrés tal como lo muestra la Figura 1.

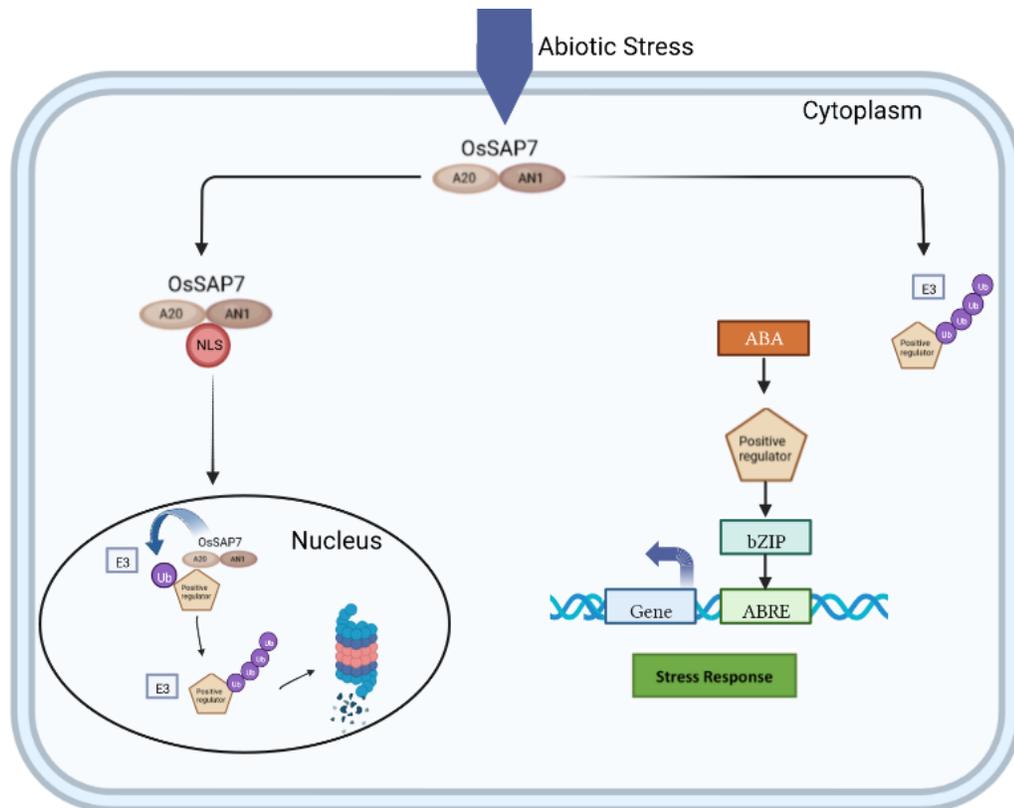


Figura 1. Señalización de estrés abiótico mediada por *OsSAP7*. Bajo condiciones no estresadas y estresadas, *OsSAP7* media la ubiquitinación de reguladores positivos del estrés abiótico, como los factores de transcripción inducidos por ABA, ABFs. *OsSAP7* está compuesto por dominios A20 y AN1 requeridos para la ubiquitinación, y el NLS para la localización nuclear. El dominio AN1 permite tanto la localización nuclear como citoplasmática. Adaptado de Giri y col. 2015.

Por todo lo expuesto, resulta fundamental buscar estrategias moleculares para proteger y potenciar cultivos importantes en Chile, como el kiwi, frente al inminente aumento de la sequía y salinidad producto del cambio climático.

Por lo cual, nos preguntamos si, ¿el desarrollo de una estrategia Biotecnológica basada en la edición de genes que codifican para RN de estrés salino e hídrico en

Kiwi, variedad *Hayward* (*Actinidia deliciosa*) mejoraría la respuesta a estos tipos de estrés?

Para ello sería fundamental la identificación y selección de genes que codifican para RN de estrés salino e hídrico en Kiwi, variedad *Hayward* (*Actinidia deliciosa*) y su caracterización funcional.

La estrategia Biotecnológica basada en la búsqueda e identificación permitirían una futura edición de genes que codifican para reguladores negativos de estrés salino e hídrico en Kiwi, variedad *Hayward* (*Actinidia deliciosa*).

1.1 Hipótesis

El genoma de kiwi variedad *Hayward* (*Actinidia deliciosa*) posee genes parálogos a reguladores negativos de estrés salino e hídrico en plantas que se expresan bajo estas condiciones de estrés abiótico.

1.2 Objetivo General

Identificación y selección de genes parálogos a reguladores negativos de estrés salino e hídrico en Kiwi, variedad *Hayward* (*Actinidia deliciosa*) y su evaluación de expresión génica bajo estas codiciones.

1.3 Objetivos Específicos

OE1: Identificar y seleccionar genes parálogos candidatos a reguladores negativos de la tolerancia a estrés salino e hídrico en *Actinidia deliciosa* (Kiwi) var. *Hayward*.

OE2: Determinar el nivel de expresión relativa de los genes seleccionados en plantas de Kiwi *Hayward* sometidas a estrés salino e hídrico.

OE3: Obtener plantas de *Nicotiana tabacum* transgénicas para un gen candidato a regulador negativo de Kiwi *Hayward* que se exprese significativamente en estrés salino e hídrico.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Reactivos: Se utilizaron reactivos adquiridos de empresas líderes y marcas reconocidas, tales como Invitrogen, Agilent Technologies, Fermentas, Promega, Axygen, Biorad, FAVORGEN Biotech Corporation, Merck, Takara Bio y Sigma-Aldrich.

Cepas bacterianas: *Escherichia coli* quimiocompetentes Mach1TM-T1^R, de genotipo: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *hsdR*(r_k⁻,m_k⁺) Δ *recA1398* *endA1* *tonA* (confiere resistencia al fago T1) (Invitrogen) y *Agrobacterium tumefaciens* con el genotipo GV3101: C58, plásmido Ti, GenR, RifR, respectivamente.

2.2 Análisis bioinformáticos

Se realizó búsqueda bibliográfica de RN caracterizados funcionalmente a través del buscador en bases de datos de proteínas del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos. Posteriormente, se utilizó la herramienta de BLAST (tblastn y blastp) para buscar secuencias homólogas en el genoma de *Actinidia chinensis* cultivar Red5; seleccionando los alineamientos con una identidad y cobertura mayor al 40%, respectivamente.

Además, se realizaron análisis filogenéticos de aquellas secuencias nucleotídicas que codifican para una proteína perteneciente a la misma familia que el query en www.phylogeny.fr en el modo "One Click" para identificar las secuencias que mostraran una mayor homología evolutiva. Además, las secuencias seleccionadas se sometieron a un alineamiento múltiple utilizando la herramienta Clustal Omega disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo para identificar la conservación de los dominios de la proteína de referencia.

2.3 Diseño de partidores

Todos los partidores fueron diseñados utilizando las herramientas bioinformáticas SnapGene y Primer3Plus. El análisis de los partidores diseñados se realizó mediante la herramienta bioinformática Geneious Prime, la cual permitió corroborar la temperatura de disociación y descartar la presencia de homo y heterodímeros.

2.4 Métodos de cultivo y transformación

2.4.1 Cultivo de cepas bacterianas

Para el cultivo de *E. coli* en medio líquido, se introdujeron células de *E. coli* Mach1 (Invitrogen) transformados en una solución de LB líquido (que contenía Triptona al 2% p/v, NaCl al 0.8% p/v y Extracto de levadura al 0.5% p/v), agregando el antibiótico de selección correspondiente según la resistencia requerida por los vectores empleados en la transformación celular. La incubación del cultivo se llevó a cabo a 37 °C bajo

agitación durante 16 horas. Por otro lado, para los cultivos en medio sólido de *E. coli*, se sembraron las células en placas Petri conteniendo medio LB sólido (LB líquido y Agar-agar al 6%), suplementándolo con el antibiótico de selección adecuado. Posteriormente, las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C.

Para el caso de *A. tumefaciens*, se añadieron células transformadas de *A. tumefaciens* en medio LB líquido suplementado con rifampicina a una concentración de 20 mg/L, gentamicina a una concentración de 50 mg/L, y el antibiótico específico requerido por el plásmido de interés. El cultivo líquido se mantuvo en agitación a una temperatura de 28 °C durante 20 horas. Del mismo modo, los cultivos sólidos de *A. tumefaciens* se realizaron en placas Petri con medio LB sólido suplementado con los antibióticos mencionados. Las placas se incubaron a 28 °C durante 48 horas. Para preservar las muestras tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens*, se prepararon alícuotas de los cultivos líquidos mezclando 500 µL del cultivo con 300 µL de glicerol estéril al 80%, las que se almacenaron a -80 °C.

2.4.2 Transformación de células bacterianas quimiocompetentes

La transformación de células de *E. coli* y de *A. tumefaciens* competentes se llevó a cabo mediante semipermeabilización de su membrana a través de un golpe térmico. Una alícuota de 50 µL de células de *E. coli* Mach1 se mezclaron con 6 µL de una reacción de ligación en pCR®8 (sección 2.4.4) o 10 µL de una reacción de recombinación en pGWB5 (sección 2.4.8). La muestra se incubó durante 30 minutos en hielo y luego durante 45 seg a 42°C. Posteriormente, se depositó en hielo y luego de 2 minutos se mezcló con 250 µL de LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37°C en

agitación a 200 rpm. Una alícuota de 50 µL fue luego sembrada en una placa de LB sólido (Tryptona 1% p/v, Extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,8% p/v, Agar-agar 1,6 % p/v) suplementada con el antibiótico de selección adecuado (Tabla 1) e incubada durante 12-16 horas en una estufa a 37°C.

Para la transformación de *A. tumefaciens*, se utilizó una alícuota de células competentes de 100 µL que fue descongelada en hielo y luego mezclada con 300-500 ng del vector de interés. Posteriormente, esta mezcla se sometió a un golpe de frío sumergiéndola en N₂ líquido durante 5 minutos, seguido de un descongelamiento a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, la mezcla se incubó en 1 mL de LB líquido a 28°C durante 6 horas. Luego, la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 6000 g, se eliminó el sobrenadante y el precipitado de células se resuspendió en 100 µL de medio LB líquido. Las células resuspendidas se sembraron en una placa Petri con medio LB sólido suplementado con Rifampicina a 10 mg/L, Gentamicina a 50 mg/L y el antibiótico de selección del vector incorporado (según se indica en la Tabla I). Las placas se incubaron a 28°C durante 36-48 horas para permitir el crecimiento y la selección de las células transformadas.

2.4.3 Obtención de secuencia codificante de *AdSAP7*

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los partidores *AdSap7_clon F* (5'- CAGAAAAACCCAAAAAGAAATGTG -3') y *AdSap7_clon R* (5'- GCCTGATAGTCACCTGTTTCGTTGC -3'), diseñados en (2.3) a partir de ADNc de hojas de Kiwi (obtenido en la sección 2.7.4), con la enzima Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB). Las cantidades usadas para amplificar la banda son descritas en la

Tabla 2. Luego, se realizó una PCR a la temperatura óptima obtenida, cuyo perfil térmico se detalla en la tabla 6.1.

El producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.9) para resolver el tamaño del amplicón. La banda correspondiente a ≈ 500 pb fue cortada del gel utilizando un bisturí para su purificación. Se utilizó el kit Wizard SV Gel Cleaning System (Omega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanovue (GE Healthcare & Electronics) con una muestra de 2 μ L, utilizando agua como blanco de referencia.

2.4.4 Clonamiento del gen *AdSAP7* en el vector pCR8

La clonación en vectores de entrada, como pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen), permite amplificar y secuenciar fragmentos específicos de genes de interés para su posterior clonación en el vector de destino. En este estudio, se clonó la región codificante (504 ob) del gen *AdSAP7* en pCR[®]8/GW/TOPO[®] el cual cuenta con la enzima Topoisomerasa I covalentemente unida en la secuencia CCCTT del vector. Esto permite la inserción de los productos de PCR que poseen una adenosina libre en cada extremo. Por otro lado, el vector posee el gen SpnR, que confiere resistencia al antibiótico espectinomomicina. Asimismo, cuenta con las áreas attL1 y attL2, las cuales flanquean la región de duplicación en ambos lados (Figura 2). Estas áreas attL1 y attL2 son clave para transferir los fragmentos duplicados presentes en este vector a diferentes vectores de destino mediante la tecnología Gateway[®] (Parr y col. 2003), la cual se basa en la recombinación homóloga.

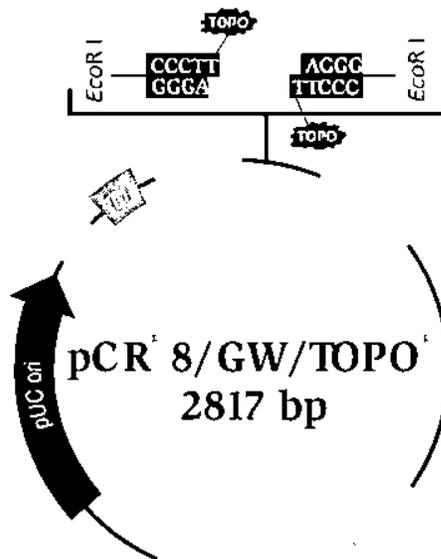


Figura 2. Esquema de vector pCR®8.

Antes de clonar, se realizó una adición de adenilatos con Taq polimerasa en el extremo 3' al ADN purificado desde la banda de agarosa. Esto permitió la ligación al vector pCR8/GW/TOPO, que posee T sobresalientes. Es así como 250 ng del producto de PCR purificado fueron usados en la mezcla de reacción detallada en la tabla 3, la cual se preparó dentro de un tubo de 0,2 mL. Esta mezcla de reacción se incubó a 72°C por 30 minutos en termociclador. Posteriormente, para la clonación del fragmento de interés en el vector de entrada pCR®8, el producto de PCR con adenilatos en 3' se mezcló con 50 ng del vector de entrada pCR®8 y 1 µL de una solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M) en una mezcla de ligación de 6 µL totales. La mezcla de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, tras lo cual fue transformada en células de *E. coli* Mach1 quimiocompetentes (sección 2.4.2)

2.4.5 Extracción de ADN plasmidial mediante EZNA Mini Kit

Se tomaron colonias al azar desde placas LB (sección 2.4.2) utilizando una punta estéril las que fueron depositadas dentro de tubos de 15 mL conteniendo medio LB líquido y el agente de selección correspondiente. Los tubos se incubaron a 37°C con agitación constante durante 16 horas. Después de este periodo, se retiró la punta con una pinza y las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se extrajo el ADN plasmidial (ADNp) con el kit E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (OMEGA bio-tek), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se determinó la concentración de ADNp utilizando un espectrofotómetro Nanovue (GEHealthcare & Electronics), utilizando 2 µL de muestra y agua como referencia en blanco.

2.4.6 Verificación del inserto y su direccionalidad mediante digestión enzimática del ADN plasmidial

Se realizó la liberación y verificación del tamaño del inserto mediante una digestión enzimática utilizando la enzima de restricción EcoRI (Thermoscientific) y con la enzima Avall (Thermoscientific) para verificar la direccionalidad. Las mezclas de reacción se describen en la Tabla 4. Los tubos se incubaron a 37°C durante 3 horas, y el producto de la digestión se resolvió mediante electroforesis en gel agarosa al 1.5%.

2.4.7 Secuenciación del vector pCR8-AdSap7

Para llevar a cabo la secuenciación de las muestras, se extrajeron 15 µL de ADN plasmídico de las colonias seleccionadas, con una concentración comprendida entre

80 y 200 ng/μL. Estas muestras se enviaron al Centro de Secuenciación Automática de ADN de la Pontificia Universidad Católica, utilizando los partidores universales M13F y M13R-PUC que se encuentran en el vector pCR8. La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador ABI PRISM 3100. Posteriormente, los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Snapgene.

2.4.8 Clonación de fragmento de interés en el vector de destinación pGWB5: Recombinación por tecnología Gateway®

En la Figura 3 se muestra que el vector pGWB5 contiene los sitios de recombinación attR1 y attR2 que flanquean el gen letal de selección *ccdb*, situado río arriba del gen reportero *gfp*. Estos elementos se encuentran dentro de los bordes LB y RB, los cuales delimitan la región que se insertará en el genoma de las plantas de interés. Dentro de estos bordes, también se encuentra el gen *hptII*, responsable de la resistencia a la Higromicina en plantas, mientras que el gen *nptII*, ubicado fuera de los bordes, confiere resistencia a Kanamicina en bacterias (Figura 3A). La presencia de los sitios de recombinación en este vector permite reemplazar el gen letal *ccdb* por el gen *SAP7* clonado previamente en pCR®8, generando la construcción AdSap7::*gfp*.

La tecnología Gateway® se basa en la recombinación sitio-específica del fago λ (Hartley y col. 2000), utilizando secuencias de recombinación homólogas presentes tanto en el vector de entrada (attL1 y attL2) como en el vector de destino (attR1 y attR2). El fragmento se clona en el vector de entrada entre los sitios attL y debe estar en la orientación correcta con respecto a attL1. Como se muestra en la figura 3B, las regiones attL1 y attL2 del vector de entrada se recombinan específicamente con las regiones attR1 y attR2, respectivamente, lo que permite reemplazar el gen letal *ccdb*

por el fragmento de interés contenido en el vector de entrada pCR®8. Después de la recombinación, las zonas de recombinación en el vector de expresión se denominan attB1 y attB2, respectivamente.

La recombinación se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 10 µL que contenía aproximadamente 150 ng del vector **pCR8-AdSap7** (en 1-7 µL), aproximadamente 300 ng del vector de destino (en 1 µL), 2 µL de la enzima LR Clonasa™ II y buffer TE para completar los 10 µL, con un pH de 8. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La enzima LR Clonasa es una integrasa capaz de realizar la recombinación entre las regiones attL1 y attR1, así como entre las regiones attL2 y attR2, mediante un mecanismo de corte y ligadura de las hebras. Posteriormente, se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* tal y como se describe en el punto 2.4.2, dejándolas crecer en medio LB sólido suplementado con kanamicina 50 mg/L por 16 horas. Luego se analizaron colonias transformantes de cada vector mediante PCR de colonias (sección 2.8.2). Aquellas que resultaron positivas se les extrajo ADN plasmidial (sección 2.4.5), obteniendo el vector pSAP7: GFP.

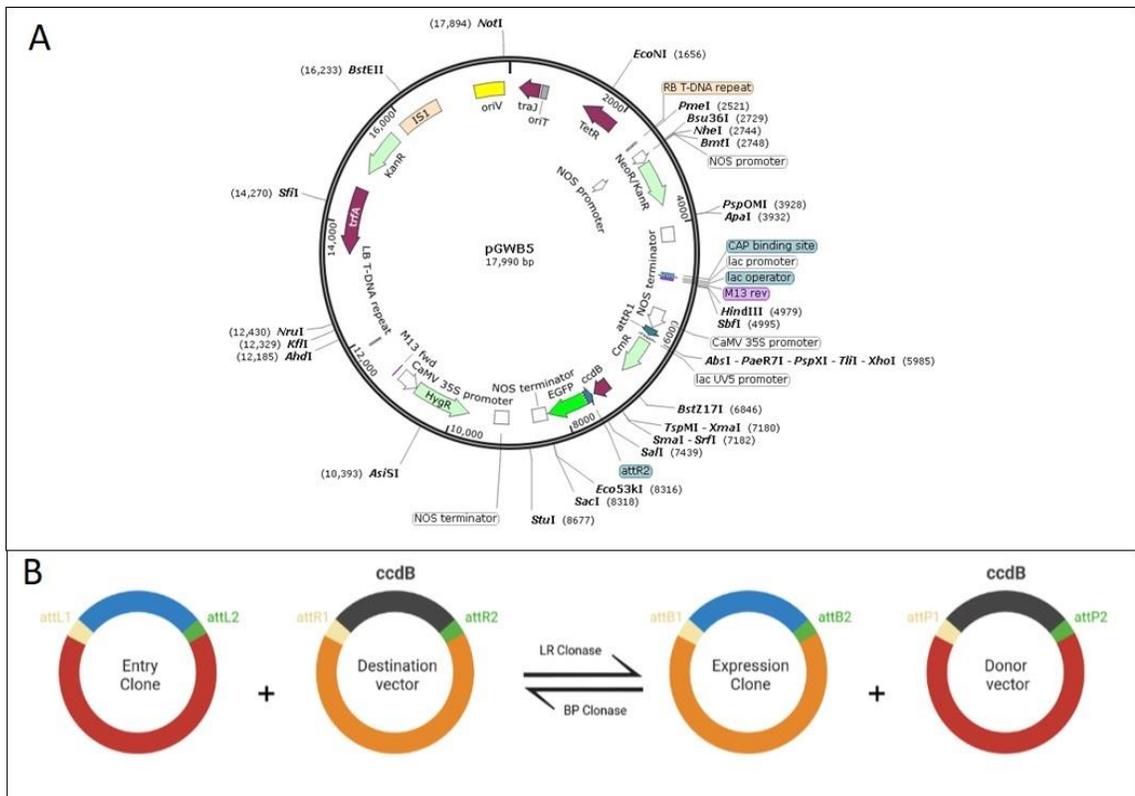


Figura 3. vector usado en este trabajo y recombinación Gateway. A: Vector pGWB5. B: esquema de la recombinación. La enzima LR clonasa permite el intercambio del inserto desde el vector de entrada hacia el vector de expresión, generando el clon de expresión y un subproducto.

2.4.9 Preparación del cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* cepa GV3101 para la transformación de plantas de tabaco

Se dejó creciendo un precultivo de *A. tumefaciens* GV3101 transformada previamente con el vector pSAP7: GFP (sección 2.4.2) en 5 mL de LB líquido suplementado con Rifampicina (10 mg/L), Gentamicina (50 mg/L) y Kanamicina (100 mg/L) a 28°C en agitación constante durante 12 horas. Luego, se tomaron 200 µL del precultivo para inocular 30 mL de medio LB líquido suplementado con los antibióticos Rifampicina (10 mg/L), Gentamicina (50 mg/L) y Kanamicina (100 mg/L). El cultivo se dejó creciendo a

28°C en agitación constante durante 12 horas o hasta alcanzar una D.O.600 de 0,4-0,8. Luego, el cultivo se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos. El precipitado se resuspendió en medio MS líquido (Medio MS con vitaminas 0,44 %, sacarosa 2%, myo-inositol 0,01%, pH: 5,8) suplementado con acetosiringona a 200 µM.

2.5 Cultivos y transformaciones vegetales

2.5.1 Cultivo in vitro de *Actinidia deliciosa*

Debido a la escasez de material *in vitro* de *Actinidia deliciosa* silvestre (WT), se procedió a realizar la multiplicación de brotes a partir de este material. Los brotes fueron cultivados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido con vitaminas (MS 4,4 gr/L, sacarosa al 2%, myo-inositol al 0,01% y agar-agar al 0,7%, ajustando el pH a 5,8). Además, se añadió 6-Benzylaminopurina (BAP) a una concentración de 0,5 mg/L para estimular el crecimiento (MIII, Tabla 5). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 22°C y se expusieron a un ciclo de luz de 16 horas por tres semanas. Pasado este tiempo, las plántulas se utilizaron en el ensayo de estrés por sequía y salinidad.

2.5.2 Cultivo, transformación y organogénesis somática de *Nicotiana tabacum*

La transformación de tabaco se realizó utilizando explantes (hojas completas) provenientes de plántulas cultivadas *in vitro*. Para ello, las semillas de tabaco se esterilizaron en hipoclorito de sodio (2,6%) con 3 gotas de Tween 20, bajo una cámara

de flujo laminar, manteniendo una agitación constante durante 10 min. Luego, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y se sembraron en frascos con medio MS sólido. Los frascos fueron mantenidos bajo fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas oscuridad, durante un mes aproximadamente, hasta que aparecieron las primeras hojas verdaderas.

Para la transformación se tomaron explantes de hojas de 1.5 cm² aproximadamente, se cortaron e incubaron durante 10 minutos con una suspensión de *A. tumefaciens* cepa GV3101 (2.4.9) previamente transformada con el vector pSAP7: GFP. Luego, las hojas fueron secadas con papel absorbente estéril y se depositaron en placas de MS sólido, que fueron incubadas en oscuridad durante 2 días, para que la bacteria lograra infectar las células de la planta. Después, los explantes fueron lavados con agua destilada estéril suplementado con PPM (0,09% v/v) y Timentin (300mg/), secadas con papel absorbente estéril y finalmente depositadas en placas Petri con Medio Nt. I (Tabla 5). Luego de 3-4 semanas de cultivo a 22°C y fotoperíodo de 16 horas luz, aparecieron pequeñas plántulas las que fueron transferidos a Medio Nt. II (Tabla 5), donde se mantuvieron entre 2-4 semanas más, para permitir su elongación y desarrollo. Finalmente, plántulas de entre 1 y 5 cm de longitud fueron transferidas a frascos con Medio Nt.III (Tabla 5) para permitir su elongación y enraizamiento.

2.5.3 Localización subcelular mediante transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*

Para llevar a cabo la transformación transitoria de tabaco, se seleccionaron plantas adultas de *N. tabacum* wt cultivadas en tierra. Las construcciones de interés pSAP7:

GFP, 35S: GFP y pPIF3: GFP se introdujeron en suspensiones de *A. tumefaciens* (sección 2.4.2) y se realizaron las infiltraciones en las hojas mediante el anverso de cada una de ellas (Moreno y col. 2013). Previamente, se asperjó agua sobre las hojas para facilitar la apertura de las estomas. Se utilizó una jeringa de 5 mL sin aguja y se aplicó una presión suave y firme para asegurar la infiltración de una amplia región de la hoja. Estas infiltraciones se llevaron a cabo en medio MS líquido (sección 2.3.9). Luego de 3-4 días se observó fluorescencia GFP bajo Microscopio confocal (sección 2.10).

2.6 Ensayos de estrés por sequía y salinidad de plántulas de *A. deliciosa*

Se sometieron plántulas silvestres de *A. deliciosa in vitro* de 2 meses de edad (5-7 cm) a estrés por salinidad mediante un tratamiento agudo en medio MS sólido suplementado con NaCl 200mM (Chartzoulakis y col. 1995) durante 0, 6, 24 y 48 horas. Se utilizaron 9 plántulas para cada tiempo, distribuidas en 3 frascos, y el tiempo 0 se utilizó como control sin NaCl. Para simular condiciones de sequía, se repitió la metodología anterior utilizando medio MS líquido suplementado de polietilenglicol 6000 (PEG) al 20% p/v. Al finalizar cada tratamiento, se recolectó tejido foliar de las plántulas en triplicado. Posteriormente, se extrajo ARN total (Sección 2.7.2) y se sintetizó ADNc (Sección 2.7.4) para determinar los niveles relativos de transcripción de los genes *AdSAP7*, *AdACS6*, *AdSARP1* y *AdSRFP1* bajo las condiciones de tratamiento (Figura 4).

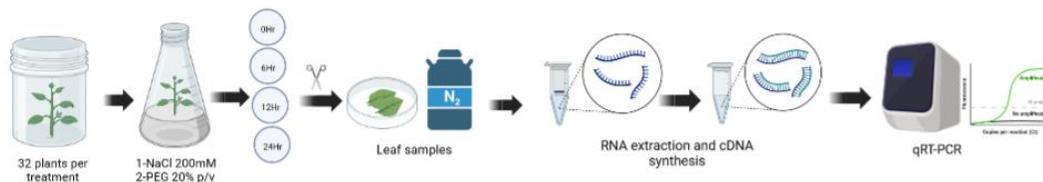


Figura 4. Esquema de ensayo de estrés agudo por salinidad y sequía en kiwi Hw y análisis de niveles de expresión relativa de los genes *AdSAP7*, *AdACS6*, *AdSARP1* y *AdSRFP1*.

2.7 Extracción de ácidos nucleicos

2.7.1 Extracción de ADN genómico

La obtención de ADN genómico a partir de hojas de *N. tabacum* y *A. deliciosa* se llevó a cabo utilizando el procedimiento basado en el protocolo descrito por Doyle y Doyle, 1990 con algunas modificaciones y simplificaciones. Se emplearon alrededor de 50 mg de tejido vegetal, que se trituraron con nitrógeno líquido en morteros esterilizados y enfriados previamente. Posteriormente, se añadieron 2 mL de un tampón de extracción CTAB (Bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, PVP40 1% y Tris 100 mM pH 8), precalentado a 60°C, y se homogeneizó la muestra. El homogenizado se incubó a 60°C durante 15 min, con agitación periódica cada 5 min. A continuación, se agregó una solución fría de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló brevemente en un vortex y se centrifugó a 10.000 g durante 10 min. La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo limpio y se precipitó con isopropanol frío durante 30 min a -20°C. Tras centrifugar a 10.000 g durante 10 min, el precipitado se lavó con etanol 75%. Finalmente, el ADN seco se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas, luego de ser centrifugado a

10000 g durante 5 min. Luego, el ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría en Nanovue a A260/A280 (para evaluar la contaminación por proteínas en la muestra) y A260/A230 (para evaluar la contaminación por polisacáridos y polifenoles).

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

Se utilizó el kit FavorPrep™ Plant Total RNA Mini para el aislamiento del ARN total. Se molieron 100 gramos de tejido foliar en un mortero previamente congelado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Luego, se añadió cuidadosamente nitrógeno líquido al polvo y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 µL, que se colocó inmediatamente sobre hielo y se cerró ligeramente la tapa para evitar la pérdida de polvo. Posteriormente, se añadieron 500 µL de Buffer FARB-1 y 10 µL de b-mercaptoetanol al tubo, y se aplicó una agitación vigorosa durante 20 segundos. A continuación, se agregaron 50 µL de Buffer FARB-2 y se incubó la muestra a 70°C con agitación durante 10 minutos. Después de centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 µL sin transferir el sedimento del fondo. Se añadió un 0,9% del volumen de etanol (360 µL) al tubo, y luego se transfirió el líquido a una mini columna para su purificación mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Este proceso de lavado se repitió dos veces más, utilizando Wash Buffer 1 y Wash Buffer 2, respectivamente. Después de la centrifugación final a 14.000 rpm durante 3 minutos a 4°C, la mini columna se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 µL, y se agregaron 25 µL de buffer de elución (RNase-free ddH₂O) en el centro de la mini columna, permitiendo que reposara durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos a 4°C, repitiendo este paso una vez más. Finalmente, la elución final

de ARN (50 μ L) se almacenó a -80°C . Para evaluar la calidad y cantidad de ARN total, se utilizó el espectrofotómetro EPOCH 2 de Biotek®. Se determinó la presencia de contaminantes mediante el cálculo de los cocientes de absorción A260/A280 y A260/A230. Se consideró que, para obtener una muestra de ARN total de óptima calidad para futuros estudios moleculares, ambos cocientes deberían aproximarse a 2.

2.7.3 Tratamiento del RNA total con DNasa I

Las muestras de ARN total, previamente cuantificadas y evaluadas en cuanto a su pureza, fueron tratadas con DNasa I antes de realizar la técnica de RT-PCR con el fin de eliminar cualquier posible contaminación de ADN genómico. Para ello, se utilizaron 3 μ g de ARN total y se añadieron 50 U de DNasa I (Fermentas), 1 μ L de inhibidor de RNasa (Fermentas) y 2 μ L de buffer de DNasa/MgCl₂ 10X (Fermentas) en un volumen total de 20 μ L. En caso necesario, se completó el volumen con agua DEPC. La mezcla se incubó a 37°C durante 40 minutos en un baño termorregulado. Al finalizar, se transfirió rápidamente a hielo y se agregó 1 μ L de EDTA (50 mM) para detener la reacción. A continuación, se inactivó la reacción mediante una incubación de 15 minutos a 70°C .

2.7.4 Síntesis de ADNc

Para llevar a cabo la síntesis del ADNc, se empleó el sistema ImProm-II Reverse Transcription (Promega). Se tomaron 9.5 μ L de ARN total previamente tratado con DNasa I (Sección 2.7.3) y se mezclaron con 1.5 μ L del partidor Oligo-AP 10 μ M (5'-CGCCACGCGTCTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') en un tubo de 0.6 mL.

Cada muestra se incubó a 70°C durante 5 minutos. Posteriormente, se detuvo el programa, se colocaron los tubos en hielo y se añadieron 4 µL de agua grado de biología molecular (HyClone™) y 1.5 µL de la enzima de transcriptasa reversa ImProm-II a la mezcla de transcripción reversa. La mezcla de transcripción reversa constaba de 5 µL de buffer ImProm-II 5X, 1 µL de inhibidor de RNasa (Fermentas), 1 µL de MgCl₂ 50 mM y 1.5 µL de dNTPs 10 µM, completando un volumen total de 25 µL. A continuación, los tubos se colocaron nuevamente en el termociclador y se siguió el programa de Transcripción Reversa (Tabla 6.2). Finalmente, se obtuvieron 25 µL de cada ADNc, los cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

2.8 PCR y qRT-PCR

2.8.1 PCR Convencional utilizando ADNg o ADNc como molde

Para confirmar la integridad del ADNg (Sección 2.7.1) o ADNc obtenido (Sección 2.7.4), se amplificó mediante PCR un fragmento del gen RNA ribosomal 18S utilizando los partidores diseñados para *A. deliciosa*. En este trabajo, se llevaron a cabo las reacciones de PCR utilizando diferentes enzimas de polimerasa. Para las reacciones que emplearon Taq ADN polimerasa (Invitrogen), se realizaron en un volumen total de 25 µL, incluyendo 1 U de Taq ADN polimerasa, 2.5 µL del correspondiente buffer, 0.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de los partidores sentido y antisentido específicos para cada gen (10 µM), y agua libre de nucleasas (HyClone™). En el caso de las reacciones con SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara), se realizaron en un volumen total de 20 µL utilizando agua libre de nucleasas (HyClone™). En todas las reacciones, se

agregó 1 μL de ADNg o ADNc como molde. Se incluyeron controles negativos sin molde y controles positivos específicos para cada ensayo, asegurando así la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos en este estudio.

2.8.2 PCR de colonias bacterianas

Con el objetivo de verificar preliminarmente si las colonias de *E. coli* y *A. tumefaciens* transformadas con el vector de interés contenían el inserto deseado, se llevaron a cabo reacciones de PCR directamente en las colonias crecidas en placas de Petri tras la transformación. Para ello, se utilizó una punta de micropipeta estéril para tomar una colonia y se suspendió en un tubo Eppendorf de 0.2 mL que contenía 25 μL de la misma mezcla de reacción utilizada en el PCR convencional (Sección 2.8.1). Asimismo, se tomó nuevamente la misma colonia y se rayó en una placa Petri que contenía medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente para permitir la propagación de la colonia. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa (Sección 2.9). Aquellas colonias que mostraron resultados positivos en el gel fueron seleccionadas para futuros estudios y análisis adicionales.

2.8.3 RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR)

Para cuantificar los niveles de relativos de transcrito de los genes de interés se realizó un RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR). Para llevar a cabo la reacción se utilizaron 6,5 μL del Kit Forget-Me-Not EvaGreen qPCR Master Mix 2X (Biotium, USA), 0,2 μL de partidor forward, 0,2 μL de partidor reverse, 2,1 μL de agua libre de

nucleasas y 4 μ L de templado (10-40 ng de ADNc), sumando un total de 13 μ L por reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Mx300PTM (Stratagene) siguiendo las condiciones térmicas específicas para la enzima (Tabla 6.4). La cuantificación de la expresión de los genes se llevó a cabo con tres replicas biológicas, correspondientes al triplicado de muestra de cada tiempo. Cada replica biológica se analizó por duplicado (replica técnica). Para calcular la eficiencia de los partidores y la expresión relativa de los genes estudiados, se utilizaron las ecuaciones descritas por Pfaff et al. (2001). La eficiencia se calculó mediante una dilución seriada de ADNc que fue amplificada mediante qRT-PCR utilizando partidores diseñados para amplificar un fragmento de 100 pb a 200 pb del gen objetivo. Se emplearon partidores específicos para cada gen, cuyos detalles se encuentran en la Tabla 7. A continuación, se generó un gráfico que mostraba los ciclos de amplificación (Ct) en función de la dilución de ADNc utilizada. Los puntos se conectaron mediante una línea de tendencia lineal y se determinó la pendiente de la línea. Esta pendiente se utilizó en la siguiente fórmula, donde "E" representa la eficiencia del partidor:

$$E = 10^{-1/\text{pendiente}}$$

Para determinar los niveles de expresión relativa se aplicó la ecuación propuesta por Pfaffl et al. (2001). En esta ecuación, "E" representa la expresión relativa, "Ct" corresponde a los ciclos de amplificación obtenidos para el gen de interés (gen blanco). Se utilizó un gen normalizador (o housekeeping) que exhibe una expresión constante e independiente del tratamiento aplicado. La condición calibradora se utilizó como referencia en la comparación de expresiones relativas.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E \text{ gen blanco})^{\Delta Ct (Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ calibrador})}}{(E \text{ gen normalizador})^{\Delta Ct (Ct \text{ gen normalizador} - Ct \text{ calibrador})}}$$

Para analizar la expresión de los genes candidatos, se llevó a cabo una comparación inicial entre el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y la *Actina 2*. Esta comparación se realizó utilizando la plataforma RefFinder (<http://blooge.cn/RefFinder/?type=reference>), que incorpora los parámetros de los principales programas bioinformáticos como geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo Δ -Ct. El objetivo fue determinar el gen normalizador más adecuado. Además, se utilizó la expresión en la línea silvestre (Wt) como condición calibradora para el análisis de expresión.

2.9 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa con una concentración de 1% a 1.5%. Se empleó un marcador de peso molecular como Gene Ruler 1Kb o 100pb (Fermentas) para determinar el tamaño de las bandas. Los geles fueron preparados utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) como disolvente de agarosa. Las muestras se mezclaron con buffer de carga en una proporción de 5:1 antes de cargarlas en el gel. La electroforesis se realizó con una diferencia de potencial de 90V a 110V durante 50 a 60 minutos, dependiendo del tamaño esperado de las bandas. Posteriormente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 15 minutos, y se visualizaron utilizando un transiluminador UV (como el

GeneGenius Classic de SynGene). Las imágenes se capturaron utilizando el software GenSnap.

2.10 Microscopía

Se llevó a cabo una visualización detallada de la fluorescencia de GFP en las muestras agroinfiltradas (sección 2.5.3). Para ello, se recolectaron cuidadosamente muestras de la epidermis de las hojas de tabaco, las que fueron montadas en portaobjetos. Luego, se utilizó un microscopio confocal marca Zeiss modelo 710 y un objetivo de aumento de 200 veces (objetivo 20x) para examinar las muestras. Se aplicó una longitud de onda de excitación específica, entre 488 y 498 nm, para resaltar la fluorescencia de GFP.

2.11 Análisis de transgenia (genotipificación de plantas)

Con el objetivo de genotipificar las plantas de tabaco regeneradas (sección 2.5.2), se amplificó gen de resistencia a la Higromicina mediante partidores específicos (Tabla 7) La amplificación mediante PCR se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.8.1.

Tabla 1: Resistencia a antibiótico de los vectores usados en este trabajo

Vector	Gen de resistencia en bacterias	Antibiótico al que resiste en bacterias	Gen de resistencia en plantas	Antibiótico al que resiste en plantas
pCR [®] 8	<i>Spn^R</i>	Espectinomicina	No aplica	No aplica
pGWB5	<i>nptII</i>	Kanamicina	<i>hptII</i>	Higromicina

Tabla 2: Mezcla de reacción usada para amplificar el ADNc de *AdSAP7*

Agua Destilada Nanopura	28,5 µL
Buffer de Reacción Q5 [®]	10 µL
dNTPS (10 µM)	1 µL
SAP7_ClonF (2.5 µM)	2,5 µL
SAP7_ClonR (2.5 µM)	2,5 µL
ADNc (≈ 60 ng/µL)	5 µL
Q5 [®] (NEB)	0,5 µL

Tabla 3: Mezcla de reacción para adición de adeninas a un fragmento amplificado por PCR

Buffer Taq 10X (Promega)	2 µL
dATP (10 mM)	0,4 µL
Taq polimerasa (Promega)	0,2 µL
Producto de PCR	250 ng
Agua destilada	Ajustar volumen final a 20 µL incubar x tiempo

Tabla 4: Mezclas de reacción para las digestiones enzimáticas

Digestión EcoRI	
Agua destilada	Hasta un volumen final de 20 μ L
Buffer EcoRI (10X, Thermofisher)	2 μ L
ADN plasmidial	500 ng
EcoRI	1 μ L
Digestión Avall	
Agua destilada	Hasta un volumen final de 20 μ L
Buffer T (10X, Thermofisher)	2
ADN plasmidial	500 ng
Avall	1 μ L

Tabla 5: Medios de cultivo de plantas de kiwi (A.d) y tabaco (N.t)

Medio	Higromicina (mg/L)	2,4-D (mg/L)	IBA (mg/L)	BAP (mg/L)	Timentin (mg/L)
Kiwi M III	---	---	---	0,5	---
Tabaco Nt.I	10	---	1	5	300
Tabaco Nt.II	15	---	---	---	150-300
Tabaco Nt.III	15	---	---	---	150-300

* Ácido 2,4-diclorofenoxiacético; **IBA: Ácido indolbutírico; ***BAP: 6-Benzylaminopurine

Tabla 6: Programas de PCR1: Perfil térmico para la amplificación del gen *AdSAP7* con Q5®

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	98°C/ 30 seg.	98°C/ 5 seg.	72°C/2 min.
Paso 2	--	67°C/10 seg.	--
Paso 3	--	72°C/20 seg.	--
N° de ciclos	1	35	1

2: Transcripción Reversa (RT)

	Segmento 1	Segmento 2
Paso 1	70°C/ 5 min.	42°C/ 60 min.
Paso 2	25°C/ 5 min.	70°C/ 15 min.
N° de ciclos	1	1

3: PCR de colonias

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	94°C/ 5 min.	94°C/ 1 min.	72°C/8 min.
Paso 2	--	T°A/45 seg.	--
Paso 3	--	72°C/30seg-2 min.	--
N° de ciclos	1	35	1

4: qRT-PCR

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	95°C/ 3 min.	95°C/10 seg.	95°C/1 min.
Paso 2	--	60°C/ 20 seg.	60°C/ 30 seg.
Paso 3	--	--	95°C/ 30 seg.
N° de ciclos	1	40	1

5: PCR convencional

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	94°C/ 3-5 min.	94°C/ 45 seg.	72°C/8 min.
Paso 2	--	T°A/45 seg.	--
Paso 3	--	72°C/30seg-2 min	--
N° de ciclos	1	35	1

Tabla 7: Partidores utilizados durante este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Descripción
18S F	TTGATTACGTCCCTGC CCTTT	62-60	196	Amplifican región del gen 18S. Utilizado para verificar la calidad del ADN y ADNc.
18S R	ACAATGATCCTTCCG CAGGT			
<i>AdGapdh</i> F	AGTGAGATTCAACCACT GAGAC	58-60	97	Gen housekeeping. Utilizado para verificar la calidad del cDNA y como gen normalizador.
<i>AdGapd</i> R	TAAGGCTGTTGGCAA GGTGC			
<i>AdNced3</i> F	TTGGACTCCACCATG ATCGC	58-60	126	Utilizados para qRT-PCR del gen <i>AdNCED3</i>
<i>AdNced3</i> R	TGGGTTCCGAGAGAG GGATT			
<i>AdAcs6</i> F	CCAAAAGCCTCCATTT GCAC	57-61	233	Utilizados para qRT-PCR del gen <i>AdACS6</i>
<i>AdAcs6</i> R	CACTTTTCCCATGAAT TTTGCCAC			
<i>AdSap7</i> F	GCAAGAGGGATTGGA GGTAGATACAGA	58-60	120	Utilizados para qRT-PCR del gen <i>AdSAP7</i>
<i>AdSap7</i> R	TAACCTCCTTTGGTTT GTCTTTTCCGGCG			
<i>AdSrfp1</i> F	TGTTGTGCTTTGGACT GAATCA	58-60	128	Utilizados para qRT-PCR del gen <i>AdSRFP1</i>
<i>AdSrfp1</i> R	GTGGAGCTGCGTGAT AATCAC			

<i>AdSarp1</i> F	TAATTGCGTTGCGCT CACTGCCCGCTTT	58-60	120	Utilizados para qRT-PCR del gen <i>AdSARP1</i>
<i>AdSarp1</i> R	CGTATTACCGCCTTTG AGTGAG			
<i>AdSap7_clon</i> F	CAGAAAAACCCAAA AAGAAATGTG	58-60	120	Utilizados para clonar el gen <i>AdSAP7</i>
<i>AdSap7_clon</i> R	GCCTGATAGTCACCT GTTTCGTTGC			
<i>HptII</i> F	TTTGTGTACGCCGA CAGT	52-58	666	Gen de resistencia a Higromicina.
<i>HptII</i> R	AAGACCTGCCTGAAA CCGA			
<i>AdActin2</i> F	TACAGAGGCACCACT CAACC	57-59	130	Gen housekeeping. Utilizado para verificar la calidad del cDNA y como gen normalizador.
<i>AdActin2</i> R	ATAGATGGGGACCGT GTGACT			
<i>Oligo AP</i>	CGCCACGCGTCGACT AGTACTTTTTTTTTTTT TTTTT	-	-	Utilizado para síntesis de ADNc mediante RT-PCR

3 Resultados

3.1 Selección de genes candidatos mediante análisis filogenéticos y análisis de dominios conservados

Mediante una revisión bibliográfica, se seleccionaron 6 genes reconocidos como reguladores negativos (RN), los cuales pueden causar susceptibilidad en la planta cuando se expresan frente a un agente estresante, y han sido reportados en diferentes plantas (Figura 5). De esta selección, 3 de los genes codifican para ubiquitinas ligasas (*OsSRFP1*, *OsSAP7* y *GhSARP1*), cuya función es enviar factores de transcripción necesarios para la tolerancia al estrés abiótico a la degradación (Zamudio y col. 2012; Lee y col. 2011). Otro gen, *ANAC069*, pertenece a la familia de proteínas NAC (NAM, ATAF1/2 y CUC2), una de las familias más grandes de factores de transcripción específicos de plantas, que juegan un papel fundamental en la modulación del desarrollo de las plantas en respuesta a estímulos bióticos y abióticos.

Además, se incluyó el gen *FtMYB31*, que codifica un factor de transcripción R2R3-MYB capaz de regular tanto de manera positiva como negativa diversos estímulos, como la sequía modulada por el ácido abscísico (ABA), hormona que promueve en plantas la tolerancia a estrés abiótico (REF). Por último, el gen *ACS6* codifica una enzima denominada 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACC sintasa) en *Arabidopsis thaliana*. Esta enzima es responsable de la síntesis de ACC, el precursor directo del etileno, una hormona vegetal de gran importancia en la regulación de diversos procesos fisiológicos y de desarrollo (Schellingen y col. 2014) (Tabla 8).

Tabla 8. Lista de genes candidatos como reguladores negativos en plantas bajo estrés. Estos genes se expresan en respuesta a condiciones estrés abiótico y pueden generar susceptibilidad en las plantas al ser sobreexpresados, lo que los convierte en candidatos para la edición genética mediante herramientas como CRISPR/Cas9 (Bermúdez y col. 2016).

Nombre	Gen Encontrado en	Descripción	Expresión en Estrés	Tolerancia / Susceptibilidad	Referencia
<i>OsSRFP1</i>	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	<i>Oryza sativa</i> Stress-related RING Finger Protein 1	(+)	S	Fang y col. 2015; Zafar y col. 2020.
<i>ANAC069</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NAM-ATAF1/2 and CUC2 (NAC) Protein 69	(+)	S	He y col. 2016; Zafar y col. 2020.
<i>FtMYB10</i>	<i>Tartary Buckwheat</i> (Tipo de Cereal)	Proteína de unión al dominio MYB 10	(+)	S	Gao y col. 2015; Zafar y col. 2020.
<i>GhSARP1</i>	<i>Gossypium hirsutum</i> (Algodón)	Salt-Associated Ringer finger Protein 1	(+)	S	Liu y col. 2016; Zafar y col. 2020
<i>OsiSAP7</i>	<i>Oryza sativa</i> (Arroz)	Stress Associated Protein 7.	(+)	S	Sharma y col. 2015; Zafar y col. 2020.
<i>AtACS6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>Zea Mays</i> (Trigo)	1-aminociclopropano-1-1 acido carboxilo sintasa (ACC) sintasa	(+)	S	Benny y col. 2019; Young y col. 2004

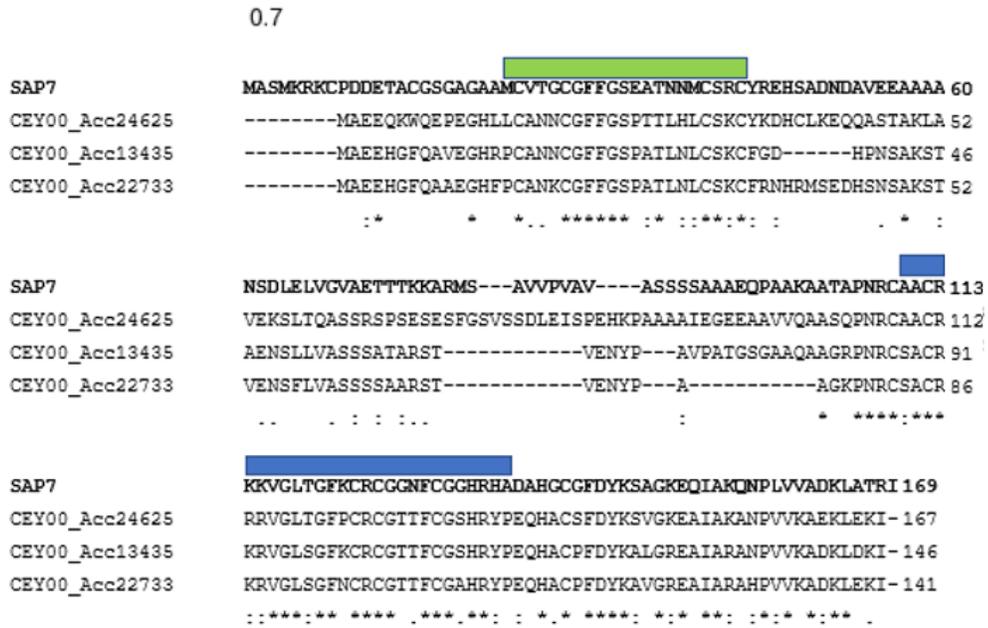
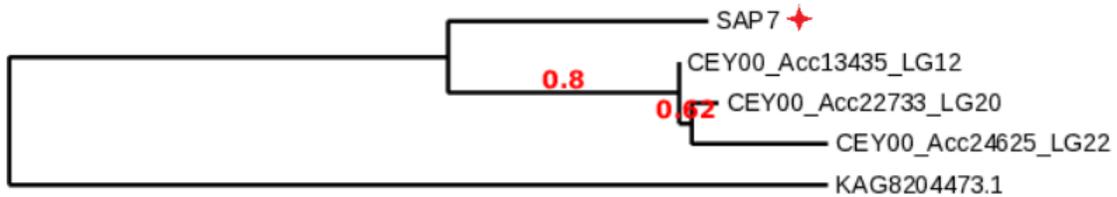
Luego, identificamos los genes reguladores negativos ortólogos candidatos en el genoma de referencia Red5 de *Actinidia chinensis* mediante búsqueda en NCBI. Utilizamos la herramienta tblastn con las secuencias aminoacídicas de los genes candidatos (Figura 5). Nuestros criterios de selección incluyeron el tamaño del gen, que el análisis de árboles filogenéticos arroje pocos genes ortólogos y la identificación de dominios conservados homólogos al gen de referencia. Los árboles filogenéticos proporcionaron información relevante sobre las relaciones evolutivas de los genes candidatos, permitiéndonos identificar posibles reguladores negativos con funciones conservadas en distintas plantas. Mediante la plataforma de NCBI, analizamos los dominios conservados para inferir si los candidatos seleccionados tenían

comportamientos funcionales similares. Durante esta primera etapa, los análisis de homología realizados mediante tblastn arrojaron una abundancia de información engorrosa y redundante para los genes *ANAC069* y *MYB10*, lo que llevó a descartarlos. Por tanto, esta tesis inicio con el estudio bioinformático de los genes *OsSRFP1*, *OsSAP7*, *ACS6* y *GhSARP1*.

Basado en los árboles filogenéticos, junto con el porcentaje de similitud y cobertura, se filtró el número de genes ortólogos encontrados. Estos genes luego pasaron a una segunda etapa de alineamiento y filogenia, pero en esta ocasión se complementó el criterio de selección con análisis de dominios conservados. En el caso del *SAP7*, se observó que las 3 secuencias encontradas conservan los dominios Zf-A20 y Znf (Figura 5) por lo que estas pasaron a la siguiente etapa.

OsSAP7 presenta el dominio A20 y AN1, involucrados en la función y la localización subcelular de la proteína. El dominio A20 es un dominio conservado que se encuentra en proteínas con actividad de ubiquitin ligasa y está implicado en la regulación de la degradación de proteínas (Kato y col. 2003). El dominio AN1 es un dominio de unión al ADN que se encuentra en proteínas que actúan como factores de transcripción participando en la regulación de la expresión génica (Sharma y col. 2017)

SAP7

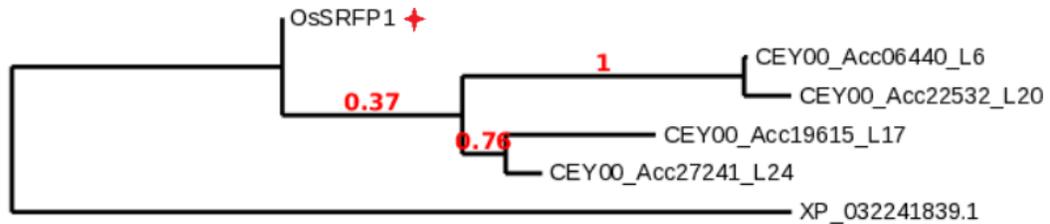


- **zf-A20: Union a zinc finger (23-44)**
- **ZnF_AN1: Union Zinc finger (109-146)**

Figura 5. Árbol filogenético y alineamiento de SAP7. Alineamientos y análisis de dominios conservados de SAP7. La estrella indica la secuencia OsiSAP7 descrita en la Tabla 8. Árbol enraizado con proteína SAP7 de *Cándida africana*. 39% de identidad de SAP7 con CEY00Acc13435_LG12, 39% de identidad de SAP7 con CEY00Acc22733_LG20 y 40% de identidad del SAP7 con CEY00Acc24625_LG22. Todas las secuencias poseen los dominios zf-A20 y ZnF_AN1, descritos en 3.1.

Durante el análisis de SRFP1, se compararon 5 secuencias con la secuencia de *Oryza sativa* (*OsiSRFP1*) y se encontró que todas ellas mostraban un alineamiento altamente conservado. Sin embargo, una de las secuencias (CEY00Acc19614) carecía del dominio Zf-CHY, que es fundamental para la función de ubiquitinación de proteínas. Debido a esta ausencia, se tomó la decisión de descartar esa secuencia particular (Figura 6).

SRFP1



0.7

CEY00_Acc06440-MGAELCCQHLYGECVPSEEP--LCDTKIT	28	CEY00_Acc06440	MKEHYQYACPLCSKSVCDMSKMEKIDEDIAATPMPEPYQNKMIWILCNDCGTTSEVQFH	268
CEY00_Acc22532	MA--AIIVDHSSEPIFEPKLLHITSEEHEMGAELCSQHLYGECAPSEEP--LCDTKIT	56	CEY00_Acc22532	MFEHCQYACPLCSKSVCDMSKMEKIDEDIAATPMPEPYQNKMIWILCNDCGTTSEVQFH	296
OsSRFP1-MELD	4	OsSRFP1	MLKHKDFSCPICSHPIFDHDKFLRALDAIEIANMLHIIDYMG-KGIVCNCDCRDTQYYAR	236
CEY00_Acc27241-HEMGAS	6	CEY00_Acc27241	MIKHKYCCPICSKSVVDSRTWKRIDEIEIATIMPEDYQKQKWIILCNDGTTSEVQFH	245
CEY00_Acc19614-PSFWPYKQELQPMEDDTVIP	0	CEY00_Acc19614	MISQDYRCPICSKSVVHSTAWKRELEIEIATAMPEEYHY-EVPIILCNDGTTSEVQFH	155
CEY00_Acc19615-PSFWPYKQELQPMEDDTVIP	40	CEY00_Acc19615	MINQYRCPICSKSVVDSRTWKRIDEIEIATAMPEEYHY-DVPIILCNDGTTSEVQFH	278
CEY00_Acc06440	GEELFDKGYMKYGCPIHYRRRCRIIAPCCNEIFDCRCHNEAKNINVDQKHRHDIPRHQV	88	CEY00_Acc06440	VVAQKCPVCKSYNTRQTR-----	286
CEY00_Acc22532	GEELLVKGYMVGCTHYRRRCRIIAPCCNEIFDCRCHNEAKNINVDQKHRHDIPRHQV	116	CEY00_Acc22532	ILAQKCPNCKSYNTRKTR-----	314
OsSRFP1	DASRHWGFRMGFGCKHYRRRCRIIAPCCNDVFHCRHCHNEST-----KDGHELDRHAV	57	OsSRFP1	VAGHKCCHCQSHNTRCVAAPVLP-----	260
CEY00_Acc27241	ANERLDFGKMGYGCPIHYRRRCRIIAPCCNEIFDCRCHNEATSMRLR-NPFDRELVRQDV	65	CEY00_Acc27241	IIGKCSHCKSYNTRTIAPPVLPQ-----	269
CEY00_Acc19614-NPKDHHELVRRIN	0	CEY00_Acc19614	ILGHKGRCSYNTRVIAAGTDDDR-QPDPADQNI	188
CEY00_Acc19615	QNNQEDFGKSLYGCPIHYRRRCRIIAPCCNDVFHCRHCHNEATSMRLR-NPKDHHELVRRIN	99	CEY00_Acc19615	IFGHKCSHCKSYNTRVWAGTDDNHQRPSPADQNS	312
CEY00_Acc06440-NPKDHHELVRRIN	148		
CEY00_Acc22532-NPKDHHELVRRIN	176		
OsSRFP1-NPKDHHELVRRIN	117		
CEY00_Acc27241-NPKDHHELVRRIN	125		
CEY00_Acc19614-NPKDHHELVRRIN	36		
CEY00_Acc19615-NPKDHHELVRRIN	159		
	...* *:::* : ::**.....* * *			
CEY00_Acc06440	FFHCNRCRCYSVLLKNSHPCVEGAMHDCPVCFEYLFESRNDVTVMPCGHTIHQSLKE	298		
CEY00_Acc22532	FFHCNRCRCYSVLLKNSHPCVEGAMHDCPVCFEYLFESRNDVTVMPCGHTIHQSLKE	236		
OsSRFP1	FFHCNRCRCYSVLLKNSHPCVEGAMHDCPVCFEYLFESRNDVTVMPCGHTIHQSLKE	177		
CEY00_Acc27241	YFHCKKCSYSLRDNHLCVENSMRHHCPICYEYLFDSLRTSVLRGHTMLQCFHE	185		
CEY00_Acc19614	YFHCKKCSYSLRDNHLCVENSMRHHCPICYEYLFDSLRTSVLRGHTMLQCFHE	96		
CEY00_Acc19615	FFHCNRCRCYSVLLKNSHPCVEGAMHDCPVCFEYLFESRNDVTVMPCGHTIHQSLKE	219		
	

Zf-CHY: Dominio a Zinc (18-93)
 Zinc_Ribbon_6: Dominio Zinc (194-251)
 RING_Ubox: Ubiquitin Ligasa (146-190)

Figura 6. Árbol filogenético y alineamiento de SRFP1. Alineamientos y análisis de dominios conservados de SRFP1. La estrella indica la secuencia OsSRFP1 descrita en la Tabla 8. Árbol enraizado con proteína SRFP1 de *Nematostella vectensis*. 69% de identidad de SRFP1 con CEY00Acc06449_L6, 74% de identidad del SRFP1 con CEY00Acc22532_L20, 77% de identidad del SRFP1 con CEY00Acc19615_L17 y 68% de identidad del SRFP1 con CEY00Acc27241_L24. Todas las secuencias poseen los dominios zf-CHY, Zinc_Ribbon_6 y RINNG_UBOX, descritos en 4.1, excepto la secuencia CEY00Acc19614.

Durante el análisis de ACS6, se realizaron alineamientos múltiples comparando 4 secuencias con la secuencia aminoacídica de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 8), lo que reveló una alta similitud entre ellas mediante el análisis filogenético. Sin embargo, se tomó la decisión de descartar una de las secuencias debido a la falta del dominio PLN02450. Como resultado, solo 3 secuencias se consideraron lo suficientemente conservadas para avanzar a la siguiente etapa del estudio (Figura 7)

ACS6

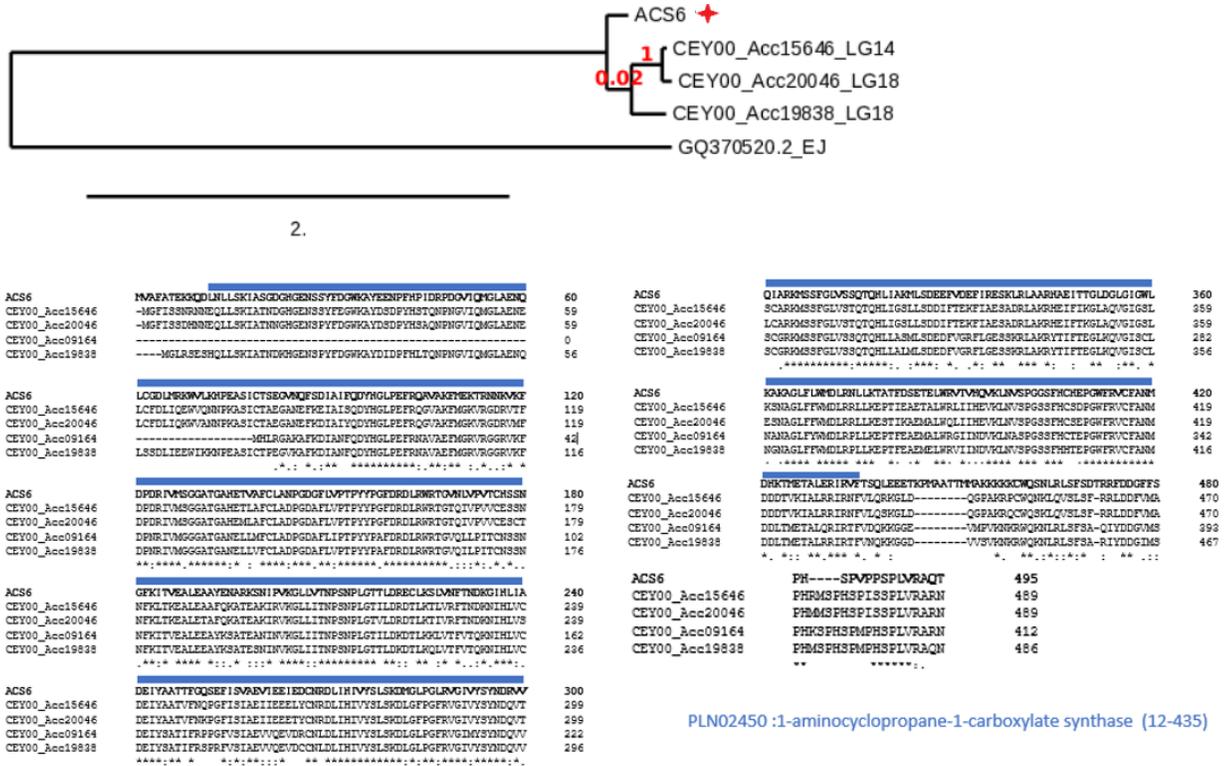


Figura 7. Árbol filogenético y alineamiento de ACS6. Alineamientos y análisis de dominios conservados de ACS6. La estrella indica la secuencia AtACS6 (tabla 8). Árbol enraizado con proteína ACS6 de *Eriobotrya japonica*. 63,52% de identidad de ACS6 con CEY00Acc15646_LG14, 62% de identidad del ACS6 con CEY00Acc20046_LG18 y 58% de identidad del ACS6 con CEY00Acc19838_LG18. Todas las secuencias poseen el dominio PLN02450, descrito en 4.1, excepto la secuencia CEY00Acc09164.

Finalmente, en el caso de SARP1, se encontró que las 4 secuencias poseían el dominio Ring H2-PA, que puede funcionar como una ubiquitina ligasa E3, mediando la ubiquitinación de la proteína dependiente de E2 (Marchler-Bauer y col. 2017). Por lo tanto, todas estas secuencias fueron seleccionadas para avanzar a la siguiente etapa del análisis (Figura 8).

SARP1



Figura 8. Árbol filogenético y alineamiento de SARP1. Alineamientos y análisis de dominios conservados de SARP1. La estrella indica la secuencia GhSARP1 descrita en la Tabla 8. Árbol enraizado con proteína SARP1 de *Spiroplasma citri*. 45% de identidad de SARP1 con CEY00Acc32410_LG28, 59% de identidad del SARP1 con CEY00Acc31756_LG28, 74% de identidad del SARP1 con CEY00Acc02875_LG3 y 72% de identidad del SARP1 con CEY00Acc01630_LG2. Todas las secuencias poseen el dominio RING_H2-PA, descrito en 4.1.

Empleando la metodología de discriminación por dominios conservados, logramos identificar 14 secuencias que podrían avanzar a la siguiente etapa de diseño de partidores (sección 2.3). Aunque estas 14 secuencias son adecuadas para los ensayos de expresión, en primera instancia se priorizó el parálogo con el mayor porcentaje de identidad (Figuras 5 a 8), Como resultado de este proceso, se seleccionaron los

siguientes genes como los más apropiados para continuar con el estudio: *AdSRFP1* (CEY00_Acc19615) 77% de identidad del SRFP1, *AdACS6* (CEY00_Acc 15646) 63,52% de identidad de ACS6, *AdSAP7* (CEY00_Acc 24625) 40% de identidad del SAP7 y *AdSARP1* 74% de identidad del SARP1 (CEY00_Acc 02875) (Tabla 9).

Tabla 9. Lista de genes ortólogos en Kiwi var. *chinensis* seleccionados en base a análisis bioinformáticos. * indica los genes que se utilizaron en esta tesis para el estudio de expresión relativa.

	Gene	DEFINITION
SRFP1	CEY00_Acc06440	E3 ubiquitin-protein like 286 aa LG6
	CEY00_Acc22532	E3 ubiquitin-protein like 314 aa LG20
	CEY00_Acc27241	E3 ubiquitin-protein like 269 aa LG24
	CEY00_Acc19615*	E3 ubiquitin-protein like 312 aa LG17
ACS6	CEY00_Acc15646*	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 489 aa LG14
	CEY00_Acc20046	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 489 aa LG18
	CEY00_Acc19838	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 486 aa LG18
SAP7	CEY00_Acc24625*	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 167 aa LG22
	CEY00_Acc13435	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 146 aa LG12
	CEY00_Acc22733	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 141 aa LG20
SARP1	CEY00_Acc32410	E3 ubiquitin-protein like 164 aa LG28
	CEY00_Acc31756	E3 ubiquitin-protein like 278 aa LG28
	CEY00_Acc02875*	E3 ubiquitin-protein like 275 aa LG3
	CEY00_Acc01630	E3 ubiquitin-protein like 332 aa LG2

3.2 Niveles de expresión de los genes *AdSAP7*, *AdACS6*, *AdSRFP1* y *AdSARP1* en plantas de *A. deliciosa* var. *Hayward* sometidas a tratamiento por sequía y salinidad

Para evaluar si los genes previamente seleccionados se inducen en respuesta al estrés causado por salinidad y/o sequía, se sometieron plantas de kiwi de dos meses cultivadas *in vitro* a estas condiciones estresantes (sección 2.6). A continuación, se

extrajo el ARN de las hojas de las plantas (3 plantas fueron una réplica biológica), y se obtuvo el ARN en triplicado para cada tiempo de tratamiento, incluido el tiempo inicial (T0). Las muestras exhibieron un nivel satisfactorio de pureza, lo cual se reflejó en los valores del índice 260/280, que se encontraron en un rango de 1.8 a 2.1 adecuado para llevar a cabo los análisis de expresión génica (Anexos).

Se realizó la síntesis de cDNA mediante RT-PCR (sección 2.7.2.2) y se llevó a cabo el análisis de expresión de los niveles relativos de transcrito de los genes *AdSRFP1* (CEY00_Acc 19615), *AdACS6* (CEY00_Acc 15646), *AdSAP7* (CEY00_Acc 24625) y *AdSARP1* (CEY00_Acc 02875) y *AdNCED3* mediante qRT-PCR (Sección 2.8.3). El gen *AdNCED3* se utilizó como control positivo de los tratamientos, ya que se determinó que su expresión se induce bajo condiciones de estrés por sequía y salinidad (Lee y col. 2018; Wurms y col. 2023).

En este estudio, se llevó a cabo la comparación de dos genes *housekeeping* *AdGAPDH* y *AdACTIN2*, para seleccionar el gen más estable que serviría como normalizador en el análisis de RT-qPCR. Para realizar esta evaluación, se utilizó la herramienta en línea RefFinder, una plataforma fácil de usar diseñada para analizar y seleccionar genes de referencia a partir de extensos conjuntos de datos experimentales. RefFinder ofrece la ventaja de proporcionar los resultados de geNorm, Normfinder, BestKeeper y los métodos comparativos Delta-Ct de manera simultánea, lo que la convierte en una herramienta integral para la validación de genes de referencia. Al final del análisis (Figura 9), se optó por el gen *AdGAPDH*, ya que fue identificado como el gen más estable entre los dos candidatos evaluados, lo que lo convierte en una opción confiable para su uso como normalizador en las posteriores mediciones de expresión génica mediante qRT-PCR.

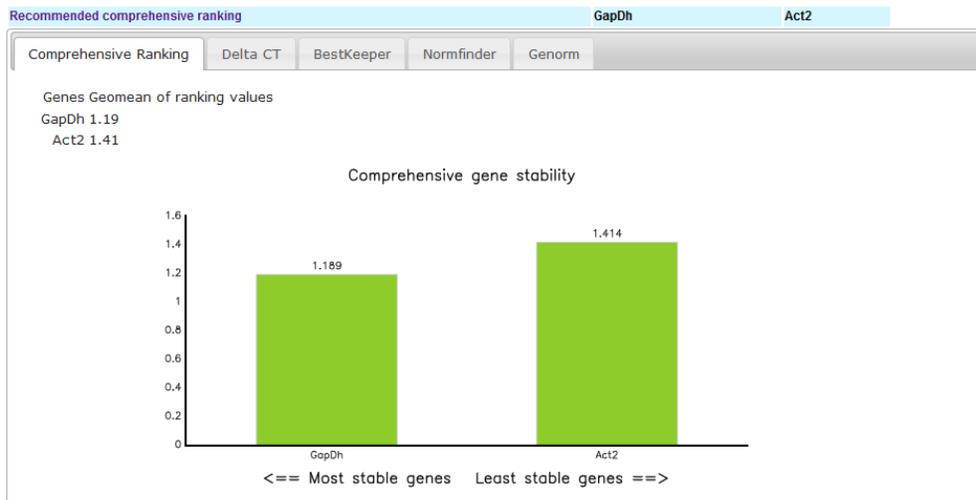


Figura 9. Resultados del análisis utilizando la herramienta RefFinder para la selección de genes de referencia. RefFinder combina los resultados de estos cuatro métodos y asigna un valor de estabilidad de referencia a cada gen. Cuanto más bajo sea el valor de RefFinder, más estable se considera el gen de referencia. Resultados muestran que el gen *AdGAPDH* es el más estable y adecuado como gen normalizador en qRT-PCR.

Antes de realizar el análisis de qRT-PCR, se determinó la eficiencia de los partidores *in silico* (tamaño y T_m) y en un gel (Figura 20A, Anexos). En el caso del gen *GAPDH* se generó un gráfico de amplificación (Figura 20C, Anexos), donde la mayoría de las curvas se encuentran agrupadas y comienzan entre los ciclos 14 y 20. Las curvas que inician a partir del ciclo 28 y 34 corresponden a la baja abundancia de ADNc y a los controles negativos. Por otro lado, las curvas de disociación (Figura 20B, Anexos) presentaron solo un pico, lo que indicaría la presencia de un solo fragmento dentro de las muestras. A partir de estas curvas, el programa generó una curva estándar y calculó los valores de eficiencia para este partidor (Figura 20D, Anexos), el cual se encuentra dentro del rango ideal (102.1%), según lo reportado por Alba Aguayo & Rueda, 2013 (90% - 110%). Cabe mencionar que este procedimiento se hizo para cada uno de los partidores usados en esta etapa.

Luego procedimos a realizar el análisis de qRT-PCR para el gen control de estrés. En la Figura 10, se observa un marcado aumento en los niveles de expresión del gen regulador de respuesta al estrés, *AdNCED3*, tanto en el grupo tratado con NaCl como en el tratado con PEG. Es especialmente destacable que este aumento sea evidente a las 24 horas en el grupo tratado con NaCl y desde las 6 horas en el grupo tratado con PEG. Este resultado confirma que ambos tratamientos ejercieron un efecto inductor de la expresión del gen *AdNCED3* y, por tanto, las plantas se encuentran bajo estrés salino y por sequía.

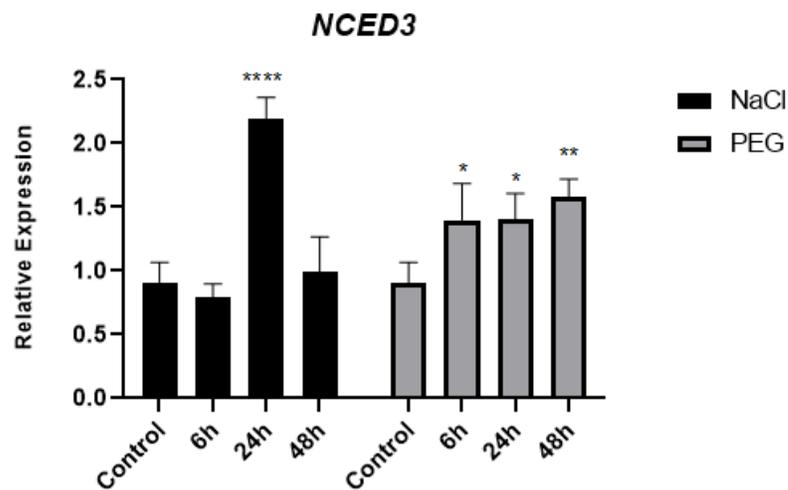


Figura 10. Expresión relativa del gen *AdNCED3* bajo estrés salino y sequía aguda. *AdNCED3* fue inducido en hojas de plantas *in vitro* a las 6, 24 y 48 horas después del tratamiento PEG 6.000 al 20% p/v y 200 mM NaCl. *AdGAPDH* se utilizó como normalizador y las 0 horas (T0, control) como calibrador. Los datos representan la media \pm desviación estándar (SD) (n = 6). Se determinó la diferencia estadística utilizando ANOVA de Brown-Forsythe y Welch. * p < 0.05, ** p > 0.01 y *** p < 0.001.

La Figura 11 muestra los niveles relativos de transcrito de los genes *AdACS6*, *AdSAP7*, *AdSRFP1* y *AdSARP1*, normalizados respecto al gen *AdGAPDH* y calibrados en el tiempo 0 (Control). En la Figura 11A se observa que el nivel relativo de transcrito de *AdACS6* aumentó 6 y 18 veces a las 6h y 48h en el tratamiento con NaCl en comparación con la condición control (T0), respectivamente mientras que el tratamiento con PEG no mostró diferencias significativas respecto al control. Por otro lado, el gen *AdSAP7* mostró un aumento de 3.8, 2.2 y 2.8 veces en los niveles de expresión a las 6h, 24h y 48h en sequía y de 5, 2 y 3.8 veces en salinidad (Figura 11B). En cuanto al gen *AdSRFP1*(Figura 11C), los niveles de expresión aumentaron significativamente, 1.8 veces a las 6h para el tratamiento con PEG y 2.2 veces a las 24h en el tratamiento con NaCl y finalmente, el gen *AdSARP1* (Figura 11D) mostró un aumento significativo de 3 veces en los niveles de expresión a las 6h en PEG y un aumento de 1.5 veces a las 6h en el tratamiento con NaCl.

Estos resultados indican que todos los genes evaluados responden significativamente al estrés salino y a la sequía, aunque de manera diferencial. Todos son inducidos por ambos agentes estresores, excepto el gen *AdACS6*, que solo lo hace en el tratamiento con sal. Por lo tanto, se proponen estos genes como candidatos para su caracterización funcional en plantas heterologas y la edición genética para determinar *in vivo* si codifican para genes reguladores negativos al estrés por salinidad y sequía.

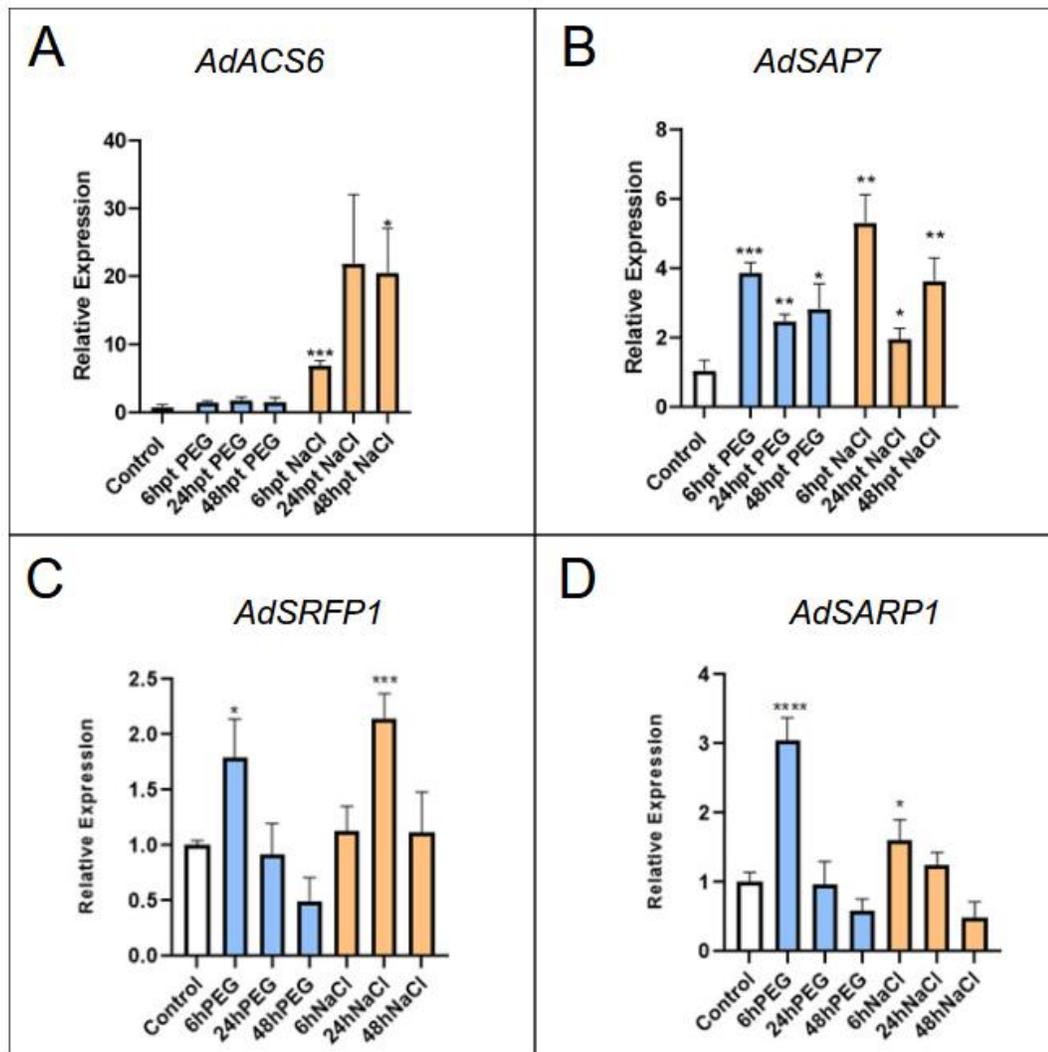


Figura 11. Expresión relativa de genes bajo estrés salino y sequía aguda. A) expresión relativa de *AdACS6*, B) *AdSAP7*, C) *AdSRFP1* y D) *AdSARP1* en hojas de plantas de kiwi *in vitro* bajo tratamiento a las 6, 24 y 48 horas de 250 mM NaCl y PEG 6.000 al 20% p/v. *AdGAPDH* se utilizó como normalizador y las 0 horas (Control) como calibrador. Los datos representan la media \pm desviación estándar (SD) (n = 6). Se determinó la diferencia estadística utilizando ANOVA de Brown-Forsythe y Welch. * p < 0.05, ** p > 0.01 y *** p < 0.001.

3.3 Clonamiento del gen *AdSAP7* en el vector pCR8

Para determinar la función *in vivo* de *AdSAP7*, uno de los genes seleccionados con mayor nivel de expresión a las 6, 24 y 48 horas en ambos tratamientos (Figura 11B), se decidió expresar este gen en la planta modelo *Nicotiana tabacum*. Para ello, se amplificó la región codificante de *AdSAP7* de 504 pb de *A. deliciosa* a partir del ADNc usando partidores específicos diseñados a partir de la secuencia codificante de *AdSAP7* obtenida de Kiwi Hayward. Para amplificar el gen *AdSAP7* de forma precisa, se utilizó la enzima Q5® (NEB), reconocida por su alta fidelidad y baja tasa de error.

Una vez obtenida la banda que corresponde al ADNc (sección 2.4.3) se procedió a clonar en el vector pCR8/GW/TOPO (sección 2.4.4) y transformar células de *E. coli* (sección 2.4.2). Después de la transformación, se seleccionaron las colonias y se cultivaron en medio LB líquido suplementado con espectinomicina (100 mg/L) durante 16 horas para permitir la extracción del ADN plasmidial (sección 2.4.5). Posteriormente, se verificó el tamaño del inserto clonado en el vector mediante una digestión enzimática con la enzima EcoRI (sección 2.4.6). La digestión con EcoRI, muestra la liberación de dos bandas: una correspondiente al inserto del tamaño esperado (≈ 504 pb) y otra correspondiente al esqueleto del vector pCR8 (2799 pb) (Figura 12). Este resultado sugiere que las colonias transformadas, contienen un inserto del tamaño esperado. Luego, para verificar la direccionalidad del inserto, se realizó una digestión enzimática adicional utilizando la enzima Avall (Figura 13).

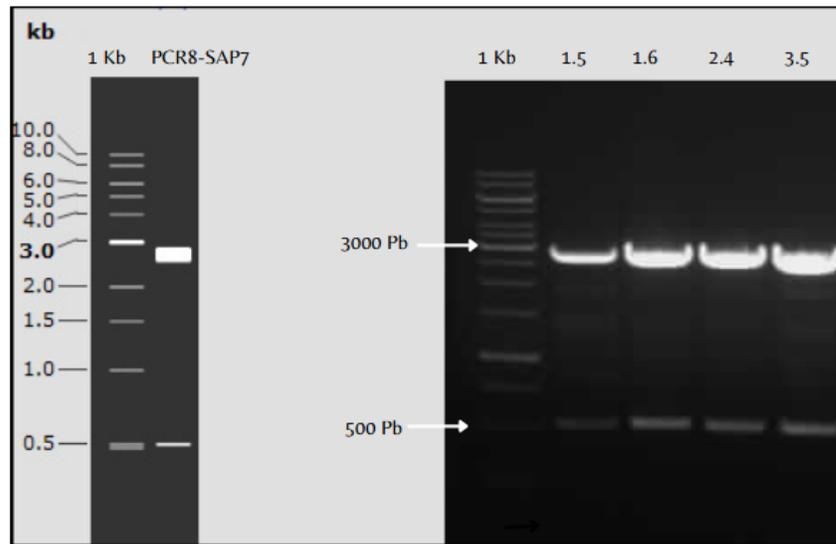


Figura 12. Digestión enzimática del ADN plasmidial extraído desde las colonias pCR8-SAP7. A la izquierda se muestra el patrón de digestión esperado obtenido mediante el software Snapgene (GSL Biotech) si las colonias poseen el inserto. A la derecha la digestión de colonias 1.5, 1.6, 2.4 y 3.5 con EcoRI. Las flechas indican los tamaños de 3000 pb y 500 pb. 1 kb: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.

La digestión con Aval muestra que las colonias 1.5, 2.4 y 3.5 poseen una inserción del gen en sentido, mientras que la colonia 1.6 presentó una inserción en antisentido (Figura 13). Es así como se seleccionaron las colonias 1.5, 2.4 y 3.5 para ser secuenciadas (Centro de Secuenciación Automática de ADN de la Pontificia Universidad Católica).

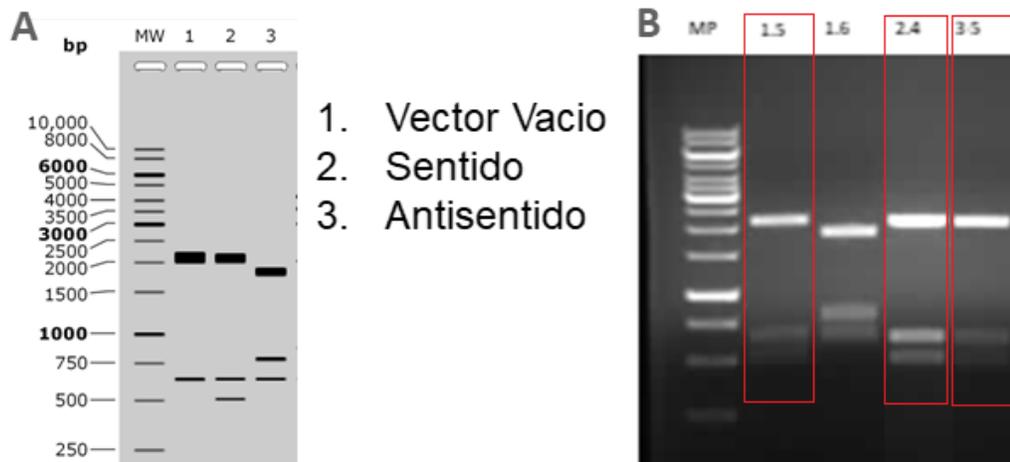


Figura 13. Digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias pCR8-SAP7 con la enzima Avall. Patrón esperado (A) simulado mediante el software Snapgene (GSL Biotech) y en B) el patrón obtenido luego de 3 horas de incubación de las colonias 1.5, 1.6, 2.4 y 3.5 con Avall. 1 Kb: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.

Los resultados de las secuenciaciones fueron analizados con el programa SnapGene, donde se alinearon frente a las secuencias del AdSAP7 de *A. chinensis* var. *chinensis* (Red5_PS1_1.69.0 disponible en NCBI, sección 2.2.1) y *A. deliciosa* var. *Hayward* (secuenciada en el proyecto ACT192073). Las secuenciaciones de las colonias 1.5 y 2.4 presentaron inserciones, gaps y mismatches, tanto en la alineación con la secuencia de AdSAP7 de *chinensis* como en *Hayward*. Además, la calidad de la secuenciación fue baja, por lo que fueron descartadas para posteriores análisis. En cuanto a la colonia 3.5, se pudo determinar que el alineamiento con la secuencia AdSAP7 en *A. deliciosa* var. *Hayward*, mostró un 100% de similitud (Figura 14), por lo que obtuvo pCR8-SAP7 ideal para las siguientes etapas.

SAP7_Hayward	MAEEQKWQEPHRLCANNCGFFGSPTTLHLCSKCYKDHCLKEQQASTAKLAVEKSLTQA	60
SAP7_Clon	MAEEQKWQEPHRLCANNCGFFGSPTTLHLCSKCYKDHCLKEQQASTAKLAVEKSLTQA	60
SAP7_Chinensis	MAEEQKWQEPHLLCANNCGFFGSPTTLHLCSKCYKDHCLKEQQASTAKLAVEKSLTQA	60

SAP7_Hayward	SSRSPSESEFSGSVSSDLEISPEHKPAAAAIEGEEAAVVQAASQPNRCAACRRRVGLTGF	120
SAP7_Clon	SSRSPSESEFSGSVSSDLEISPEHKPAAAAIEGEEAAVVQAASQPNRCAACRRRVGLTGF	120
SAP7_Chinensis	SSRSPSESEFSGSVSSDLEISPEHKPAAAAIEGEEAAVVQAASQPNRCAACRRRVGLTGF	120

SAP7_Hayward	PCRCGTTFCGSHRYPEQHACSFYKSVGKEIAKANPVVKAEKLEKI	167
SAP7_Clon	PCRCGTTFCGSHRYPEQHACSFYKSVGKEIAKANPVVKAEKLEKI	167
SAP7_Chinensis	PCRCGTTFCGSHRYPEQHACSFYKSVGKEIAKANPVVKAEKLEKI	167

Figura 14. Alineamiento aminoacídico de AdSAP7 de *A. chinensis* var. *chinensis*, *A. deliciosa* var. *Hayward* y colonia 3.5 secuenciada (SAP7_Clon). SAP7_Chinensis: Secuencia obtenida desde la base de datos NCBI (ID de acceso: Red5_PS1_1.69.0); SAP7_Hayward: Secuencia obtenida desde proyecto Anillo (PASSA ACT 192073); SAP7_Clon: Secuencia obtenida desde los cromatogramas correspondientes a la colonia 3.5, mediante el software SnapGene 3.2.1 (GSL Biotech).

3.4 Generación de un vector binario para la expresión de AdSAP7 en plantas de tabaco

Después de verificar que la secuencia del gen *AdSAP7* clonada en vector pCR8 es correcta, se realizó la recombinación del clon 3.5 en el vector de expresión pGWB5 para obtener una proteína de fusión SAP7: GFP. Una vez completada la reacción de recombinación entre los vectores, se transformaron células de *E. coli* quimiocompetentes. A partir de las colonias transformantes obtenidas, se extrajo el ADN plasmidial y se validó mediante digestión con EcoRI donde se observó la liberación del fragmento de 504 pb en las colonias P1.1, P2.1, P3.1, P4.1, P4.2, P5.2, P6.1 y P6.2 (Figura 15). De esta forma, se obtuvo el vector pSAP7: GFP, y las colonias P2.1 y P4.1 fueron utilizadas para transformar la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* (Sección 2.4.9). Las colonias obtenidas de esta transformación fueron analizadas por PCR (Figura 16).

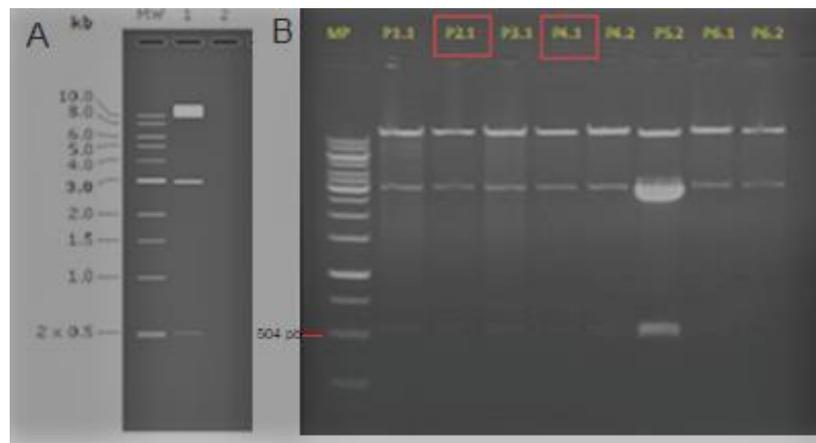


Figura 15. Digestión enzimática del ADN plasmidial de las colonias pSAP7: GFP con la enzima EcoRI. Patrón (A) simulado mediante el software Snapgene (GSL Biotech) esperando las bandas de ≈ 3000 y 504 pb y B) el patrón obtenido luego incubación de las colonias P1.1; P2.1; P3.1; P4.1; P4.2; P5.2; P6.1 y P6.2 con la enzima EcoRI. En cuadro rojo: colonias seleccionadas para siguiente etapa: P2.1 y P4.1 MP: marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder.

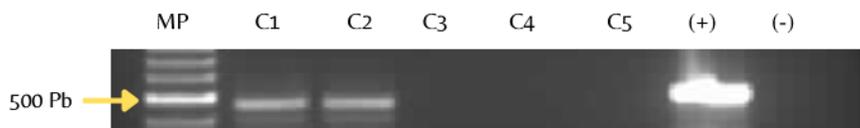


Figura 16. PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con vector pSAP7: GFP. C1-C5: colonias analizadas mediante amplificación del gen AdSAP7 de 500pb. C+: control positivo de la reacción (vector pCR8-SAP7), C-: control negativo de la reacción (reacción sin ADN, solo agua). MP: marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb DNA Ladder.

3.5 Determinar la localización subcelular de AdSAP7: GFP mediante Transformación transitoria de hojas de *N. tabacum*

Para determinar la localización subcelular de la proteína de fusión AdSAP: GFP, realizamos una transformación transitoria de hojas de tabaco utilizando agroinfiltración

con la colonia P4.1 de *A. tumefaciens* que porta el vector pSAP7: GFP. Como control de localización nuclear se utilizó el vector 35S:PIF3: GFP (Duran, 2019; Ni et al., 2013) y de localización citoplasmática, la construcción 35S: GFP.

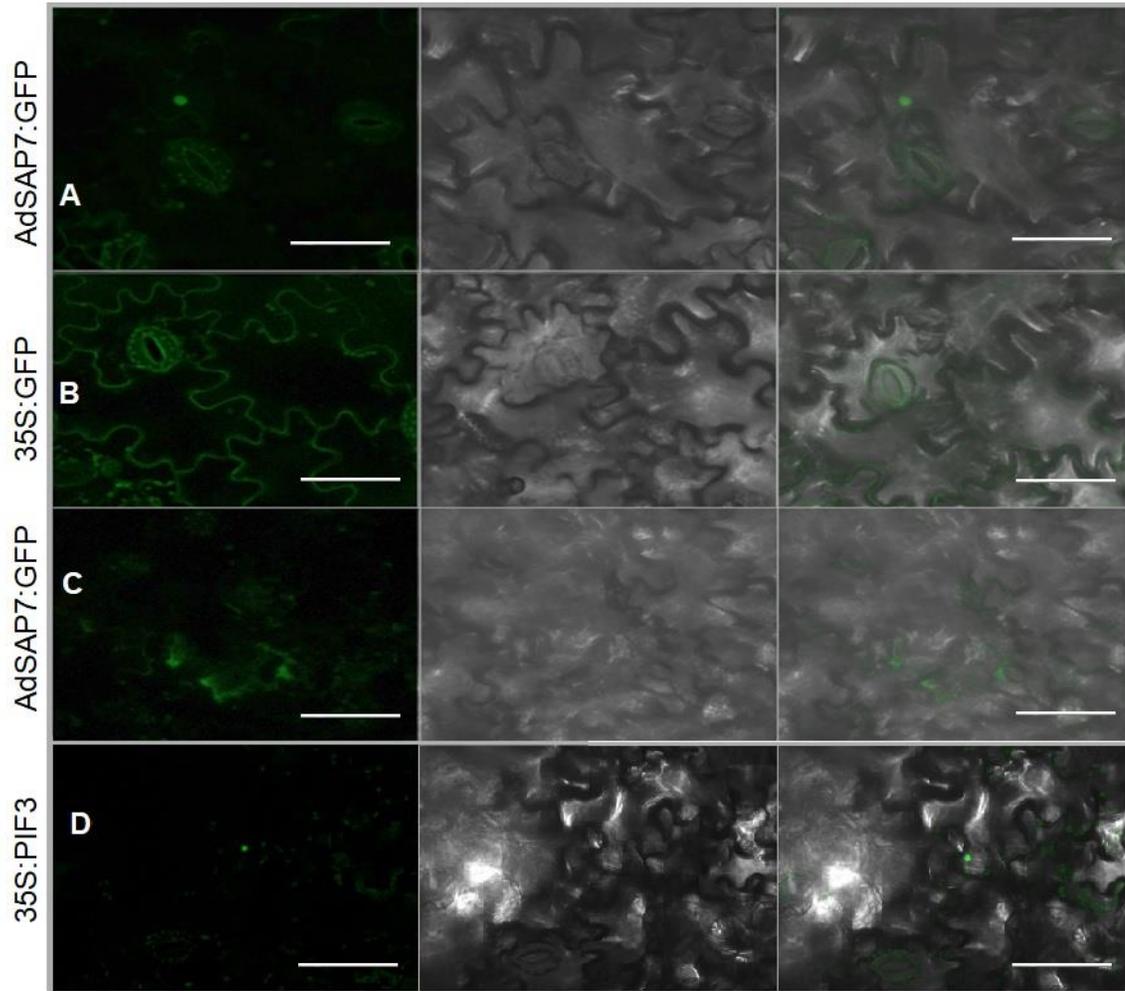


Figura 17. Localización subcelular de AdSAP7: GFP en hojas de tabaco. Se infiltraron hojas de plantas de tabaco con suspensiones de *A. tumefaciens* que portaban el constructo AdSAP7: GFP bajo el promotor CaMV35S. Se determinó la fluorescencia después de 3 días en microscopía confocal bajo luz de excitación de 489 nm. (A) AdSAP7: GFP se observa una localización nuclear; (B) 35S: GFP control de localización citoplasmática; (C) AdSAP7: GFP se observa una localización citoplasmática; (D) 35S: PIF3 Control de localización nuclear; Barra: 50 μ m.

La Figura 17 muestra la fluorescencia de AdSAP7: GFP en hojas de tabaco agroinfiltradas, lo que sugiere una localización tanto nuclear como citoplasmática. Tanto para AdSAP7: GFP como para 35S: GFP, se observaron regiones discretas cercanas a la membrana celular, que corresponden a la emisión de GFP en el citoplasma (Figura 17B y 17C). Este hallazgo es consistente con la localización reportada para GFP como marcador fluorescente cuando no está fusionada con otras proteínas (Hanson y col. 2001). También se observa que SAP7 presenta un patrón punteado coherente con la localización nuclear, tal como se observa en 35S:PIF3.

3.6 Transformación estable de plantas de *N. tabacum*

La transformación estable de tabaco se llevó a cabo de acuerdo a lo señalado en sección 2.5.2. La Figura 18 presenta las diversas fases del procedimiento, abarcando desde los explantes recién transformados junto a sus respectivos controles (A, Medio N.t I), hasta la formación de plántulas jóvenes tras 6 semanas de cultivo (B, Medio N.t II). Luego de 9 semanas (C, Medio N.t III), las plántulas desarrollan raíces y elongan, alcanzando una longitud de 5 cm; en esta etapa, están listas para ser trasplantadas al suelo.

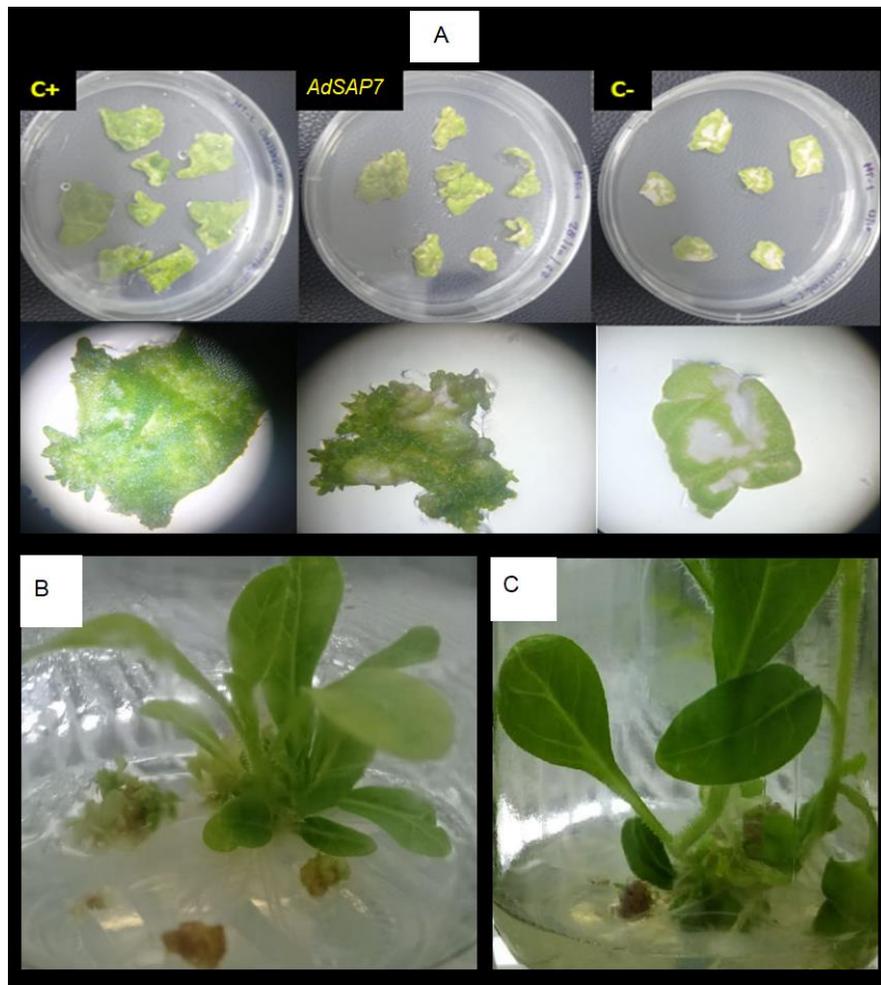


Figura 18. Obtención de plantas de tabaco transgénicas para el gen *AdSAP7*. A: Explantes transformados y controles tras 1 semana de cultivo en Medio N.t I; B: Aparición de plántulas luego de 6 semanas de cultivo (Medio II); C: Elongación y enraizamiento de plántulas en frascos con Medio N.t III tras 9 semanas de cultivo (≈5 cm de altura).

3.7 Genotipificación de las plantas de de *N.tabacum* transformadas con la construcción pAdSAP7

La identificación de las plantas transgénicas de tabaco transformadas establemente con la construcción pGWB5/*AdSAP7*, se llevó a cabo mediante PCR desde ADN

genómico extraído de sus hojas (sección 2.8.1). Primeramente, se amplificó el gen *18S*, para comprobar la calidad del ADN extraído (Figura 19A) y luego se verificó la transgénesis mediante la amplificación del gen de Higromicina (Figura 19B). Basándonos en este resultado, podemos concluir que las plantas T1, T2, T3, T5, T7, T8, T9 y T11 han sido exitosamente transformadas, ya que el gen de resistencia a kanamicina, *nptII*, se encuentra presente en las plantas analizadas.

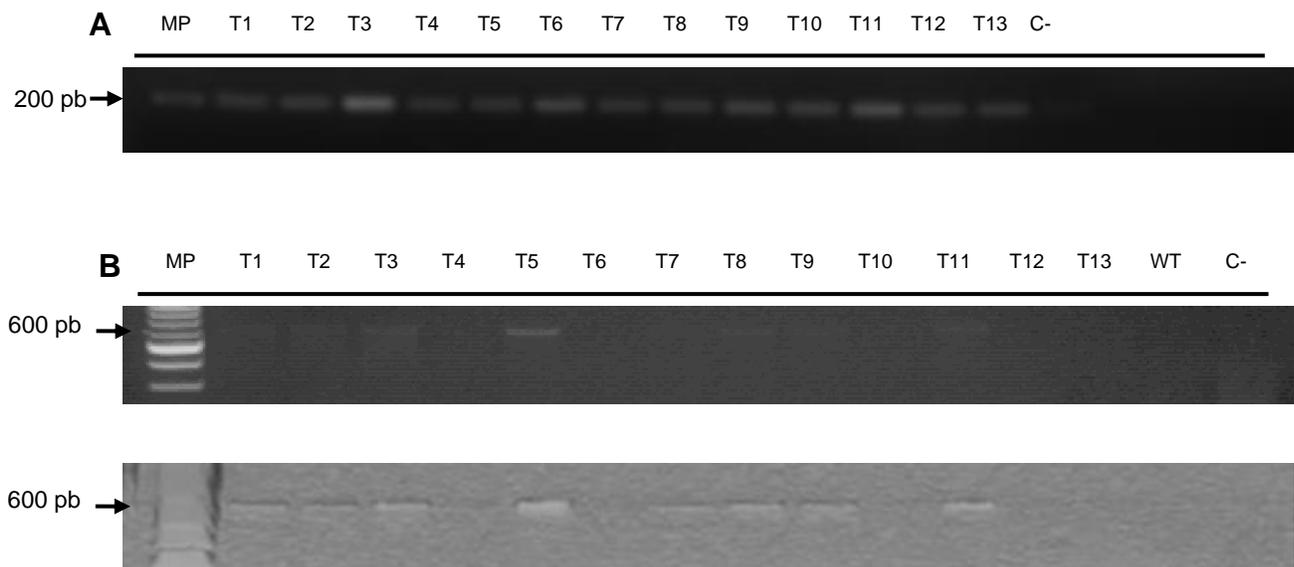


Figura 19. Genotipificación de las plantas de tabaco transformadas con la construcción pAdSAP7. A: amplificación del gen *18S* en 13 líneas transformantes de tabaco con pGWB5/AdSAP7. Fragmento esperado; 196 pb, B: Amplificación de *nptII* (resistencia a Higromicina) en las mismas líneas. La imagen de abajo corresponde a la versión con relieve que entrega el Software GeneSnap 7.12 (Syngene), incluyendo ADNg de tabaco WT y el control negativo, con los partidores *HptII* F y *HptII* R (Tabla 7). Fragmento esperado: 666 pb.

4 Discusión

4.1 Selección de genes candidatos

El objetivo principal de este trabajo fue buscar y seleccionar genes reguladores negativos, es decir, aquellos genes que codifican factores que inhiben la transcripción de genes o la actividad de reguladores positivos a sequía y salinidad (Yang y col. 2015). Mediante una revisión bibliográfica, se propusieron varios candidatos (*OsSRFP1*, *ANAC069*, *FtMYB10*, *GhSARP1*, *OsiSAP7* y *ACS6*) para buscar en el genoma de *Actinidia chinensis*. Sin embargo, en la primera etapa, se descartaron los genes *ANAC069* y *FtMYB10*. La razón para esto se debe a que, al utilizar el análisis "tblastn" en la plataforma NCBI, una variante del programa BLAST, se encontraron redundancias de información en los alineamientos y una excesiva cantidad de genes homólogos. Este hecho es importante destacar porque, con un alto número de homólogos, no se puede considerar un gen como candidato para una futura edición ya que, si se mutara y se omitiera su función, fácilmente podría ser reemplazado por otro gen homólogo, lo que limitaría el beneficio del trabajo en cuestión. También descartamos los Factores de transcripción por su función pleiotrópica.

Para los 4 genes seleccionados se realizaron alineamientos múltiples, construcción de árboles filogenéticos y revisión de dominios conservados, ya que proporcionan información valiosa sobre la función y evolución de los genes y proteínas (Colcombet-Cazenave y col. 2021). En el proceso de alineamientos múltiples, las secuencias de los 4 genes fueron comparadas entre sí, lo que permitió identificar regiones comunes y diferencias en sus secuencias. Esto facilitó la detección de parálogos, que son genes

que provienen de una duplicación en la misma especie y que comparten similitud en su secuencia debido a su origen evolutivo cercano (Whittle y col. 2009). Los árboles filogenéticos, que son representaciones gráficas de la relación evolutiva entre las secuencias de los genes, ayudaron a agrupar las secuencias similares y a identificar claramente los genes parálogos presentes en cada uno de los 4 genes seleccionados. Finalmente, cuando se realizó una revisión de dominios conservados en las secuencias de los genes (Figuras 5 - 8), se redujo significativamente el número de genes homólogos encontrados para cada uno de los 4 genes iniciales, lo que facilitó enormemente el trabajo posterior. Por ejemplo, en el caso del gen *SRFP1*, se observó que 5 secuencias se alineaban adecuadamente con la secuencia original. No obstante, la secuencia CEY00_Acc19614 carecía del dominio Zf-CHY (Figura 6), también conocido como dominio Zf-C3HC4, una estructura de dedo de zinc presente en proteínas eucariotas. Este dominio es esencial en la regulación de la expresión génica y en la interacción proteína-proteína. Se caracteriza por su disposición de dos residuos de cisteína y dos residuos de histidina que coordinan iones de zinc, lo que estabiliza su estructura. Los dominios zf-Chy tienen la capacidad de unirse tanto al ADN como a proteínas, participando en procesos clave como la regulación génica y la ubiquitinación para la degradación proteica. Su versatilidad funcional los convierte en componentes esenciales en la biología celular y molecular (Liu y col. 2022), por lo que se decidió descartarla. O también, en el caso del gen *ACS6*, que se descartó la secuencia CEY00_Acc09164 (Figura 7) debido a la ausencia del dominio PLN02450, que forma parte de una familia de dominios de proteínas conservadas que incluye la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa (ACC sintasa), responsable de la síntesis de ACC, el precursor directo del etileno, hormona vegetal de gran importancia en la regulación de diversos procesos fisiológicos y de desarrollo (Lu y col. 2020).

Posteriormente, se seleccionó el representante de cada gen que mostrara el mayor grado de identidad en comparación con el genoma de *Actinidia deliciosa* var. *Hayward*. Esta selección se realizó en colaboración con el Doctor Samuel Parra del proyecto anillo (PASSA ACT 192073) lo que permitió sugerir que estos ortólogos, es decir, los genes homólogos en especies distintas, podrían tener funciones similares en kiwi. Para corroborar esta hipótesis, se hace necesario realizar estudios *in vivo*, por ejemplo, analizar cómo se expresan estos genes en su contexto natural. Además, se plantea la necesidad de expresar estos genes en una planta heteróloga, para caracterizar su función (Godard y col. 2007).

4.2 Niveles de expresión de los genes *AdSAP7*, *AdACS6*, *AdSRFP1* y *AdSARP* en plantas de *A. deliciosa* var. *Hayward* sometidas a tratamiento por sequía y salinidad

Para validar nuestros resultados, utilizamos el gen *AdNCED3* como control positivo, ya que estudios anteriores han demostrado que su expresión se induce bajo condiciones de estrés por sequía y salinidad (Lee y col. 2018; Wurms y col. 2023). El gen *NCED3*, codifica para la enzima 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenasa 3, que está involucrada en la biosíntesis del ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal que juega un papel crucial en la respuesta al estrés abiótico, incluyendo la sequía y la salinidad (Luchi y col. 2001). Esto nos permitió tener una referencia confiable y asegurar la robustez de nuestros datos al evaluar los niveles de expresión de los genes de interés en respuesta al estrés abiótico.

Además, evaluamos los genes normalizadores *AdGAPDH* y *AdACTIN2* para seleccionar el más estable como referencia en el análisis de RT-qPCR. Es importante que un gen normalizador tenga una expresión constante, ya que su función es proporcionar una referencia para comparar la expresión de otros genes de interés (Vandesompele y col. 2002). Para evaluar la estabilidad de los genes normalizadores en nuestros estudios de expresión génica, empleamos la herramienta en línea RefFinder, la cual utiliza algoritmos estadísticos específicos, para evaluar la estabilidad de los genes de referencia (Xie y col. 2023).

La elección de *AdSAP7* se destaca como un punto crucial en este estudio. Mientras que los otros genes evaluados mostraron patrones de expresión variables en respuesta al estrés salino y la sequía, *AdSAP7* se destacó notablemente ya que exhibió una expresión temprana y sostenida desde las 6 hrs hasta las 48 horas en ambas condiciones de estrés (NaCl y PEG). Este patrón de expresión bajo condiciones adversas lo posiciona como un candidato para la edición genética.

En Sharma y col. 2015 se demostró que el gen *OsiSAP7* es un regulador negativo de la señalización de estrés por ácido abscísico (ABA) y en la sensibilidad al estrés de sequía en *Arabidopsis*. El ABA es una hormona vegetal clave en la adaptación de las plantas a condiciones de estrés abiótico, como la sequía y la salinidad activando la expresión de genes responsivos al estrés (Yamaguchi y col. 2006). Los genes responsivos al estrés son aquellos que muestran cambios en su expresión o actividad en respuesta a estímulos específicos, como el estrés abiótico o la presencia de hormonas. Estos genes son regulados por factores de transcripción y otros mecanismos de regulación génica que les permiten adaptarse y responder a las cambiantes condiciones del entorno (Sharma y col. 2015).

En *Arabidopsis* *OsiSAP7* regula negativamente la expresión de varios genes responsivos al estrés, incluyendo *COR47*, *ADH1*, *COR15a*, *RAB18* y *KIN1*. Estos genes son regulados por factores de transcripción como AREB/ABFs, que se activan en respuesta al ABA y se unen a elementos de respuesta al ABA (*ABREs*) en los promotores de dichos genes (Fujita y col. 2005; Stockinger y col. 1997).

Por lo que resulta muy interesante saber el rol del ortólogo *AdSAP7* de *Actinidia deliciosa*. Para ello se decidió evaluar inicialmente su rol en la planta modelo *N. tabacum*.

4.3 Clonación de AdSAP7 y obtención de líneas transgénicas de *N. tabacum* para este gen

Al clonar el *AdSAP7* se obtuvo una colonia (3.5) con similitud del 100% con la secuencia de *A. deliciosa* var. *Hayward* y una similitud de 99,4% con *A. Chinensis* var. *Chinensis*. Respecto a *A. Chinensis* var. *Chinensis* existían 3 mutaciones silentes, específicamente los cambios A192G, C405G y A489G, que no afectan el código aminoacídico de *AdSAP7* y una mutación de cambio de sentido, no sinónima por el cambio T41G, que da como consecuencia el cambio del aminoácido Arginina por Leucina (Figura 14). Una mutación no sinónima implica que, las propiedades fisicoquímicas entre estos aminoácidos son diferentes, lo que podría cambiar la funcionalidad de la proteína (Choi y col. 2012). Esto sugiere que la función de la proteína en *Hayward* podría ser distinta a la de *Chinensis*. A pesar de este hallazgo, este estudio se enfoca en la variedad *Hayward*, y los resultados obtenidos proporcionan una base para las siguientes etapas.

Para evaluar su localización subcelular realizamos una transformación transitoria de hojas de tabaco mediante agroinfiltración con *A. tumefaciens* (sección 2.5.3). Este método es ampliamente reconocido y empleado para evaluar construcciones de expresión en plantas, como proteínas de fusión fluorescentes y análisis de promotores (Sparkes y col. 2006; Kapila y col. 1997). Los estudios previos indicaban que ciertos dominios de la proteína SAP7, como el dominio A20 y el dominio AN1, influyen en la función y la localización subcelular de la proteína OsiSAP7 (Woodger y col. 2003; Sharma y col. 2015). La proteína OsiSAP7 tiene una localización dual en el núcleo o en los speckles subnucleares, dependiendo de las condiciones de estrés o del tratamiento con inhibidores del proteasoma. Al analizar las imágenes de fluorescencia de GFP en las células epidermales de las hojas infiltradas, observamos que la construcción AdSAP7: GFP se ubicaba tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, lo que concuerda con las investigaciones previas de Sharma y col. 2015. Por otra parte, los estudios de Giri y col. 2013 sugieren que la ubicación de las proteínas SAP puede variar según la especie y la proteína específica, lo que podría indicar una localización citoplasmática de esta proteína en el tabaco y no en *Arabidopsis*, como se ha observado. Adicionalmente, utilizamos el gen PIF3 como control positivo nuclear para evaluar la localización subcelular de nuestra construcción AdSAP7: GFP en hojas de tabaco. Estudios anteriores han demostrado que PIF3 interactúa con PPK1 en el núcleo de las células vegetales, formando un complejo trimolecular con PHYB y uno o más PPKs en el núcleo, lo que indica que PIF3 se encuentra presente en esta ubicación celular (Ni y col. 2017). La presencia de PIF3:GFP en el núcleo nos permitió sugerir que SAP7:GFP también se localiza en el núcleo. No obstante, resulta crucial realizar un ensayo de co-localización, utilizando un marcador específico del citoplasma y con una proteína nuclear asociada a otro gen marcador. Un ejemplo adecuado podría

ser el RFP (González 2013), que emite en un color rojizo. Esta estrategia permitiría verificar con mayor certeza la presencia de una localización efectiva en el citoplasma y núcleo de AdSAP7.

La transformación estable de tabaco fue acorde a lo reportado en literatura (Moreno y col. 2016; Heidari y col. 2018) obteniendo plántulas enraizadas a las 9 semanas post transformación, lo que permitió su análisis de transgenia mediante PCR de punto final. La amplificación del gen Higromicina (*nptII*) confirmó la transgénesis en 8 de las 12 plantas transformadas con la construcción pAdSAP7 lo que indica un 67% de eficiencia, similar a lo reportado en la literatura (Heidari y col. 2018). *N. tabacum*, al ser una especie modelo, presenta una alta tasa de transformación positiva y una rápida regeneración debido a su alta susceptibilidad a *Agrobacterium tumefaciens* y su capacidad de regenerar explantes de hojas a través de la organogénesis (Duan y col. 2016). Diversos estudios han sugerido que *N. tabacum*, al sobreexpresar genes de interés, puede proporcionar información valiosa sobre la función y regulación de los genes y proteínas en las plantas en respuesta al estrés abiótico (Méndez-Muñoz y col. 2019; Yang y col. 2022).

En conclusión, el clonamiento y posterior generación de un vector binario para la expresión de *AdSAP7* en plantas de tabaco se llevó a cabo de manera exitosa, y se verificó la presencia del gen *nptII* en las plantas transgénicas establemente transformadas. Estos resultados sientan las bases para futuros estudios sobre la función de *AdSAP7* en la respuesta al estrés en esta especie vegetal.

Se espera que, en un futuro cercano, las plantas de tabaco estén listas para llevar a cabo estudios funcionales que incluyen un ensayo crónico con las plantas

transformadas, aclimatadas en tierra (someter tabacos sobrepresores de AdSAP7 a elevadas concentraciones salinas y comparar la sobrevivencia respecto a las plantas de tabaco wt), permitirán profundizar en el entendimiento de cómo AdSAP7 participa en conferir (o no) tolerancia al estrés en las plantas, lo que potencialmente contribuirá a desarrollar estrategias para mejorar la tolerancia de los cultivos agrícolas en condiciones ambientales desafiantes. Estos resultados proporcionan una base para futuras investigaciones sobre la función de *AdSAP7* y su proyección a ser editado en *Actinidia deliciosa* de codificar para un RN.

5 Conclusiones

Selección de genes candidatos: En este estudio, se identificaron y seleccionaron cuatro genes candidatos (*AdSRFP1*, *AdACS6*, *AdSAP7* y *AdSARP1*) que podrían actuar como reguladores negativos en la respuesta al estrés salino e hídrico en *Actinidia deliciosa* var *Hayward*.

Expresión de genes en respuesta al estrés: Los genes *AdSAP7*, *AdACS6*, *AdSRFP1* y *AdSARP1* se expresan tempranamente y de manera significativa en plantas de kiwi sometidas a estrés por sequía y salinidad lo que sugiere que estos genes pueden participar en la respuesta de la planta al estrés salino y de sequía. Entre los genes evaluados, se destaca *AdSAP7* por presentar una indicción de su expresión tanto en sequía y salinidad a tiempos tempranos y tardíos.

Expresión de *AdSAP7* en tabaco: El gen *AdSAP7* se clonó y se generó un vector binario para su expresión en plantas de tabaco. Se determinó que la proteína de fusión *AdSAP7: GFP* se podría localizar en el citoplasma y núcleo celular lo que concuerda con estudios de sus ortólogos en *Arabidopsis*. Además, se obtuvieron plantas transgénicas de *N. tabacum* para la construcción *AdSap7: GFP* lo que permitirá futuras investigaciones sobre su función en la tolerancia al estrés.

6 Bibliografía

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.

Bermúdez, N. L., & Lizarazo-Cortés, O. (2016). Técnica de edición de genes CRISPR/Cas9. Retos Jurídicos para su regulación y uso en Colombia. *Rev. Prop. Inmaterial*, 21, 79.

Bravo, J. (2014). *Kiwis, en la senda correcta*. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Recuperado el 5 de octubre de 2023, de <https://bibliotecadigital.odepa.gob.cl/bitstream/handle/20.500.12650/2534/KiwiSept2014.pdf>

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 166(3), 1292-1297.

Chartzoulakis, K. S., Therios, I. N., Misopolinos, N. D., & Noitsakis, B. I. (1995). Growth, ion content and photosynthetic performance of salt-stressed kiwifruit plants. *Irrigation Science*, 16, 23-28.

Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R., & Chan, A. P. (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS ONE* 7(10): e46688.

Classic Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.

Colcombet-Cazenave, B., Druart, K., Bonnet, C., Petit, C., Spérandio, O., Guglielmini, J., & Wolff, N. (2021). Phylogenetic analysis of Harmonin homology domains. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 1-20.

De Alba Aguayo, D. R., & Rueda, A. (2013). Problema Bioquímico Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Revista de Educación Bioquímica*, 32(1), 36-39.

Debarma, J., Sarki, Y. N., Saikia, B., Boruah, H. P. D., Singha, D. L., & Chikkaputtaiah, C. (2019). Ethylene response factor (ERF) family proteins in abiotic

stresses and CRISPR–Cas9 genome editing of ERFs for multiple abiotic stress tolerance in crop plants: a review. *Molecular Biotechnology*, 61(2), 153-172.

Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

Duan, W., Wang, L., & Song, G. (2016). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wild tobacco species *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana clevelandii*, and *Nicotiana glutinosa*. *American Journal of Plant Sciences*, 7(1), 1-7.

Durán Silva, F. A. (2019). Estudio funcional de los genes DcPAR1 y DcPIF3 en raíz de zanahoria (*Daucus carota*). Tesis para optar a título de Bioquímico en Universidad de Chile.

Gallie, D. R., & Young, T. E. (2004). The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 271, 267-281.

Giri, J., Dansana, P. K., Kothari, K. S., Sharma, G., Vij, S., & Tyagi, A. K. (2013). SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *Bioessays*, 35(7), 639-648

Hartley, J. L., Temple, G. F., & Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using in vitro site specific recombination. *Genome Research*, 10(11), 1788-1795.

Heidari Japelaghi, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani Uliiaie, E., & Jalali Javaran, M. (2018). High-efficiency agrobacterium-mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Journal of Plant Molecular Breeding*, 6(2), 38-50.

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.

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(12), 3470-3488.

Garreaud, R., Aldunce, P., Araya, G., Blanco, G., Boisier, J., Bozkurt, D., ... & Zambrano, M. (2015). *La Mega-Sequia 2010–2015: Una Lección Para el Futuro*. Center for Climate and Resilience Research-CR2: Santiago, Chile, 26.

Godard, K. A., Byun-McKay, A., Levasseur, C., Plant, A., Séguin, A., & Bohlmann, J. (2007). Testing of a heterologous, wound-and insect-inducible promoter for functional genomics studies in conifer defense. *Plant Cell Reports*, 26, 2083-2090.

González, Y. A. R. (2013). Ingeniería de proteínas fluorescentes y aplicaciones de localización celular en microorganismos termófilos (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).

Gostincar, i. T. J., & Yuste Pérez, M. (2006). *Biblioteca de la agricultura*: Idea Books.

Gutiérrez-Serrano, M. J. (2019). Selección de líneas transgénicas de *Actinidia deliciosa* (kiwi) que expresan el gen DcAREB3 y estudio preliminar de la tolerancia a estrés salino. Tesis para optar a título de Ingeniero en Biotecnología Molecular en Universidad de Chile.

Hanson, M. R., & Köhler, R. H. (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52(356), 529-539.

Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 immune system as a tool for genome engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 233-240.

Invitrogen (2012). pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit: Five-minute, TOPO® Cloning of Taq polymerase amplified PCR products into an entry vector for the Gateway® System. Carlsbad, CA: Life Technologies Corporation.

Jansson, JK y Hofmockel, KS (2020). Microbiomas del suelo y cambio climático. *Nature Reviews Microbiology*, 18 (1), 35-46.

Jia, D., Jiang, Z., Fu, H., Chen, L., Liao, G., He, Y., ... & Xu, X. (2021). Genome-wide identification and comprehensive analysis of NAC family genes involved in fruit development in kiwifruit (*Actinidia*). *BMC Plant Biology*, 21(1), 1-12.

Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M. y Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*. 122: 101-108.

Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P., & Tuteja, N. (2016). The CRISPR/Cas genome-editing tool: application in improvement of crops. *Frontiers in Plant Science*, 7, 506.

Lee, J. H., & Kim, W. T. (2011). Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis. *Molecules and Cells*, 31, 201-208.

Lee, S. U., Mun, B. G., Bae, E. K., Kim, J. Y., Kim, H. H., Shahid, M., ... & Yun, B. W. (2021). Drought stress-mediated transcriptome profile reveals NCED as a key player modulating drought tolerance in *Populus davidiana*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 755539.

Liu, H., Yang, W., Zhao, X., Kang, G., Li, N., & Xu, H. (2022). Genome-wide analysis and functional characterization of CHYR gene family associated with abiotic stress tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 22(1), 204.

Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., ... & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D265-D268.

Luchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., ... & Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 27(4), 325-333.

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C. J., Lu, S., ... & Bryant, S. H. (2017). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D200-D203.

Méndez-Muñoz, L., Campos-Delgado, S., Obando-Coronado, M., & Garro-Monge, G. (2019). Establecimiento de un protocolo de transformación transitoria y estable de *Nicotiana tabacum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. *Revista Tecnología en Marcha*, 32(1), 77-91.

Merlet, H., & D'Etigny, M. (1989). Requerimientos de clima y suelo: frutales de hoja caduca. (Pub. IREN N° 83).

Metje-Sprink, J., Menz, J., Modrzejewski, D., & Sprink, T. (2019). DNA-free genome editing: past, present and future. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1957.

Moreno, L. P. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 179-191.

Moreno, J. C., Pizarro, L., Fuentes, P., Handford, M., Cifuentes, V., & Stange, C. (2013). Levels of lycopene β -cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in *Daucus carota*. *PLoS One*, 8(3), e58144.7

Moreno, J. C., Cerda, A., Simpson, K., Lopez-Diaz, I., Carrera, E., Handford, M., & Stange, C. (2016). Increased *Nicotiana tabacum* fitness through positive regulation of carotenoid, gibberellin and chlorophyll pathways promoted by *Daucus carota* lycopene β -cyclase (*Dclcyb1*) expression. *Journal of Experimental Botany*, 67(8), 2325-2338.

Ni, W., Xu, S. L., Chalkley, R. J., Pham, T. N. D., Guan, S., Maltby, D. A., ... & Quail, P. H. (2013). Multisite light-induced phosphorylation of the transcription factor PIF3 is necessary for both its rapid degradation and concomitant negative feedback modulation of photoreceptor phyB levels in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(7), 2679-2698.

Ni, W., Xu, S. L., González-Grandío, E., Chalkley, R. J., Huhmer, A. F., Burlingame, A. L., & Quail, P. H. (2017). PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3. *Nature Communications*, 8(1), 15236.

Parr, R. D., & Ball, J. M. (2003). New donor vector for generation of histidine-tagged fusion proteins using the Gateway Cloning System. *Plasmid*, 49(2), 179-183.

Peleg, Z., Apse, M. P., & Blumwald, E. (2011). Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: getting closer to the field. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 57, pp. 405-443). Academic Press.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.

Pollak B., Cerda A., Delmans., et al. (2018). Loop assembly: a simple and open system for recursive fabrication of DNA circuits. *New Phytologist*, 222, 1-13.

Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 101(4), 213-215.

Sharma, G., Giri, J., & Tyagi, A. K. (2015). Rice OsiSAP7 negatively regulates ABA stress signalling and imparts sensitivity to water-deficit stress in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 237, 80-92.

Schreier, P. H., & Cortese, R. (1979). A fast and simple method for sequencing DNA cloned in the single-stranded bacteriophage M13. *Journal of Molecular Biology*, 129(1), 169-172.

Schellingen, K., Van Der Straeten, D., Vandenbussche, F., Prinsen, E., Remans, T., Vangronsveld, J., & Cuypers, A. (2014). Cadmium-induced ethylene production and responses in *Arabidopsis thaliana* rely on ACS2 and ACS6 gene expression. *BMC Plant Biology*, 14, 1-14.

Sixth assessment report. (s/f). Ipcc.Ch. Recuperado el 22 de diciembre de 2021, de <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/>

Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., & Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols*, 1(4), 2019-2025.

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., & Thomashow, M. F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(3), 1035-1040.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), 1-12.

Yang, Y., Tang, N., Xian, Z., & Li, Z. (2015). Two SnRK2 protein kinases genes play a negative regulatory role in the osmotic stress response in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122, 421-434.

Yang, J., Zhang, B., Gu, G., Yuan, J., Shen, S., Jin, L., ... & Xie, X. (2022). Genome-wide identification and expression analysis of the R2R3-MYB gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *BMC genomics*, 23(1), 432.

Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.

Whittle, C. A., & Krochko, J. E. (2009). Transcript profiling provides evidence of functional divergence and expression networks among ribosomal protein gene paralogs in *Brassica napus*. *The Plant Cell*, 21(8), 2203-2219.

Woodger, F. J., Gubler, F., Pogson, B. J., & Jacobsen, J. V. (2003). A Mak-like kinase is a repressor of GAMYB in barley aleurone. *The Plant Journal*, 33(4), 707-717.

Wurms, K. V., Reglinski, T., Buissink, P., Ah Chee, A., Fehlmann, C., McDonald, S., ... & Rikkerink, E. H. (2023). Effects of Drought and Flooding on Phytohormones and Abscisic Acid Gene Expression in Kiwifruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7580.

Xie, F., Wang, J., & Zhang, B. (2023). RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Functional & Integrative Genomics*, 23(2), 1-5.

Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 781-803.

Zafar, S. A., Zaidi, S. S. E. A., Gaba, Y., Singla-Pareek, S. L., Dhankher, O. P., Li, X., ... & Pareek, A. (2020). Engineering abiotic stress tolerance via CRISPR/Cas-mediated genome editing. *Journal of Experimental Botany*, 71(2), 470-479.

Zamudio-Arroyo, J. M., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2012). La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 133-141.

Anexos.

Tabla 10: Datos obtenidos de espectrofotómetro Epoch2. Control (Tiempo 0), NaCl (Tratamiento Salino), PEG (Tratamiento Sequia).

Tratamiento	Muestra	Hora	Concentración	260/280	260/230
Control	T0 F1(3) Hoja	0	630 ng	2.039	1.915
Control	T0 F2(1) Hoja	0	400 ng	2.041	1.387
Control	T0 F3(1) Hoja	0	560 ng	2.029	1.556
NaCl	NaCl 6 hpt F1(2) Hoja	6	250 ng	1.824	1.548
NaCl	NaCl 6 hpt F2(2) Hoja	6	308 ng	1.974	1.542
NaCl	NaCl 6 hpt F3(2) Hoja	6	420 ng	2.019	1.721
NaCl	NaCl 24 hpt F1(3) Hoja	24	384 ng	2,182	1.774
NaCl	NaCl 24 hpt F2(1) Hoja	24	800 ng	2.020	1.770
NaCl	NaCl 24 hpt F3(2) Hoja	24	405 ng	1.863	1.561
NaCl	NaCl 48 hpt F1(2) Hoja	48	1068 ng	1.868	1.618
NaCl	NaCl 48 hpt F2(1) Hoja	48	624 ng	2.108	1.880
NaCl	NaCl 48 hpt F3(3) Hoja	48	624 ng	2.026	1.753
PEG	PEG 6 hpt F1(3) Hoja	6	492 ng	2.085	1.863
PEG	PEG 6 hpt F2(2) Hoja	6	552 ng	2.029	1.616
PEG	PEG 6 hpt F3(1) Hoja	6	1060 ng	1.963	1.539
PEG	PEG 24 hpt F1(2) Hoja	24	580 ng	1,908	1.460
PEG	PEG 24 hpt F2(1) Hoja	24	864 ng	2,077	1.393
PEG	PEG 24 hpt F3(3) Hoja	24	532 ng	1,985	1.671
PEG	PEG 48 hpt F1(1) Hoja	48	1164 ng	1.896	1.706
PEG	PEG 48 hpt F2(2) Hoja	48	760 ng	1.853	2.336
PEG	PEG 48 hpt F3(2) Hoja	48	452 ng	1.982	1.661

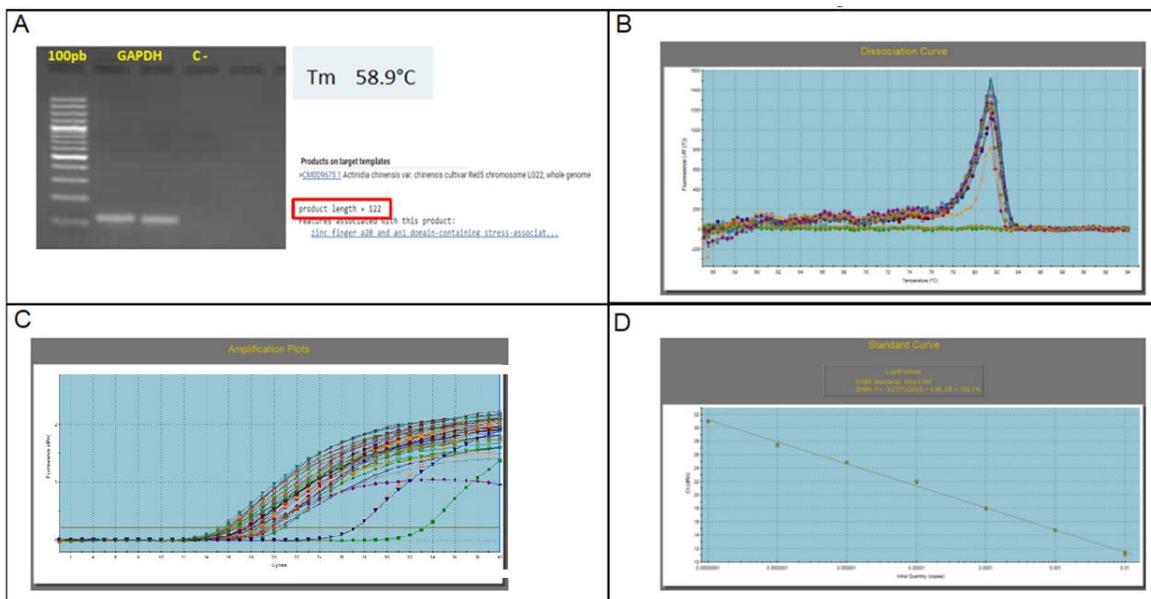


Figura 20. Procedimiento y perfil del qRT-PCR del gen *AdGAPDH*. A) Procedimiento in silico y en gel del partido qPCR_GAPDH. B) Curva de disociación para el gen *AdGAPDH*. C) Gráfico de amplificación del gen. D) Curva estándar con valores eficiencia: 102.1% y RSq: 0.997.