



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

**"Generación y validación de vectores para la edición mediante CRISPR/Cas9 de genes reguladores negativos del estrés abiótico en *Solanum lycopersicum* var. Poncho Negro"**

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

**Jorge Esteban Silva Suárez**

Directora de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange Klein  
Co-Director de Seminario de Título: Dr. Samuel Parra Aguilar

Julio, 2023  
Santiago - Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOTECNOLOGÍA

Se informa a la Escuela de Ciencias Ambientales y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por

**"Generación y validación de vectores para la edición mediante CRISPR/Cas9 de genes reguladores negativos del estrés abiótico en *Solanum lycopersicum* var. Poncho Negro"**

**Jorge Esteban Silva Suárez**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

**Ingeniero en Biotecnología Molecular**

Directora de Seminario de Título: Dra. Claudia Stange K.

Codirector de Seminario de Título: Dr. Samuel Parra A.

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente de la Comisión: Dr. Michael G. Handford

Evaluador: Dr. Patricio Arce J.

Santiago de Chile, .....

## **Agradecimientos**

A mis padres por alimentar mi curiosidad desde muy pequeño y darme todo lo que necesite a mis hermanos por el apoyo y la compañía. A mi tía María Luisa, a mi abuela Bernarda y a mi prima Ignacia por abrirme la puerta de su casa permitiéndome estudiar en una ciudad que me era ajena, y a las que tanto les debo; que espero sinceramente algún día poder retribuirselos.

A todos mis amigos que, aunque no lo exprese abiertamente, aprecio infinitamente y el solo hecho de que estén ahí es un gran aliciente, y que son y siempre han sido una gran fuente de apoyo y una inspiración.

A toda la gente que me permitió realizar este trabajo, a la Dra. Claudia Stange por recibirme en su grupo de trabajo, el gran apoyo y la aun mayor paciencia que tuvo conmigo; al Dr. Samuel Parra que me enseñó a poder desenvolverme en este trabajo, me brindo su apoyo y su experiencia, y quien fue un gran compañero; a Christian González y Leticia Amaza cuya ayuda fue esencial para el desarrollo de este trabajo y a quienes agradezco su amabilidad; a todos los compañeros del grupo de trabajo de la Dra. Stange por recibirme de modo tan agradable y a todos los compañeros de laboratorio que en menor o mayor medida me ayudaron en este proceso.

Al proyecto anillo proyecto anillo ACT192073 que financió el desarrollo de este trabajo y al Centro de Biología Molecular Vegetal por abrirme sus puertas.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	3
1.- Introducción .....	5
Cambio Climático y escasez hídrica.....	5
La Agricultura, la industria que nunca duerme .....	5
<i>Ad portas</i> de la cuarta revolución agrícola .....	6
Efectos del cambio climático en la agricultura nacional .....	7
Esfuerzos mancomunados para la generación de variedades .....	8
CRISPR como herramienta de edición genética.....	9
Búsqueda de genes resistentes al estrés generado por la sequía.....	10
Objetivos.....	14
2.1 Objetivo General .....	14
2.2 Objetivo Especifico .....	14
2.- Materiales y métodos .....	15
2.2Diseño de ARNGs.....	15
2.3 Construcción de vectores de edición .....	15
2.4 Transformación de <i>Escherichia coli</i> mediante shock térmico.....	17
2.5 Selección de colonias que portan los vectores de interés .....	17
2.6 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediante shock térmico.....	18
2.7 Preparación de <i>A. tumefaciens</i> para la transformación de tomate Poncho Negro .....	18
2.8 Agro-infiltración de hojas de tomate Poncho Negro .....	18
2.9 Transformación estable de explantes de tomate Poncho Negro .....	19
2.10 Extracción de ADN genómico y digestión enzimática.....	19
2.11 Detección de edición mediante PCR .....	20
2.11 Rediseño de ARNGs .....	21
3. Resultados.....	22
3.1 Diseño de ARNGs.....	22
3.2 Agro-infiltración de hojas de tomate Poncho Negro .....	27
3. 3 Transformación estable de explantes de tomate Poncho Negro .....	33
3.4 Rediseño de ARNGs y sistema de detección de la edición .....	35
4.- Discusión.....	40
5.- Conclusión.....	50
Bibliografía.....	51
Anexo .....	56

## Abreviaturas

<b>ADN o DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico o su sigla en ingles
<b>ADNg o gDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico genómico o su sigla en ingles
<b>ARN o RNA</b>	Ácido ribonucleico o su sigla en ingles
<b>ARNg o gRNA</b>	Ácido ribonucleico guía o su sigla en ingles
<b>CRISPR/Cas9</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein 9</i>
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>dpi</b>	Días post infiltración
<b>DSB</b>	Quiebre de doble hebra
<b>HDR</b>	Reparación dirigida por homología
<b>HR</b>	Respuesta de hipersensibilidad
<b>Indel</b>	Inserciones y deleciones
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos
<b>PAM</b>	Motivo adyacente al protoespaciador
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PN</b>	Tomate var. Poncho Negro
<b>RN</b>	Regulador negativo
<b>TALENs</b>	Nucleasas efectoras tipo activadores de la transcripción
<b>ZFNs</b>	Nucleasas de dedos de zinc

## Resumen

El cambio climático afecta a la agricultura y la economía de los países debido a la pérdida de tierras cultivables y al aumento de la sequía y salinidad de los suelos, estreses abióticos que generan gran reducción en el crecimiento y producción de las plantas. Sin embargo, las plantas poseen mecanismos para adaptarse a condiciones temporales de estrés abiótico y facilitar la sobrevivencia. Una vez se reestablecen las condiciones ambientales normales se apaga la respuesta de adaptación para recuperar el equilibrio y en ello participan reguladores negativos (RN) que degradan a los factores que promueven la tolerancia a salinidad y sequía.

Sin embargo, algunos RN se sobreexpresan en condiciones de estrés, lo que estaría promoviendo la baja tolerancia de la planta a estas condiciones. En los últimos años, la mejora genética se ha presentado como una herramienta valiosa para dar soluciones a estos problemas. Uno de los nuevos sistemas y el más popular a la fecha es el sistema CRISPR/Cas9, que permite editar genes de interés de manera precisa. Esta herramienta podría permitir reducir la expresión de RN mejorando la respuesta de las plantas al estrés por sequía y salinidad.

Por otro lado, la hortaliza con mayor terreno de producción en Chile y el mundo es el tomate (*Solanum lycopersicum*). En este estudio, utilizamos el tomate Poncho Negro (PN), variedad introducida al Valle de Lluta en el norte de Chile para generar portainjertos de tomate más tolerantes al estrés por sequía y salinidad. Para ello, identificamos y seleccionamos RN a estos estreses en el tomate como son *SIDIS1*, *SISINAT2*, *SIACO2* y *SIACSIa*, que serán editados mediante CRISPR/Cas9. *SIDIS1* y *SISINAT2* codifican para E3 ubiquitina ligasas que degradan factores de transcripción asociados a la tolerancia al estrés abiótico en plantas. *SIACO2* y *SIACSIa* codifican para enzimas de la biosíntesis de etileno, regulador negativo del estrés abiótico.

En este seminario de título diseñamos ARN guías específicos del genoma de PN para los genes mencionados y generamos vectores CRISPR/Cas9. Los vectores fueron transformados en *A. tumefaciens* y evaluada su funcionalidad por métodos transitorios que fueron estandarizados y mediante transformación estable. Al finalizar el estudio se logró verificar la transformación con el vector generado y sugerir la edición en el gen *SIACSIa* quedando como proyección por determinar específicamente la edición por secuenciación.

## Abstract

Climate change affects agriculture and the economy of countries due to the loss of cultivable lands and the increase in drought and salinity of soils. Water scarcity and salinity lead to a decrease in plant growth and production. However, plants possess mechanisms to adapt temporary to drought and salinity, thereby facilitating survival. Once normal environmental conditions are reestablished, the adaptation response is turned off to restore balance, and negative regulators (NR) participate in degrading factors that promote salinity and drought tolerance. However, some NRs are overexpressed under stress conditions, which could promote the lower tolerance of the plant to these conditions.

In recent years, genetic improvement has been presented as a valuable tool to find possible solutions to these problems. One of the newest and most popular systems to date is CRISPR/Cas9, which allows for precise editing of genes of interest. This tool could potentially reduce the expression of NRs, improving the response of the plant to drought and salinity stress.

On the other hand, the most widely produced vegetable in Chile and in the world is tomato (*Solanum lycopersicum*). In this study, we used the Poncho Negro (PN) tomato, a variety introduced to the Lluta Valley in northern Chile, to generate rootstocks more tolerant to drought and salinity. To do so, we identified and selected stress-responsive NRs in tomatoes, namely *SIDIS1*, *SISINAT2*, *SIACO2*, and *SIACSl $\alpha$* , for editing by CRISPR/Cas9. *SIDIS1* and *SISINAT2* encode E3 ubiquitin ligases that degrade transcription factors associated with abiotic stress tolerance in plants. *SIACO2* and *SIACSl $\alpha$*  encode enzymes involved in the biosynthesis of ethylene, a negative regulator of abiotic stress.

In this thesis, we designed specific guide RNAs for the PN genome for the mentioned genes and generated CRISPR/Cas9 vectors thorough Golden Gate tecnology, which were then transformed into *A. tumefaciens*. To evaluate vectors functionality, we standardized the transient transformation of PN but unfortunately was not sufficient to conclude vectors effectiveness by PCR. To improve the molecular



analysis of editing, a novel program was generated. This tool will help to design the best gRNAs for target genes to select better the edited plants by means of PCR and enzymatic digestion.

## **1.- Introducción**

### **Cambio Climático y escasez hídrica**

En la actualidad, el fenómeno global conocido como cambio climático impacta al mundo. Este fenómeno es el resultado de una combinación de factores, entre ellos la industrialización y el aumento explosivo de la población en los últimos siglos. Estos cambios han provocado un aumento de más de 1°C en la temperatura global con respecto al periodo preindustrial (1850-1900), y se proyectan cambios aún más abruptos en el futuro (Araya-Osses y col., 2020; IPCC, 2022a). Este fenómeno genera también cambios drásticos en las precipitaciones, donde se observan picos de precipitaciones en zonas y/o temporadas donde no era lo común, mientras que también se observan ciertos lugares donde la cantidad de agua lluvia se ha visto reducida significativamente. Esto genera un incremento en la escasez hídrica y un aumento en los peligros asociados a las precipitaciones, como aluviones e inundaciones. Un ejemplo claro de esto se observa en el norte de Chile, en localidades de la región de Atacama que han sufrido graves daños por precipitaciones, pero que a su vez se trata de zonas que registran déficit de precipitaciones de alrededor de un 80% con respecto a años anteriores (Izquierdo y col., 2020).

Esto, sumado a que el mismo incremento poblacional año a año, requiere un aumento constante en la producción industrial lo cual conlleva a mayores requerimientos de agua, elemento ampliamente empleado en la industria. Propiciando un panorama generalizado en que un elemento tan vital como lo es el agua sería cada vez más escaso (LeRoy, 1995; IPCC, 2022b; Velandia & Sentelhas, 2019).

### **La Agricultura, la industria que nunca duerme**

En este contexto de creciente escasez hídrica, una de las industrias ampliamente afectadas es la agricultura la cual requiere este recurso como base de su producción. Es por esto que en esta industria, que es la principal productora de alimentos a nivel mundial y además produce una notable cantidad de

materias primas para otras industrias; ha surgido la búsqueda de la optimización del recurso hídrico apareciendo o resurgiendo sistemas de riego como el riego por goteo u optimizando sistemas de almacenamiento como las represas agrícolas (Tingey-Holyoak y col., 2013). Sin embargo, esto no ha sido suficiente y las pérdidas que esta industria reporta año a año debido a la sequía se cuentan en miles de millones de dólares (Rosa y col., 2020). Además, estas condiciones fomentan la aridez y la erosión de los suelos, que constituyen la principal razón detrás de la pérdida de terreno cultivable a nivel global. Actualmente, aproximadamente 14 millones de kilómetros cuadrados se ven afectados por este problema, y corren el riesgo de ser irremediablemente perdidos si no se aplican medidas estratégicas concretas. (Prävãlie y col., 2021).

### ***Ad portas de la cuarta revolución agrícola***

Con la “revolución verde” o la tercera revolución agrícola se introdujeron a la industria variedades de alto rendimiento como puede ser el denominado trigo enano, el cual se logró gracias al estudio centrado en el cruce de variedades asiáticas de trigo que mostraban un rasgo favorable, el cual se describió como el “rasgo de enanismo”, deseable por la reducción de pérdidas que sufría la industria (Borlaug, 1968). Estas, en conjunto con variedades resistentes a enfermedades lograron generar variedades que, hoy en día, más de 50 años después, componen el grueso de producción de este cereal a nivel mundial (Vergauwen & De Smet, 2017). Esto demostró que la investigación de la propia genética de las plantas puede alojar una solución a las problemáticas que afligen a la industria. Este enfoque ha ido tomando fuerza con los años y adoptando nuevas perspectivas gracias al desarrollo de múltiples herramientas de genética y biología molecular que permiten acelerar tareas, posibilitando que investigación que en los años de la revolución verde demoraba décadas, se realice solo en años. El desarrollo explosivo de la ciencia y tecnología del nuevo milenio nos lleva a pensar que estos mismos serán los pilares fundacionales de la venidera cuarta revolución agrícola, junto con el desarrollo de

herramientas biotecnológicas y robóticas que han tomado un papel central en las últimas décadas (Barrett & Rose, 2022).

### **Efectos del cambio climático en la agricultura nacional**

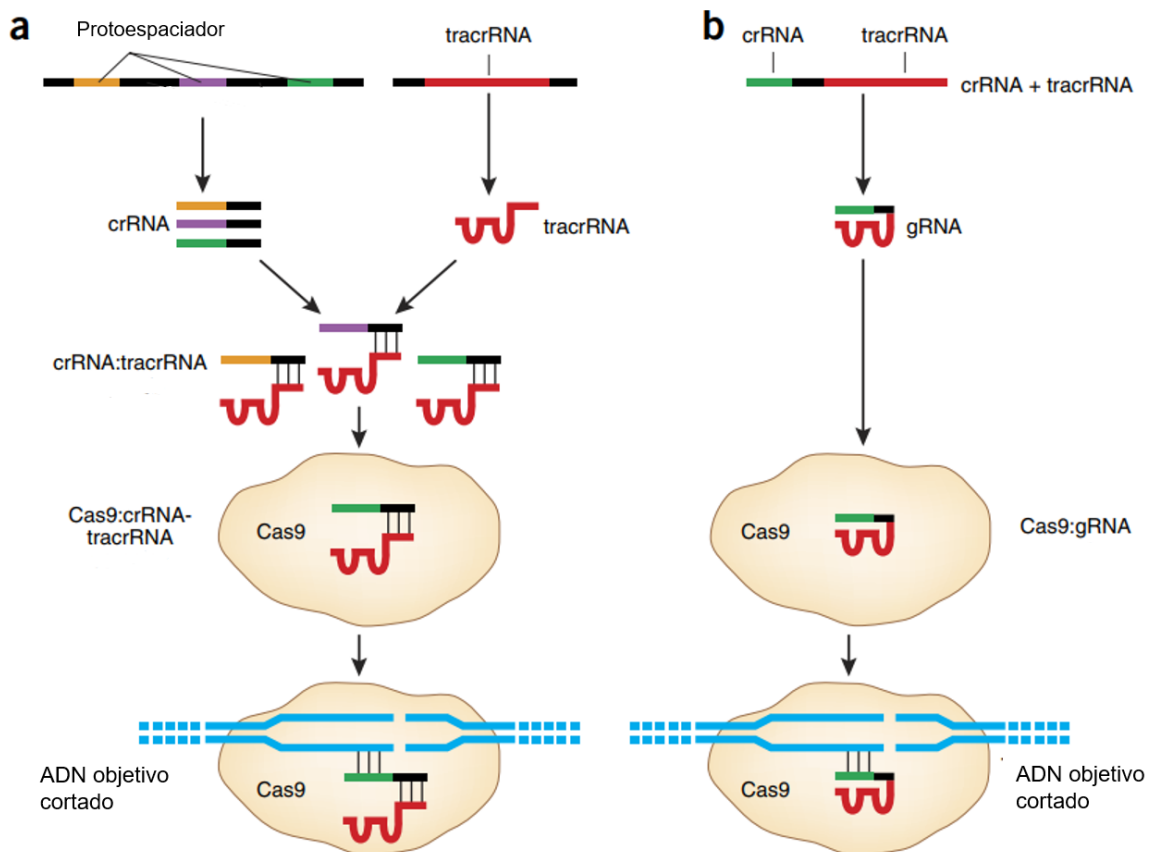
La agricultura nacional ha sufrido grandes impactos en su producción por efecto del cambio en las condiciones climáticas, donde las hortalizas son una de las especies cultivables con mayor detrimento. La hortaliza de mayor producción a nivel nacional es el tomate (*Solanum lycopersicum*), la cual en los últimos años ha visto necesaria el aumento de la superficie plantada por el detrimento de su producción, además de verse desplazada de la zona norte del país hacia la zona central (Muñoz 2023; Torres, 2017).

Es así como en las zonas afectadas por la creciente sequía se han implementado cambios en las plantaciones privilegiando variedades que manera natural parecen resistir de mejor manera las condiciones de sequía. Sin embargo, su productividad es menor. Por ello, se han desarrollado híbridos entre estas variedades lo que es costoso en términos de tiempo y trabajo. Una última opción es utilizar la variedad resistente a modo de portainjertos, ya que una gran cantidad de las condiciones que dificulta la producción en sequía está relacionada con la calidad del suelo (Torres, 2017; Kumar y col., 2017).

El reconocimiento de variedades naturalmente resistentes a ciertas condiciones puede lograrse mediante una búsqueda de variedades de la especie de interés o familias filogenéticamente cercanas a esta en un lugar en donde se presentan las condiciones que se busca combatir. Uno de los posibles tomates que podrían presentar una tolerancia al estrés por sequía y salinidad es el tomate Poncho Negro (*Solanum lycopersicum* var. Poncho Negro; Angel y col., 2016), cultivo introducido desde Cochabamba, Bolivia, al valle de Lluta en Arica, lugar caracterizado por la salinidad de sus suelos y aguas, una condición propia de la sequía (Torres & Acevedo, 2008).

## **Esfuerzos mancomunados para la generación de variedades**

Considerando que la generación de híbridos por cruzamientos asistidos es largo y costoso, han surgido otros métodos en esta búsqueda de fenotipos atractivos, como la inducción de mutaciones mediante métodos como radiación o agentes químicos, lo cual, al tratarse de mutaciones azarosas, implica la extensa revisión de una gran cantidad de fenotipos (Belhaj y col., 2015; Louwaars, 2018; Tripodi & Gómez-Talquenca, 2019). También, y con el avance de las nuevas técnicas de biología molecular, se han desarrollado métodos basados en la transgénica (Samal & Rout, 2018), los cuales utilizan genes que otorgan características deseables en ciertos organismos y los introducen en otros organismos de interés. Los organismos generados mediante estas técnicas han sido y siguen siendo bastantes controvertidos, principalmente en lo que respecta a temores de sus posibles efectos adversos en la salud humana y los ecosistemas por parte de consumidores, por lo que están sujetos a gran cantidad de evaluaciones previo a ser comercializados (siguiendo protocolos internacionales descritos en el Protocolo de Cartagena) que limitan y ralentizan su llegada a mercado (Conko y col., 2016; Wolt y col., 2016). En las últimas décadas, han surgido métodos que buscan la optimización de organismos para satisfacer las necesidades de la agricultura moderna a través de la edición de sus propios genes. Estos avances se basan en modernas tecnologías de edición genética, como las nucleasas sitio específicas (Khan y col., 2016), dentro de las que se destaca CRISPR/Cas9 (CRISPR, del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Gaj y col., 2016), que permite editar de manera precisa hasta un solo gen del propio organismo, lo que posibilita un mejor control en el efecto generado en este a diferencia de las mutaciones azarosas o la introducción de genes foráneos (Zayed & Mahas, 2019).



**Figura 1.- Sistemas CRISPR/Cas9 nativo y domesticado.** A) Frente a ADN foráneo, el sistema CRISPR almacena fragmentos como protoespaciadores, el cual se transcribe como crRNA. El crRNA se activa al unirse con un tracrRNA y forman un complejo con Cas9. El complejo Cas9:crRNA-tracrRNA se une al ADN que contenga la secuencia PAM y una secuencia complementaria al crRNA y corta ambas hebras del ADN foráneo. B) El sistema domesticado CRISPR fusiona los crRNA y tracrRNA, nombrándolo gRNA (ARN guía). El gRNA contempla una secuencia de 20 pb complementaria al ADN blanco de edición, adyacente a la secuencia PAM, que forma un complejo con Cas9 permitiendo el reconocimiento y corte del ADN blanco (Modificado de Sander & Joung, 2014).

### CRISPR como herramienta de edición genética

Las herramientas basadas en nucleasas sitio específicas, apoyan su funcionamiento en la generación de cortes de la doble hebra de ADN (DSBs) y en el sistema de reparación de las células, generalmente la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la recombinación homóloga (HDR). Usualmente es el mecanismo de NHEJ el que se encarga de reparar estos cortes lo que genera inserciones y deleciones de nucleótidos (indels), lo que a su vez permite eliminar la función codificada en el gen objetivo generando así lo que se denomina un *knockout* del gen. Aunque también se han desarrollado

modificaciones a los sistemas como el CRISPR que permiten la activación o el silenciamiento génico (Gilbert y col., 2013) o incluso la edición individual de nucleótidos del ADN (Begemann y col., 2017).

El sistema CRISPR extraído a partir de una respuesta inmunitaria adaptativa de *Streptococcus pyogenes* mediado por la proteína Cas9 y la integración de secuencias foráneas denominados protoespaciadores, en su forma nativa funciona con dos secuencias de ARN que se denominaron ARN CRISPR (crRNA) y ARN transactivador de crRNA (tracrRNA). El crRNA se compone de los protoespaciadores los cuales se activan al hibridarse con la secuencia tracrRNA uniéndose a Cas9, este nuevo complejo examinará la secuencia y al reconocer la secuencia del protoespaciador activará su función nucleasa generando un DSB (Jinek y col., 2012) (Figura 1 A). Este sistema se domesticó y para facilitar su empleo se fusionaron ambos ARN en un denominado ARN guía (gRNA o ARNg). También se determinaron las características que debía tener la secuencia propia del crRNA para su óptimo funcionamiento, estableciendo que debía de contar con 20 nucleótidos de la secuencia a reconocer y que esta debía de estar río arriba del denominado motivo adyacente de protoespaciador (PAM) que para el caso de Cas9 de *S. pyogenes* era 5'-NGG-3' (Sander & Joung, 2014) (Figura 1 B). De este modo se fijó que Cas9 tan solo necesitaba de 23 nucleótidos de reconocimiento con el limitante del sitio PAM, esto le otorgo una versatilidad y precisión superiores a otros métodos de edición génica como TALENs y ZFNs (Mushtaq y col., 2018; Kim y cols., 2018).

### **Búsqueda de genes resistentes al estrés generado por la sequía**

Las plantas son organismos sésiles que han evolucionado de tal manera que frente a los estímulos externos gatillan múltiples e intrincadas vías que se regulan y permiten con un complejo equilibrio, que las plantas se adapten al medio ambiente como, por ejemplo, a la presencia de patógenos o estrés ambiental como sequía o salinidad. Estos mecanismos se pueden clasificar como dependientes e independientes de ácido abscísico (ABA), estos mismos involucran una gran cantidad de familias de factores de transcripción (FT) que se entremezclan inhibiéndose y activándose mutuamente a la vez que

regulan la respuesta al estrés y otras características vitales de la planta como la germinación o el crecimiento (Yao y col., 2021; Mitra, 2001; Wu & Finkelstein 2021).

En estos sistemas deben existir mecanismos encargados de activar, pero también de apagar la respuesta para poder recuperar la homeostasis. En estos mecanismos participan reguladores negativos (RN) de la respuesta los cuales degradan o inhiben la acción de los FT involucrados. Por ende, estos RN surgen como buenos candidatos de edición génica ya que su silenciamiento ha mostrado mejoría en la respuesta al estrés que se encargan de regular (Fang y col., 2016; Zhao y col., 2021; Wani y col., 2016).

Este es el caso de una familia de E3 ubiquitina ligasa involucrada en la respuesta frente a estrés abiótico, las cuales en arroz (*Oryza sativa*) demostraron estar involucrados en la sensibilidad a salinidad y sequía, como *OsSRFPI* el cual es inducido por estrés abiótico como frío, deshidratación o salinidad y está involucrado en la degradación de enzimas antioxidantes de manera tal que su sobreexpresión otorga susceptibilidad al estrés por salinidad mientras que su silenciamiento muestra un notorio aumento de la tolerancia a este estímulo (Fang y col., 2016). Otro ejemplo similar es el caso del gen *OsDIS1*, que también codifica para una E3 ubiquitina ligasa, cuya acción se vinculó a la supresión e inducción de múltiples genes involucrados en la respuesta al estrés por sequía lo que permitió demostrar que cumple un rol negativo en la tolerancia a sequía (Ning y cols., 2011).

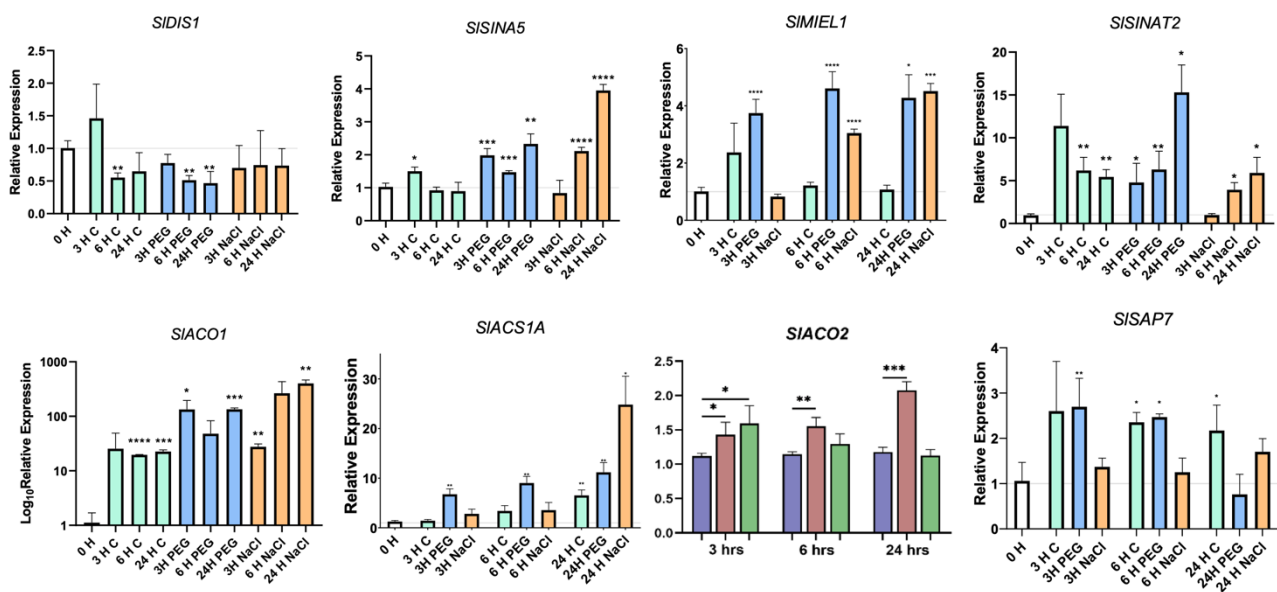
Otra vía identificada de este modo es aquella referente a la biosíntesis del etileno, fitohormona involucrada en variados procesos fisiológicos como la maduración, senescencia y crecimiento (Li y col., 2014; Naing y cols., 2022). Sin embargo, se ha reportado que el etileno reprime la tolerancia a estrés abiótico sobre todo en las raíces. Por tanto, genes como *TaACO1* que codifica para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa de la biosíntesis de etileno en trigo, al ser silenciada las plantas generaban tolerancia frente a salinidad (Chen y col., 2014). También es el caso del gen *ACS12*, que codifica para la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa de la biosíntesis del etileno, cuyo silenciamiento en cereales mostró generar tolerancia a sequía (Benny y cols., 2019).



Por tanto, genes de la familia de las ubiquitina ligasas o de la biosíntesis del etileno, pueden ser buenos candidatos de edición génica para la generación de plantas con mayor resistencia al estrés por sequía y salinidad.

Con esta información en consideración, en el proyecto Anillo ACT192073 se buscaron genes en la literatura candidatos a RN y sus ortólogos en tomate PN (Díaz, 2023). De este modo a partir del análisis de ortología del gen *OsDIS1*, se seleccionaron dos candidatos por la cercanía de sus secuencias aminoacídicas, los genes *SIDIS1* y *SISINAT2* de tomate, ambos genes de la familia de las ubiquitina ligasas (Díaz, 2023). A su vez se realizó un análisis de ortología a partir del gen *TaACO1* donde surgió como candidato en tomate el gen *SIACO2* (Díaz, 2023) y por último se realizó un análisis a partir del gen *ACS12* y se seleccionó como candidato el gen *SIACSIa* en tomate, participando ambos en la biosíntesis del etileno (Díaz, 2023).

Posteriormente, se analizó la expresión de los genes candidatos en condiciones de estrés por salinidad y sequía en tomate var. PN (Proyecto Anillo ACT192073 y Díaz, 2023), para seleccionar aquellos cuya expresión aumentara en estas condiciones. Como se puede ver en la figura 2 del trabajo realizado por integrantes del proyecto, son varios genes los que se inducen en salinidad y/o sequía a tiempos tempranos o tardíos (Figura 2), salvo *SIDIS1* y fueron seleccionados para ser editados. En lo que respecta a este seminario de título, se generaron vectores binarios para la edición de algunos de los genes candidatos como *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACO2* y *SIACSIa* mediante CRISPR/Cas9 y la evaluación de su efectividad. A pesar de que *SIDIS1*, no indujo su expresión, se decidió incluir dado los antecedentes funcionales de su ortólogo (Ning y cols., 2011) esperando evidenciar un efecto por la ausencia de esta E3 ubiquitina ligasa.



**Figura 2.- Análisis de expresión genes de la familia de las ubiquitina ligasas y de la biosíntesis del etileno en raíces de tomate var. PN bajo condiciones de estrés osmótico y salino agudos.** El ARN total fue extraído de mezcla de raíces de tres plantas de tomate var. PN de 5 semanas de edad crecidas en solución hidropónica a las 0, 3, 6 y 24hrs y expuestas a un suplemento con polietilenglicol (PEG) 6000 al 26,5% por estrés osmótico y cloruro de sodio (NaCl) 250mM por estrés salino, manteniendo un grupo control en medio hidropónico. Se muestra la expresión relativa por RT-qPCR de genes de la familia de las ubiquitina ligasas – *SIDIS1*, *SISINA5*, *SIMIEL1*, *SISINAT2* y *SISAP7*– y de la biosíntesis del etileno– *SIACO1*, *SIACO2* y *SIACS1a* – a las 3, 6 y 24hrs de iniciado el tratamiento. Se calculó la expresión relativa utilizando el gen *SIAct4* como control endógeno y se calibró los valores a las 3, 6 y 24hrs con el promedio de las muestras tomadas a las 0hrs. Se realizó análisis estadístico por ANOVA de Brown-Forsythe y Welch y un post test de Dunnett \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p > 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Generar vectores CRISPR/Cas9 para la edición de los genes *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACO2* y *SIACSIa* y su evaluación en tomate var. Poncho Negro.

### 2.2 Objetivo Especifico

**2.2.1.-OE1:** Diseñar ARNGs y generar vector CRISPR/Cas9 para la edición de *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACO2* y *SIACSIa*.

**2.2.2.-OE2:** Evaluar la edición por CRISPR/Cas9 de los genes *SISINAT2*, *SIDIS1* y *SIACSIa*.

## **2.- Materiales y métodos**

### **2.1 Vectores**

Para este trabajo se utilizaron varios vectores: el vector 35S:RUBY (He y col., 2020) el cual permite expresar el constructo reportero RUBY de manera constitutiva en plantas, el vector pEN-2xAtU6 empleado como molde para la construcción de parejas de ARNg (ARN guía) y el vector pGGK7-AtCas9-AtU6-Scaffold (pGGK7) el cual expresa la proteína Cas9 optimizada para su expresión en *Arabidopsis thaliana* y posee sitios de clonamiento para la introducción de ARNgs. Además, se construyeron los vectores pGGK7-2xARNgs-SISINAT2, pGGK7-2xARNgs-SIDIS1, pGGK7-2xARNgs-SIACS1a y pGGK7-2xARNgs-SIACO2 los cuales expresan Cas9 y 2 ARNgs para editar los genes *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACS1a* y *SIACO2* respectivamente.

### **2.2 Diseño de ARNgs**

El diseño de ARNgs se realizó empleando el software Geneious prime (v2023.0.1) (<https://www.geneious.com>) para lo cual se establecieron como criterios de selección el mayor puntaje de eficiencia y especificidad (Doench y col., 2016; Hsu y col., 2013), y que se posicione dentro de un exón del gen objetivo. Para esto se utilizó el genoma de *Solanum lycopersicum* var. Poncho Negro (PN) anotado por el grupo de investigación de la Dra. Claudia Stange en el marco del proyecto ACT 192073 y se apoyó para el estudio del transcrito con el genoma de *Solanum lycopersicum* cultivar. Heinz desarrollado por Solanaceae Genomics Project (Su y col., 2021).

### **2.3 Construcción de vectores de edición**

Los vectores de edición pGGK7-2xARNgs-SISINAT2, pGGK7-2xARNgs-SIDIS1, pGGK7-2xARNg-SIACS1a y pGGK7-2xARNg-SIACO2 se construyeron mediante el clonamiento por Golden Gate (Engler & Marillonnet, 2014) con la enzima BsaI de una secuencia que contenía una pareja de ARNgs para editar el respectivo gen. Para ello, primero, se elaboraron los distintos fragmentos que

contenían las parejas de ARNgs mediante PCR empleando como molde el vector pEN-2xAtU6, se diseñaron los partidores para esta reacción usando como base los partidores ARNg\_F y ARNg\_R (Tabla 1) reemplazando la sección vacía con los ARNgs diseñados para cada gen con estos partidores (Tabla 1). Se realizaron reacciones de PCR de punto final utilizando la polimerasa Q5 de alta-fidelidad (New England Biolabs, NEBiolabs) según las instrucciones del fabricante en un volumen final de 50 µl, con un perfil térmico de 98°C por 30 s; 35 ciclos de 98°C por 10 s, 60°C por 20 s y 72°C por 10 s; y una extensión final de 2 min a 72°C. Se visualizó la presencia del fragmento esperado utilizando una alícuota de 10 µl de la reacción de PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrET. Al confirmar el tamaño esperado se purificó el fragmento a partir del volumen restante (40 µl) de la reacción de PCR empleando E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit PCR Clean Up Kit (Omega Bio-Tek). Se cuantificó el fragmento purificado mediante el sistema Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek). Luego, se utilizó el volumen correspondiente a 50 ng para realizar las reacciones de Golden Gate con cada uno de los fragmentos obtenidos como dador y el vector pGGK7-AtCas9-AtU6-Scaffold como receptor (Figura 2). Para esta reacción se incubó el ADN del receptor y del dador con 20 U de BsaI-HFv2 (NEBiolabs), 2000 U de T4 ADN ligasa (NEBiolabs) y 1x buffer T4 ADN ligasa ajustado a un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo siguiendo un ciclo térmico que inicia con 20 s a 37°C, seguido de 35 ciclos compuestos de 3 min a 37°C y 4 min a 16°C, terminando con 5 min a 50°C y 5 min a 80°C. Finalmente, con el producto de la reacción se procedió a la transformación de *Escherichia coli*.

**Tabla 1.- Partidores empleados para la introducción de los ARNgs.** Se subraya la secuencia que contiene el ARNg, los partidores F contienen los 20 nucleótidos que componen la secuencia de ARNg y los R el reverso complementario de la secuencia de ARNg seleccionada.

	Secuencia partidador (5' - 3')
ARNg_F	TTTTGGTCTCAATTG-N(20)-GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
ARNg_R	TTTTGGTCTCAAAAC-N(20)-CAATCACTACTTCGACTC
SIDIS1_ARNg_F	TTTTGGTCTCAATTG <u>CATTA</u> ACTTGCAAACGCAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
SIDIS1_ARNg_R	TTTTGGTCTCAAAAC <u>CCTGCGTTTGCAAGTTAATG</u> CAATCACTACTTCGACTC
SISINAT2_ARNg_F	TTTTGGTCTCAATTG <u>GTAATTACCTGGTAAAATGGG</u> TTTTAGAGCTAGAAATAGC
SISINAT2_ARNg_R	TTTTGGTCTCAAAAC <u>CCATTTTACCAGGTAATTAC</u> CAATCACTACTTCGACTC
SIACS1a_ARNg_F	TTTTGGTCTCAATTG <u>GTTGGTAGGGAAAAGAGG</u> TTTTAGAGCTAGAAATAGC

## 2.4 Transformación de *Escherichia coli* mediante shock térmico

Los vectores fueron transformados en la cepa TOP10 de *E. coli* quimiocompetente (Invitrogen). Para ello, se descongelaron viales con las células competentes en hielo y se les añadió 1µl del ADN a transformar y se incubó por 5 minutos en hielo, luego se le aplicó el shock térmico a 42°C durante 40 s, tras lo cual se les añadió 1mL de medio LB (1% m/v triptona, 0,5% m/v extracto de levadura y 1% m/v NaCl) y se incubaron los tubos Eppendorf por 1 hora a 37°C a 250 rpm. Una vez cumplido el tiempo se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante dejando un remanente de aproximadamente 200µl en los cuales se resuspende el sedimento y se utilizan alrededor de 10 a 20 µl para sembrar en placas de medio LB-agar (agar-agar 14 g/L) suplementadas con espectinomicina 100 mg/L. Finalmente las placas fueron incubadas en oscuridad a 37°C por una noche.

## 2.5 Selección de colonias que portan los vectores de interés

Se seleccionaron colonias aisladas y se resuspendieron en 10 mL de medio LB líquido con espectinomicina 100 mg/L y se incubaron a 37° C por una noche con agitación constante a 250 rpm, estos se centrifugaron a 8000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, se eliminó aproximadamente 8 mL de sobrenadante y se procedió a la extracción del plásmido empleando E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek). Una vez purificados los plásmidos se cuantificaron con el sistema Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek) tras lo cual se realizaron dos digestiones enzimáticas, con las enzimas AvaII y XhoI (NEBiolabs). Para las reacciones de digestión se empleó 1µg de plásmido, 10 U de la enzima en cuestión y 1 mL del buffer rCutSmart (NEBiolabs) y se dejó incubando una hora a 37°C, luego de lo cual se visualizaron los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrET.

## **2.6 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* mediante shock térmico**

Los vectores fueron transformados en *A. tumefaciens* cepa GV3101::pMP90 quimiocompetentes mediante shock térmico. Para ello, se descongelaron en hielo las células competentes, se le agregó aproximadamente 500 ng del vector purificado y se incubaron en hielo por 20 minutos. Luego, se sumergieron en nitrógeno líquido por 5 minutos y se incubaron 5 minutos más en hielo, tras lo cual se les añadió 1 mL de medio LB y se incubaron a 28°C con agitación de 200 rpm por 4 horas. Se sembraron 100 µl de la suspensión en placas de medio LB-agar (agar-agar 14g/L) suplementadas con rifampicina (10 mg/L), gentamicina (30 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L), y se incubaron las placas en oscuridad por 48 h a 28°C.

## **2.7 Preparación de *A. tumefaciens* para la transformación de tomate Poncho Negro**

Para la transformación de tomate PN, se prepararon inóculos de *A. tumefaciens* transformada con su respectivo vector en 30 mL de medio LB líquido suplementado con sus respectivos antibióticos de selección, el cual se incubó por aproximadamente 48 h a 28°C con agitación a 200 rpm. Estos inóculos se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, el sedimento fue cuidadosamente re-suspendido en medio MS (Murashige-Skoog) 1x (MS 1x y sacarosa 1% m/v) (Murashige y Skoog, 1962), ajustando su concentración con una densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) entre 0,2 y 0,4. A estas suspensiones bacterianas se le suplementó con acetosiringona 100 µM y se incubaron durante 2h a 28°C con agitación a 200 rpm.

## **2.8 Agro-infiltración de hojas de tomate Poncho Negro**

En este seminario de título se estandarizó y determinó las condiciones para agro-infiltrar hojas de PN. Con la finalidad de comprobar la viabilidad de la agro-infiltración de hojas de PN, se utilizó un clon de *A. tumefaciens* que contenía un vector que expresa en plantas el constructo reportero RUBY (35S:RUBY) (He y cols. 2020), el cual consta de tres genes que permiten la síntesis de betalaínas,

pigmentos naturales de color rojo que darán la evidencia colorimétrica de la eficiencia en transformación. Para esto se infiltraron hojas jóvenes y adultas de tomate PN y hojas adultas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) como control. Se reportaron los resultados colorimétricos a los 3, 5 y 7 días post infiltración (dpi). Una vez determinadas las condiciones de infiltración y tiempo de transformación, se realizó una transformación transitoria con los vectores generados en hojas jóvenes de tomate PN y a los 5 dpi se extrajeron las hojas para su análisis.

## **2.9 Transformación estable de explantes de tomate Poncho Negro**

La transformación estable de PN se realizó empleando explantes de tallo y hojas de plantas crecidas en cultivo *in vitro*, los que se pre-cultivaron por 2 días en medio MS sólido PN (MS 1x, sacarosa 1% m/v y agar 0,7 % m/v), suplementado con las fitohormonas N6-bencilaminopurina (BAP) (2mg/L) y ácido indol-3-butírico (IBA) (0,1 mg/L). Para la transformación se incubaron durante 20 minutos los explantes en aproximadamente 45 mL de una suspensión preparada de *A. tumefaciens* que contiene el vector a transformar, se eliminó el excedente de líquido en papel absorbente y se traspasaron los explantes al medio de co-cultivo que corresponde al medio MS PN suplementado con acetosiringona 100 µM. Se incubaron en oscuridad por 48 h, para luego traspasarse a medio MS PN suplementado con timentin a 300 mg/L, medio que se refrescó cada 2 semanas y se evaluó la sobrevida y desarrollo de callos desde los explantes.

## **2.10 Extracción de ADN genómico y digestión enzimática**

Para la extracción de ADN genómico se utilizó FavorPrep Plant Genomic DNA Extraction Kit (Favorgen) según las instrucciones del fabricante y se cuantificó empleando el sistema Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek).



## 2.11 Detección de edición mediante PCR

Se realizó PCR de punto final empleando partidores que bordeaban los genes objetivo (Tabla 2) con el propósito de detectar eventos de edición. Las reacciones de PCR de punto final fueron realizadas empleando 1,25 U de Taq DNA Polymerase, 1x PCR reaction buffer (Sigma-Aldrich), 0,5  $\mu$ M de cada primer, 0,2  $\mu$ M dNTPs y 50 ng de ADN en un volumen final de 25  $\mu$ l. El perfil térmico para la amplificación del fragmento del gen *SIACSIa* editado fue de 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 30 s y 72°C por 45 s; y una extensión final de 5 min a 72°C. Para el gen *SISINAT2* se empleó un perfil térmico de 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min y 45 s; con una extensión final de 5 min a 72°C. Para el gen *SIDISI* se empleó un perfil térmico de 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 3 min; con una extensión final de 5 min a 72°C. Para la revisión de la presencia de Cas9 con ambos juegos de partidores se utilizó un perfil térmico de 95°C por 3 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1 min; con una extensión final de 5 min a 72°C y se visualizaron los resultados en gel de agarosa al 2% teñido con BrET. Para verificar la viabilidad del material genético para realizar PCR se amplificó el gen de referencia  $\alpha$ -tubulina empleando el mismo perfil térmico que se empleó para el gen *SISINAT2* (Tabla 2) y se visualizó el resultado en gel de agarosa 1,5% teñido con BrET.

**Tabla 2.- Partidores empleados para determinar la edición de los genes *SIDISI*, *SISINAT2* y *SIACSIa*, comprobar viabilidad de PCR y detectar presencia de AtCas9**

#	Partidores (5'- 3')	Características	Amplicón
SIDis1_F	GTGTCCACCAATAAATCGCCT	48% GC Tm: 57°C	5800 pb
SIDis1_R	AGAAGTTTATGTGGGCCCT	50% GC Tm: 58°C	
SISinaT2_F	AATATGGCTCCTGGTGGTGG	55% GC Tm: 59°C	2116 pb
SISinaT2_R	AGGCGGTGCTTATTTCCAGA	48% GC Tm: 58°C	
SIACs1a_F	TTGGTGCAGTAAACTTCCGC	50%GC Tm: 57°C	3310 pb

SIacs1a_R	CGCATCTCAAACCTAAAATACTCAAT	32% GC Tm: 52°C	
$\alpha$ tub_F	GCTGAGGTCTTCTCACGCAT	55% GC Tm: 59°C	221 pb
$\alpha$ tub_R	CAAACAAAGCCATCCCGTGTT	48% GC Tm: 58°C	
Cas9_F1	ACTAAGGCTGAGAGGGGAGG	60% GC Tm: 59°C	1090 pb
Cas9_R1	GCTTGTGCTGCTCAACGAAA	50% GC Tm: 59°C	
Cas9_F2	CTCGCTCTCGCTCACATGAT	55% GC Tm: 59°C	1318 pb
Cas_R2	GGTAGGTTCCGAGAGATGCG	60% GC Tm: 60°C	

## 2.11 Rediseño de ARNGs

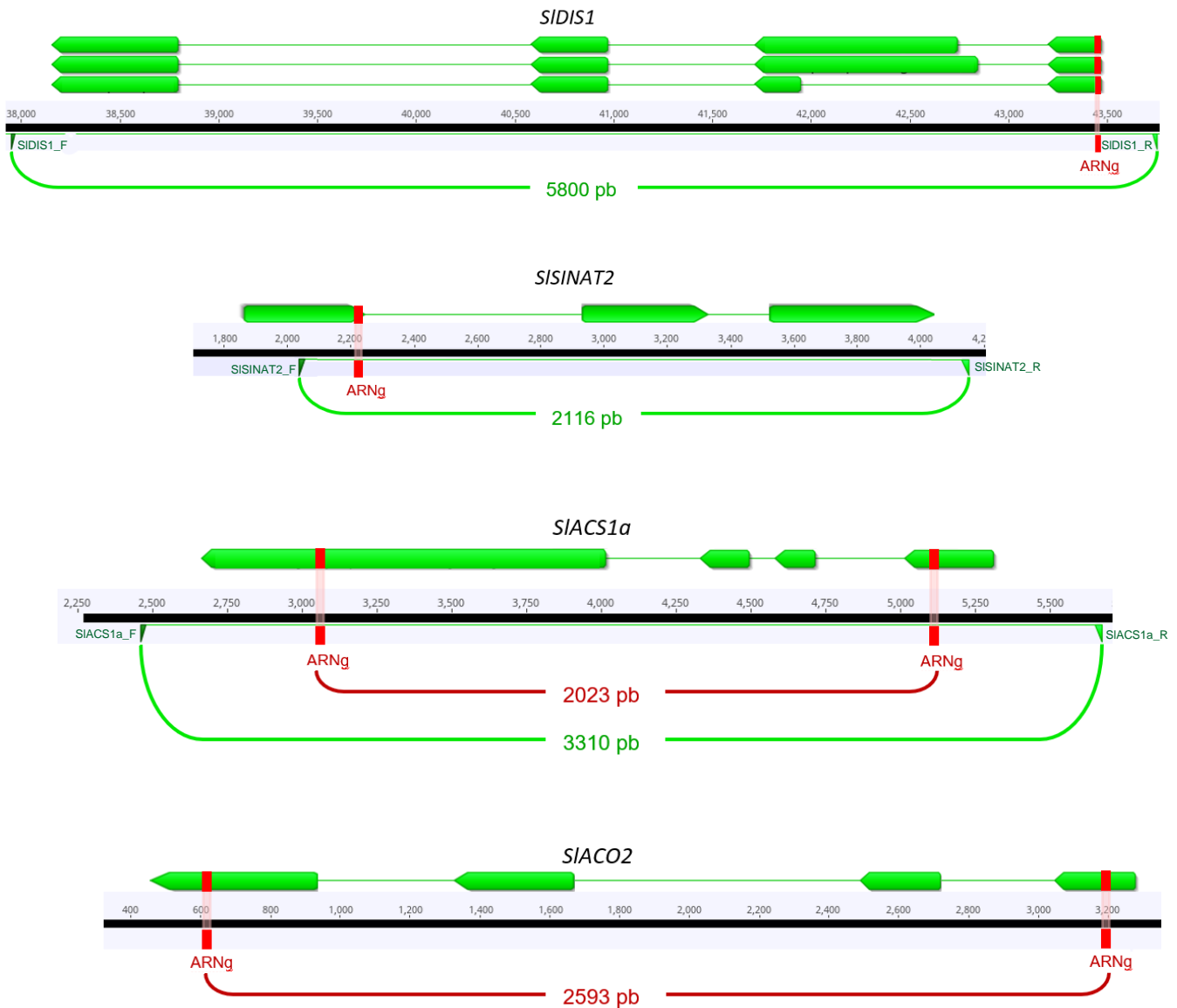
En vista de los resultados preliminares y las problemáticas asociadas a la verificación de la edición, se optó por rediseñar los ARNGs con el enfoque de que sean verificables mediante la digestión con enzimas de restricción. Para ello, se generó un programa en Python que acepta los resultados de los ARNGs generados por herramientas como el programa Geneious (v2023.0.1) (<https://www.geneious.com>), así como diversas plataformas web como CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no>), CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) y Benchling (<https://benchling.com>). El programa filtra los ARNGs que son verificables mediante enzimas de restricción, es decir, aquellos cuyo sitio de reconocimiento se encuentra entre los nucleótidos que serán escindidos por la acción de Cas9. Además, el programa cuida de mostrar al menos una medida de eficiencia y una medida de especificidad, y agrega datos relevantes para el diseño de ARNGs como el contenido de GC y la presencia de posibles secuencias terminadoras para el promotor U6 que se utiliza en este sistema.

### 3. Resultados

En el marco del proyecto anillo ACT192073 se propuso editar genes reguladores negativos de la tolerancia a estrés abiótico como salinidad y sequía en tomate PN. El estudio bibliográfico y bioinformático permitió seleccionar algunos genes candidatos y tras determinar de manera preliminar su expresión en condición de salinidad y sequía en PN y tomate comercial ACE (Díaz, 2023) se seleccionaron varios genes como *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACSIa* y *SIACO2* para su edición en PN. Para llevar a cabo la edición se buscó generar un vector que expresara en tomate PN la proteína Cas9 en conjunto con un par de ARNGs con el objetivo de editar los genes seleccionados, los que se postula que regulan de manera negativa la respuesta a sequía y/o salinidad, por lo que su *knockout* podría mejorar la respuesta del organismo a estas condiciones. En el presente trabajo se participó de manera directa en el desarrollo de los vectores para editar los genes *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACSIa* y *SIACO2*, y determinar su edición mediante un ensayo de transformación transitorio y estable.

#### 3.1 Diseño de ARNGs

Para comenzar empleando el software Geneious Prime se diseñaron ARNGs de 20 nucleótidos que tuviesen la secuencia PAM canónica de Cas9 (...NGG) y que se encontrasen dentro de algún exón de los genes. Para los genes *SISINAT2* y *SIDIS1* se seleccionó un ARNg que se encontraban en el primer exón del gen y que mostraron la más alta eficiencia de edición *in silico* junto con nulos “off-targets”, y para los genes *SIACSIa* y *SIACO2* se seleccionó una pareja de ARNGs en dos exones distintos del gen buscando posibilitar que ocurran eventos de escisión de la sección entre los dos exones blanco para facilitar la detección de la edición (Brooks y col., 2014) (Figura 3)



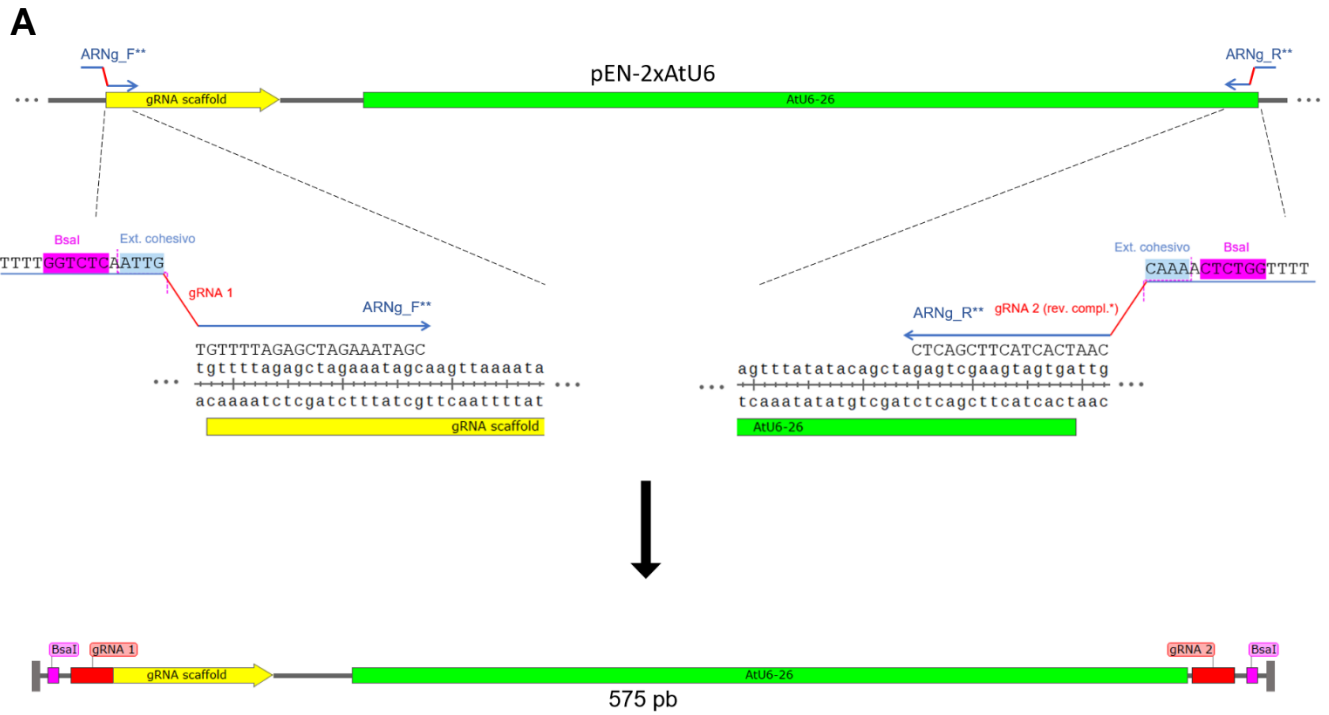
**Figura 3.- Esquema de los ARNgs seleccionados para los genes *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACS1a* y *SIACO2*.** Los ARNgs seleccionados se muestran de color rojo sobre las múltiples isoformas de los transcritos de los respectivos genes en *Solanum lycopersicum* var. Heinz; aquellos casos donde se seleccionaron dos ARNgs se muestra también la distancia en pares de bases (pb) de estos. También, se diagraman los partidores empleados para la amplificación de la mayor parte del gen en color verde junto al tamaño del amplicón generado (Tabla 2)

Para generar la edición se seleccionó el vector pGGK7-AtCas9-AtU6-Scaffold (pGGK7) que expresa la proteína AtCas9 en plantas y permite la introducción de una secuencia mediante Golden Gate (Figura Suplementaria 2). La secuencia Cas9 en este vector es una versión codón-optimizada de la

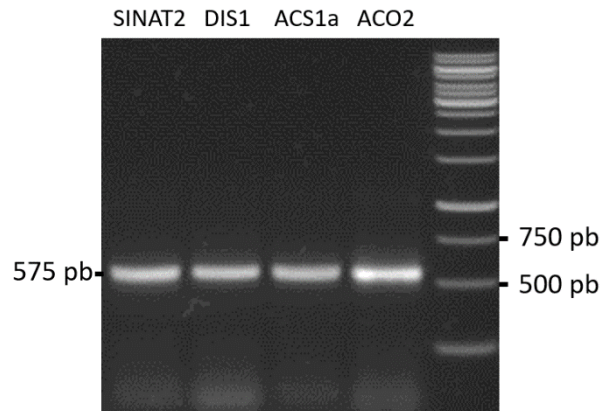
proteína proveniente de *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9), diseñada para su utilización en plantas, particularmente *Arabidopsis thaliana* la cual le otorga su prefijo. Siguiendo la descripción metodológica de 2.3 se generaron cuatro vectores para expresar un ARNg o una pareja de éstos para la edición de *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACS1a* y *SIACO2* en tomate PN. Para ello, se generó una secuencia que contuviera ambos ARNgs diseñados para la edición de cada gen, para lo cual se empleó como molde el vector pEN-2xAtU6 (Figura 4) (Figura Suplementaria 1) que permitió la generación de un fragmento que contenía a la pareja de ARNgs y que cuyos extremos eran susceptibles a Golden Gate (GG) con la enzima BsaI y compatibles con los extremos que esta enzima genera en el vector pGGK7, permitiendo la integración del fragmento en el vector pGGK7 facultando que este exprese ambos ARNgs con su respectiva secuencia de andamiaje (“gRNA scaffold”) (Figura 5). El paso inicial en este proceso es la generación de un fragmento de 575 pb el cual contiene la pareja de ARNgs seleccionados, en conjunto con una secuencia de andamiaje seguida del promotor U6 ARN pol III de *Arabidopsis thaliana* (AtU6-26). Para ello se diseñaron partidores y fueron enviados a sintetizar a IDT (Integrated DNA Technologies) (<https://www.idtdna.com>) con la finalidad de propiciar la obtención de dicho fragmento con la mínima presencia de mutaciones posibles. Se empleó la polimerasa de alta fidelidad Q5 (NEBiolabs), la cual muestra una tasa de error de alrededor de  $5.3 \times 10^{-7}$  (Potapov & Ong 2017) para la amplificación. Tras verificar la presencia del fragmento esperado (Figura 4 B) se procedió a insertar el fragmento purificado en el vector pGGK7 mediante la reacción de GG mediante la enzima de restricción BsaI (Figura 5).

**Tabla 3.- Detalles de ARNgs seleccionados.** Valores de especificidad y actividad proporcionados por el software Geneious Prime. Puntaje de actividad o eficiencia de Doench (Doench y col., 2016) y puntaje de especificidad de Zhang (Hsu y col., 2013)

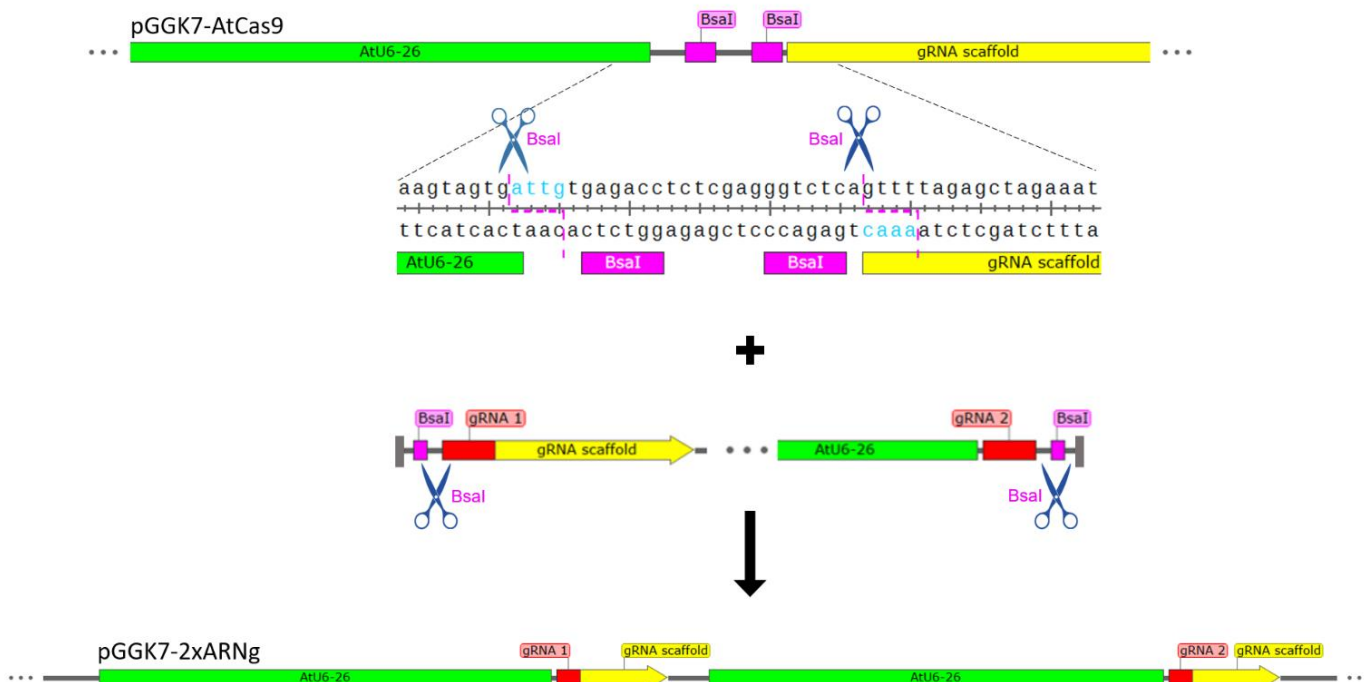
Nombre	Secuencia (5'-3')	Especificidad (0-100%)	Actividad (0-1)
Dis1 ARNg 1 y 2	CATTAACCTTGCAAACGCAGG	100%	0.614
SinaT2 ARNg 1 y 2	GTAATTACCTGGTAAAATGG	100%	0.682
Acs1a ARNg 1	GTGTTTGGTAGGGAAAAGAG	71.43%	0.484
Acs1a ARNg 2	GAATTCATCGGAGAGTGAGC	71.43%	0.568



**B**



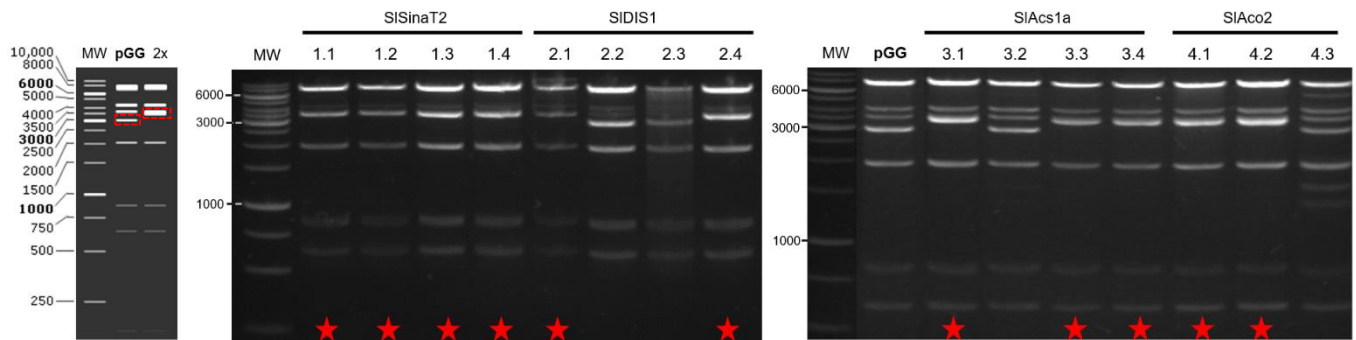
**Figura 4.- Construcción del fragmento que contendrá la pareja de ARNGs a introducir en el vector pGGK7-AtCas9.** A) vector pEN-2xAtU6 empleado de molde o receptor en esta reacción, utilizando el fragmento ampliado que contiene la secuencia de andamiaje (“gRNA scaffold”) seguido de la secuencia del promotor (AtU6-26). Los partidores empleados para introducir la pareja de ARNGs (ARNg\_F y ARNg\_R) poseen la secuencia blanco de la enzima BsaI para posibilitar reacciones de Golden Gate y otorgar direccionalidad, estos son diseñados con los extremos cohesivos compatibles con el vector destino (pGGK7). El resultado de la amplificación mediante la polimerasa de alta fidelidad Q5 es un fragmento de 575 pb que contiene los sitios de corte de BsaI y ambos ARNGs. B) Electroforesis en gel de agarosa para verificar el fragmento resultante para cada uno de los genes estudiados. \*el partidore ARNg\_R debe contener el reverso complementario del “gRNA 2” para que se oriente de manera correcta en el fragmento final. \*\*Se nombran de manera general ARNg\_F y ARNg\_R a los partidores empleados y se listan en Tabla 1.



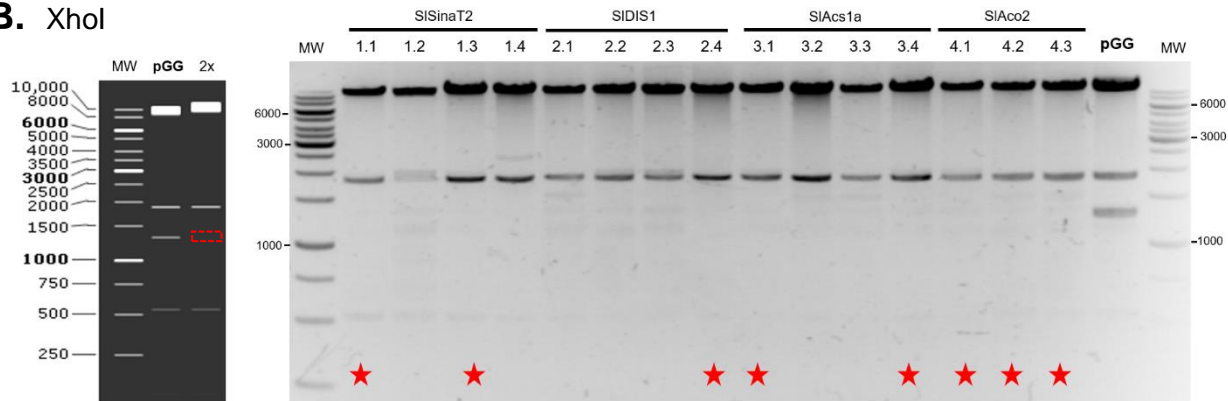
**Figura 5.- Construcción de vector pGGK7-2xARNgs.** Se presenta la sección receptora de Golden Gate con la enzima BsaI del vector pGGK7-AtCas9. Se lleva a cabo una reacción de Golden Gate con la enzima BsaI empleando el vector pGGK7-AtCas9 y el fragmento que contiene la pareja de ARNGs obtenido a partir de pEN-2xAtU6 (Figura 4 A). Obteniendo la inserción del fragmento dentro del vector pGGK7-AtCas9, renombrándolo como pGGK7-2xARNgs ya que permitirá expresar ambos ARNGs introducidos.

Para seleccionar el vector esperado a partir de la reacción GG se transformó *E. coli* y se seleccionaron colonias para aislar el vector objetivo. Para dicha selección se llevó a cabo una primera revisión con la enzima AvaII y una segunda confirmación mediante la utilización de la enzima XhoI (Figura 6). Ambas enzimas se seleccionaron porque posibilitan observar fácilmente la presencia del vector pGGK7-2xARNgs. De esta manera se obtuvieron los vectores pGGK7-2xARNgs-SISINAT2, pGGK7-2xARNgs-SIDIS1, pGGK7-2xARNgs-SIACS1a y pGGK7-2xARNgs-SIACO2, el vector pGGK7-2xARNgs-SIACO2 fue utilizado por Maximiliano Díaz (2023) en su tesis de magíster.

## A. *Ava*I



## B. *Xho*I



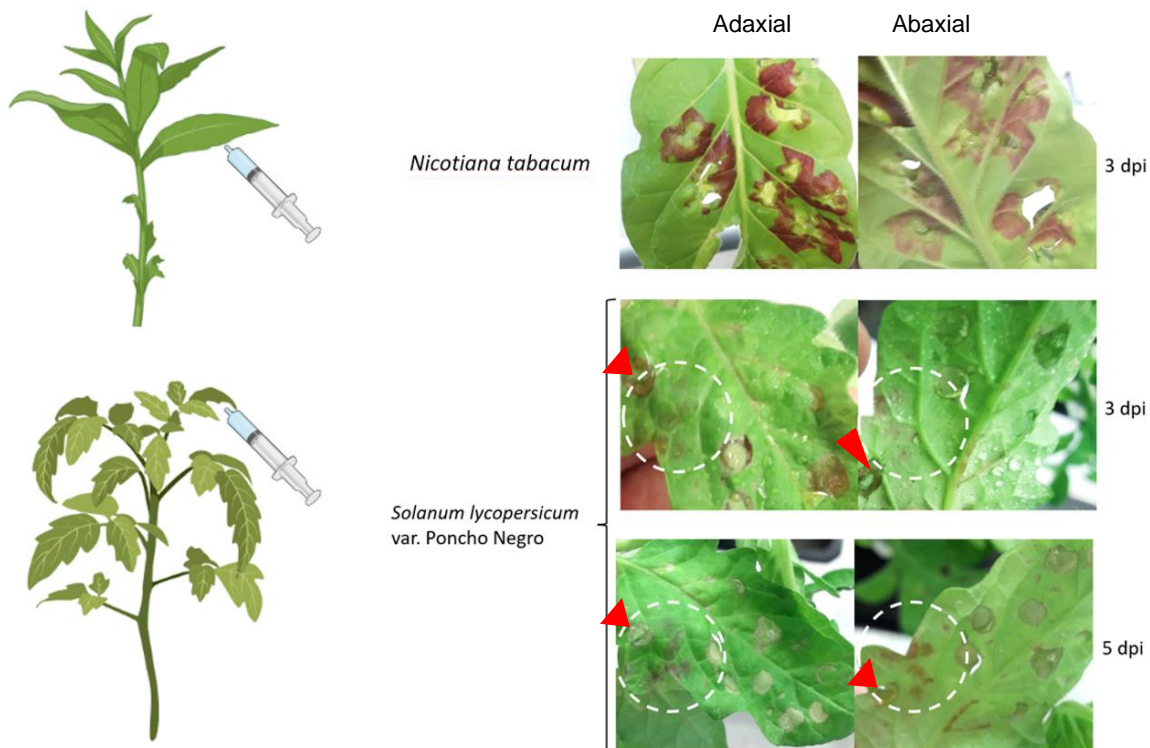
**Figura 6.- Digestión enzimática mediante las enzimas *Ava*I y *Xho*I para comprobar la obtención del vector binario de edición para los genes *SISINAT2*, *SIDIS1*, *SIACS1a* y *SIACO2*.** A) Detalles de la digestión enzimática mediante *Ava*I la cual muestra un fragmento de 3000 pb que incrementa a 3500 pb (se destaca en una cuadrícula roja) producto de la inserción del fragmento con ambos ARNGs (Figura Suplementaria 4). B) Detalles de la digestión enzimática mediante *Xho*I; la principal diferencia observable por este método es la pérdida de un sitio de corte de la enzima producto de la reacción de Golden Gate (Figura Suplementaria 5) lo que se refleja en ausencia del fragmento de aproximadamente 1300 pb que se destaca con una cuadrícula roja. Se marca con una estrella roja aquellos clones que muestran un patrón de digestión correspondiente a la inserción del fragmento portador de la pareja de ARNGs. De esta manera se puede aislar al menos un vector por cada gen que muestre un patrón correspondiente a la inserción del fragmento. **MW** indica el marcador de peso molecular, **pGG** el vector vacío y **2x** el vector con la pareja de ARNGs insertados. Se marcan con estrellas rojas los clones con el patrón esperado.

### 3.2 Agro-infiltración de hojas de tomate Poncho Negro

Buscando evaluar la funcionalidad de los vectores diseñados y los ARNGs seleccionados, y tras evaluar la complejidad y el tiempo que conlleva la transformación estable a partir de explantes de tomate PN, se decidió realizar de manera paralela estudios de transformación transiente mediante agro-infiltración de hojas de tomate PN.



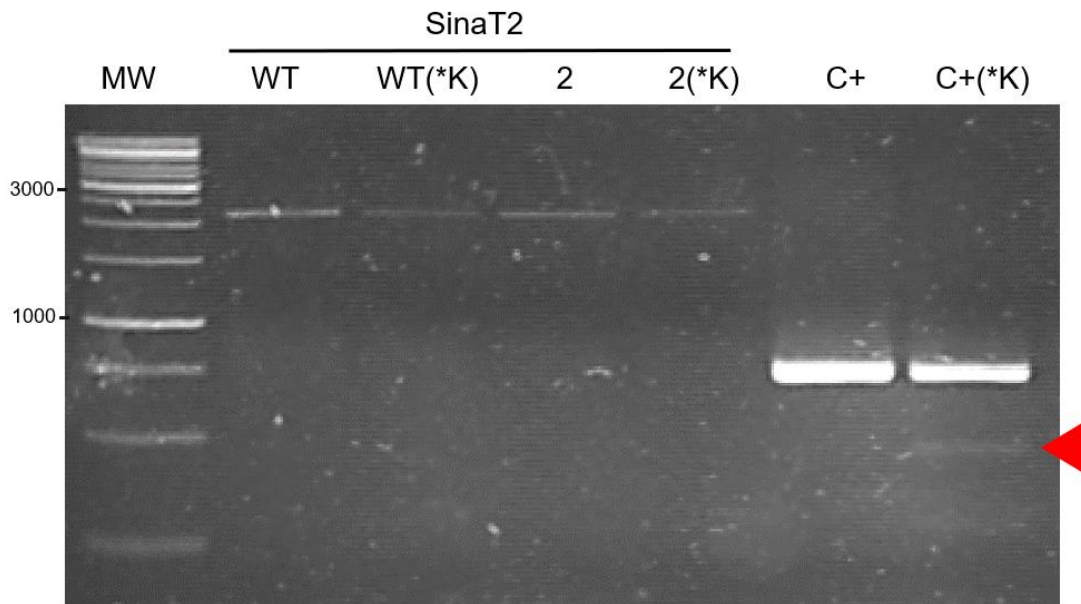
Para ello, se realizó de manera preliminar una estandarización de la infiltración transiente en PN mediante la expresión transitoria de un constructo reportero, como es el vector 35S:RUBY el cual en su expresión muestra una coloración roja apreciable de manera macroscópica (He y col., 2020). En este ensayo se utilizó como planta modelo *Nicotiana tabacum* y se comparó con hojas de distinto tamaño de tomate PN. En *N. tabacum* se observa una alta coloración en todas las hojas infiltradas y en la totalidad del área infiltrada a partir de los 3 días tras la infiltración, mientras que en tomate PN a los 3 días, de 1 de cada 4 hojas infiltradas muestran una leve coloración particularmente en la zona distal del área infiltrada (Figura 7). A los 5 días después de la infiltración la coloración roja se extiende levemente y pareciera aumentar en intensidad (Figura 7). En días posteriores la tonalidad rojiza aumenta, pero no parece incrementarse el área, manteniéndose en las zonas distales del área infiltrada. Lamentablemente, alrededor de 7-8 días empieza a presentarse tejido muerto focalizado en la zona donde se realizó la infiltración, la que se expande en días posteriores a la mayoría del área infiltrada. Además, se observó que la coloración se presentó mayormente en hojas jóvenes de aproximadamente entre 1/3 a 2/3 el tamaño de las hojas maduras de la planta. Con estos resultados se seleccionó el quinto día tras la infiltración como tiempo para la evaluación y las hojas nuevas con unas dimensiones aproximadas de 5 cm de largo con 3 de ancho (alrededor de 2/3 el tamaño aproximado de una hoja madura) para la agro-infiltración de PN con los vectores pGGk7-2xARNgs que se generaron.



**Figura 7.- Agro-infiltración de hojas de tabaco (*N. tabacum*) y tomate PN (*S. lycopersicum*) con 35S: RUBY. Se observa la coloración rojiza por la superficie adaxial y abaxial de las hojas producto de la expresión de RUBY a los 3 días post-infiltración (dpi) en tabaco y a los 5 días en hojas jóvenes de PN. En círculos se destaca la presencia de coloración en hojas de PN y con flechas rojas las zonas de infiltración en hojas de PN.**

Una vez determinado el tiempo y edad de hojas de PN más adecuadas para la agro-infiltración, se preparó el medio MS con *A. tumefaciens* que portan los vectores pGGK7-2xARNgs-SISINAT2, pGGK7-2xARNgs-SIDIS1 y pGGK7-2xARNgs-SIACS1a. Para la agro-infiltración se emplearon aproximadamente 10 mL de suspensión por hoja infiltrada y se infiltraron 2 hojas distintas para cada vector. Luego de 5 días se tomó tejido de la zona infiltrada y se realizaron 2 extracciones de ADN, con los cuales se procedió a revisar mediante PCR la edición de los genes candidatos. Para el *SIDIS1* no se obtuvo amplicón con los partidores seleccionados (datos no mostrados), mientras que para *SISINAT2* se obtuvo en todos los casos fragmentos amplificados de igual o similar tamaño al control silvestre (2116 pb) (Figura 8). Buscando verificar la edición en el gen *SISINAT2* se utilizó un kit de detección de CRISPR (CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit) (Applied Biological Materials Inc., abm) el cual

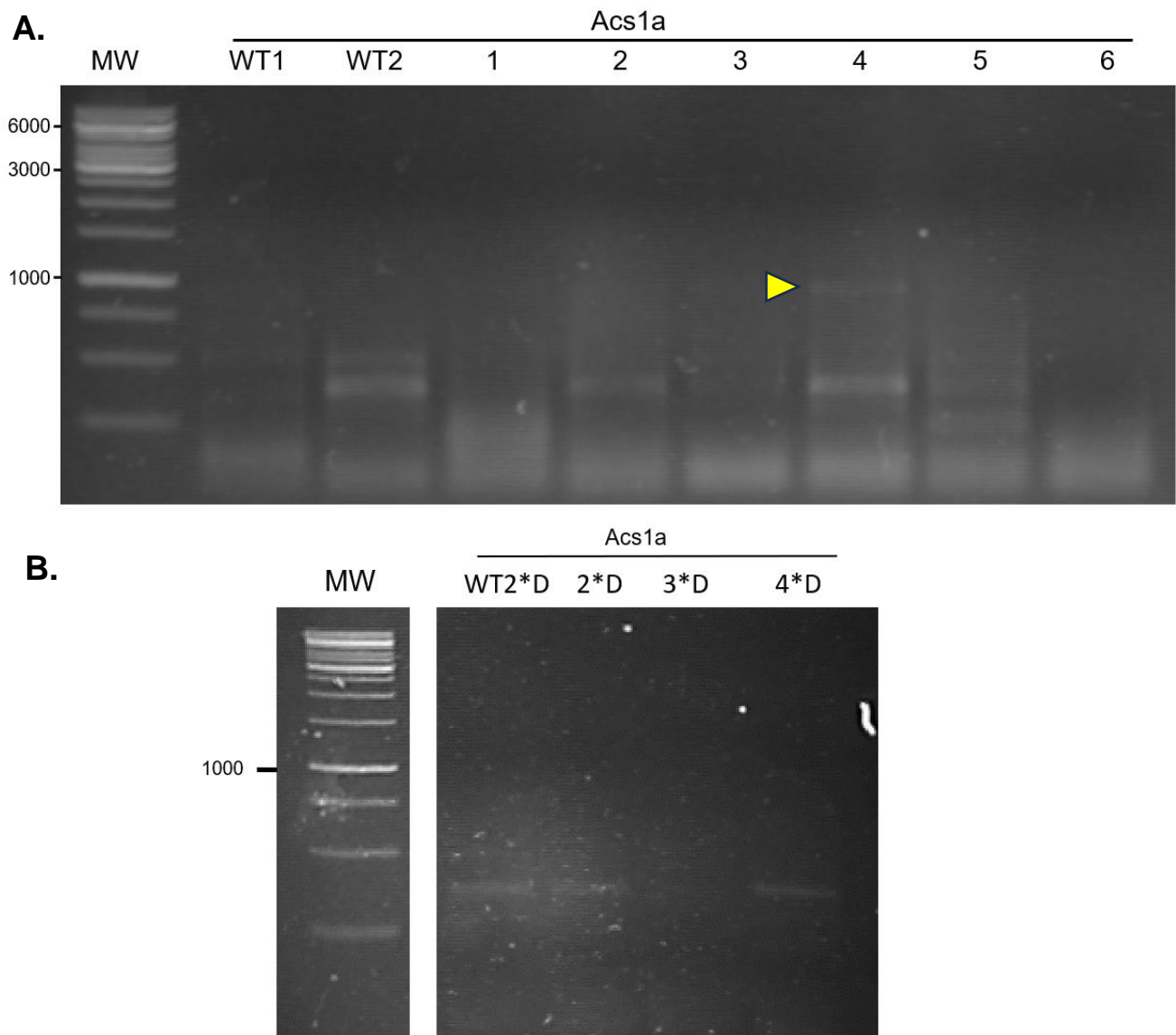
basa su funcionalidad en la utilización de una familia de endonucleasas específicas de *mismatches* en el apareamiento. Estas enzimas detectan sustituciones de bases o indels y los cortan con gran especificidad, lo que es observable cuando tratamos el producto del PCR de una muestra editada mediante CRISPR cómo se observa en el control positivo (C+ y C+\*) del kit y como se indica con la flecha de color rojo. Los resultados obtenidos no logran demostrar la presencia de un corte en el genoma por acción de Cas9 (Figura 8) ya que no se obtiene una banda menor en la muestra 2(\*K) que corresponde al ADN de hoja infiltrada tratada con el kit de detección, mostrando el mismo patrón de amplificación que el control WT, WT+K y la muestra 2 sin tratar. Esto sugiere que no hay edición del gen *SISINAT2* o mediante este método no es posible detectarlo.



**Figura 8.- Determinación de la edición del gen *SISINAT2* a partir de hojas de PN agro-infiltradas.** Electroforesis en gel de agarosa de resultados de PCR a partir de la extracción de ADN genómico de hojas de PN infiltradas. PCR del gen *SISINAT2* en hojas silvestres sin infiltrar (WT) e infiltradas con pGGK7-2xARNgs-SISINAT2 (2). Se aprecia una banda de alrededor de 2116 pb en WT y en 2 correspondiente al gen silvestre. Se sometió este material genético a un análisis usando CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit (\*K). Se puede apreciar la efectividad en el control positivo (C+(\*K)) usando ADNg incluido con el kit, al liberar un fragmento de menor tamaño (flecha de color rojo), lo que no se observa en WT y 2.

Para *SIACSIa* no se obtuvieron fragmentos amplificados del tamaño del gen silvestre (3310 pb) (Figura 3 y 9), aunque se observó una posible escisión del fragmento entre los ARNGs (2023 pb) (Figura 3 y 9A), al presentar un amplicón de alrededor de 1000 pb. Además, se encontraron múltiples casos que muestran la presencia de más amplicones de diversos tamaños bajo 1000 pb que también se obtuvieron en planta silvestre WT (Figura 9). Para profundizar en este último gen se realizó otro análisis de la posible edición mediante digestión enzimática con la enzima EcoRI considerando que la zona blanco de la edición de uno de los ARNGs de este gen podría llegar a incluir la secuencia de reconocimiento de la enzima EcoRI. Por tanto, si el gen se encontrase editado no debería digerirse con la enzima mostrando un patrón de bandas diferente al silvestre que si debiese ser digerido. Los resultados no muestran una diferencia clara entre los transformantes (2\*D, 3\*D y 4+D) y el silvestre (WT\*D) obteniendo en todos menos en 3\* un fragmento de ~500pb, cuya naturaleza es desconocida. Este resultado tampoco permite concluir la efectividad del ensayo ya que no se pudo obtener un fragmento completo del gen silvestre (3310 pb) (Figura 9B).

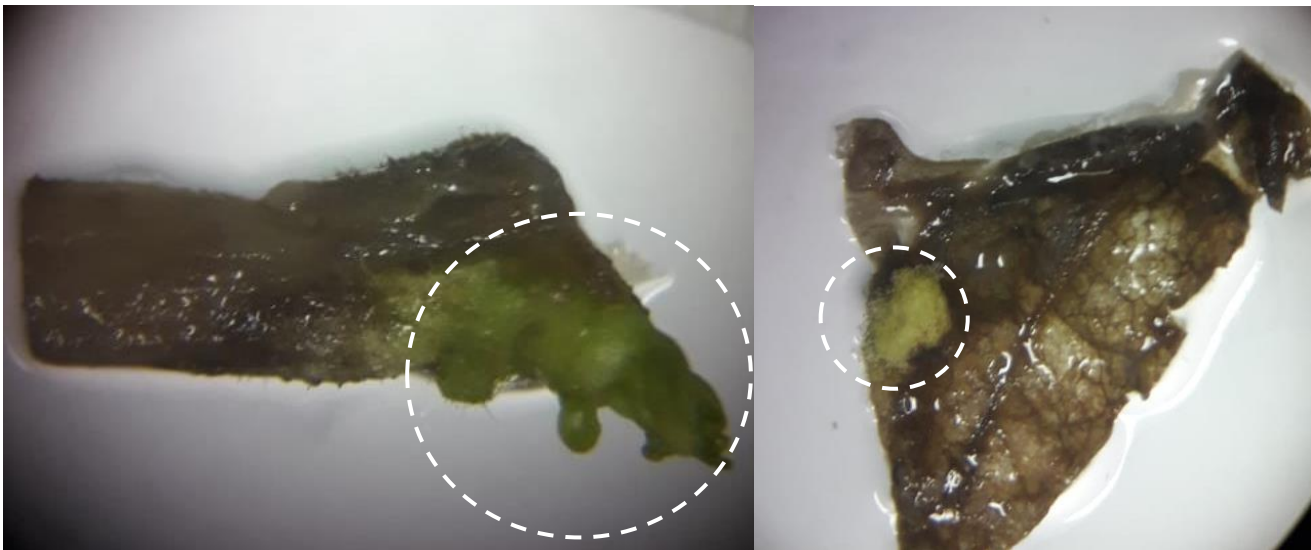
A pesar de que los resultados no son muy claros, la aparición de amplicones de menor tamaño al silvestre en *SIACSIa* pueden ser indicios de edición mediada por Cas9.



**Figura 9.- Determinación de la edición del gen *SIACSIa* a partir de hojas de PN agro-infiltradas.**  
 A) PCR del gen *SIACSIa*, no se aprecian amplicones del gen completo (3310 pb) se destaca un amplicón que podría ser correspondiente a una escisión relativamente limpia del fragmento entre lo ARNGs (~1000 pb) (Flecha amarilla). B) Digestión mediante EcoRI de fragmentos de PCR (\*D), aprovechando que un ARNG presentaba su sitio de corte cercano al sitio de reconocimiento de EcoRI se realizó una digestión del producto de PCR, esperando que frente a una posible edición no permita la digestión del fragmento.

### 3.3 Transformación estable de explantes de tomate Poncho Negro

En cuanto a la transformación estable de explantes, se realizaron múltiples ensayos sumando alrededor de 60 explantes (a partir de hojas y tallos) transformados con cada vector. Dada la alta sensibilidad observada previamente en el cultivo *in vitro* de estos explantes se optó por prescindir de la presión de selección de la transformación mediante el uso de antibiótico hasta observar un mayor desarrollo de los explantes y brotes.

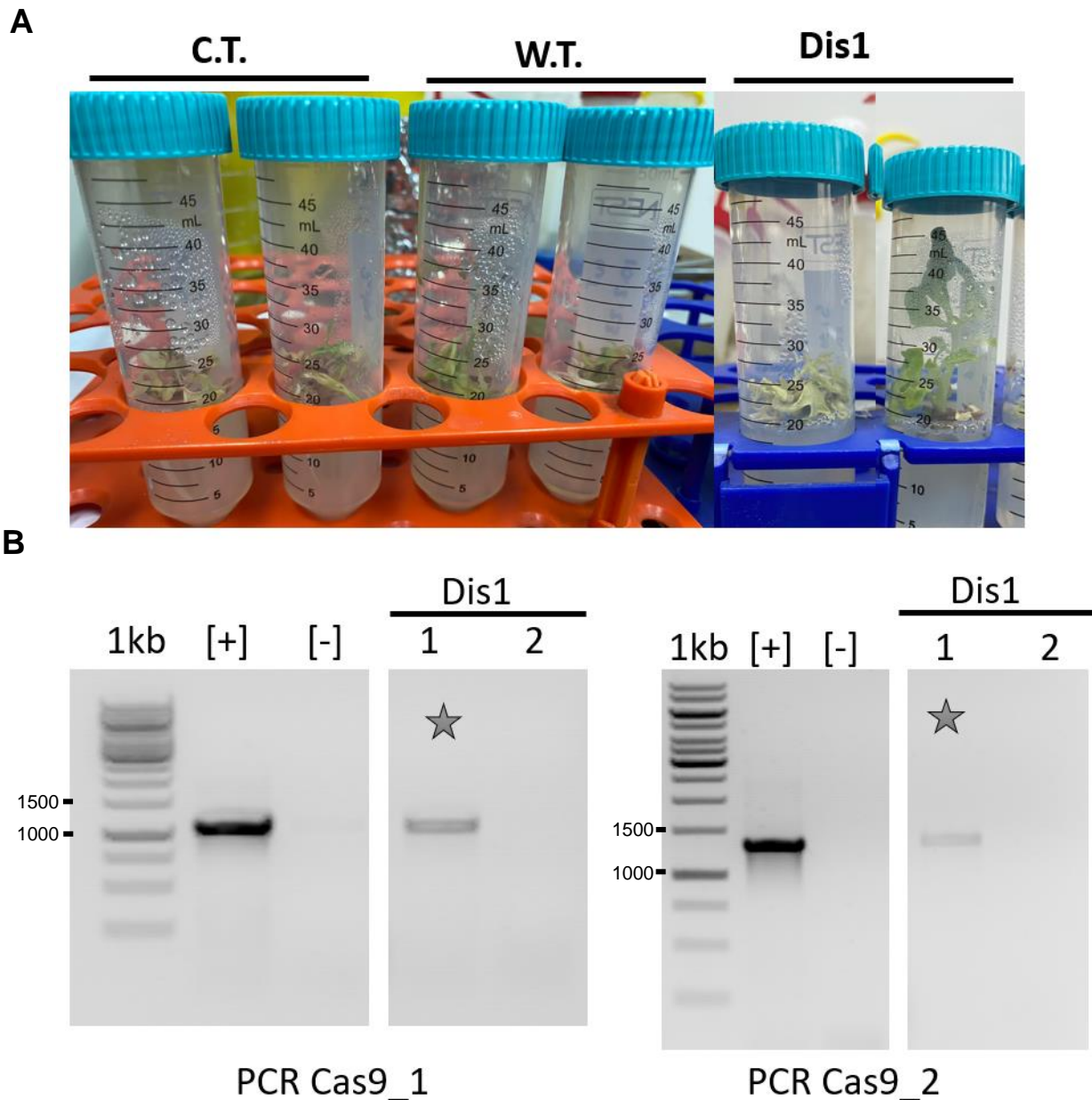


**Figura 10.- Imagen representativa del estado de los explantes de tallo y hojas de PN a las 6 semanas post transformación.** Ambos explantes aquí ilustrados tienen un largo de 1 cm, En círculos se destaca la presencia de tejido vivo que muestra indicios de callogénesis u organogénesis.

A las 6 semanas después de la transformación se observaron secciones de tejido que parecían estar formando callos o estructuras semejantes, pero también se observaba una gran proporción de tejido necrótico (Figura 10). En posteriores observaciones no se ven cambios en los posibles callos, mas si aumenta la cantidad de explantes muertos los cuales fueron removidos hasta que a las 8-9 semanas no quedaron explantes en desarrollo. Posterior a finalizar el trabajo experimental, los asistentes de investigación Christian González y Fabiana Munizaga obtuvieron brotes transformadas a partir de cotiledones de PN transformados con el vector pGGK7-2xARNgs-SIDIS1. De los brotes (Figura 11 A)



Fabiana Munizaga extrajo ADNg y evaluó mediante PCR la presencia de Cas9 logrando confirmar su amplificación mostrando una transformación efectiva (Figura 11 B), mas la edición génica queda pendiente por verificar.



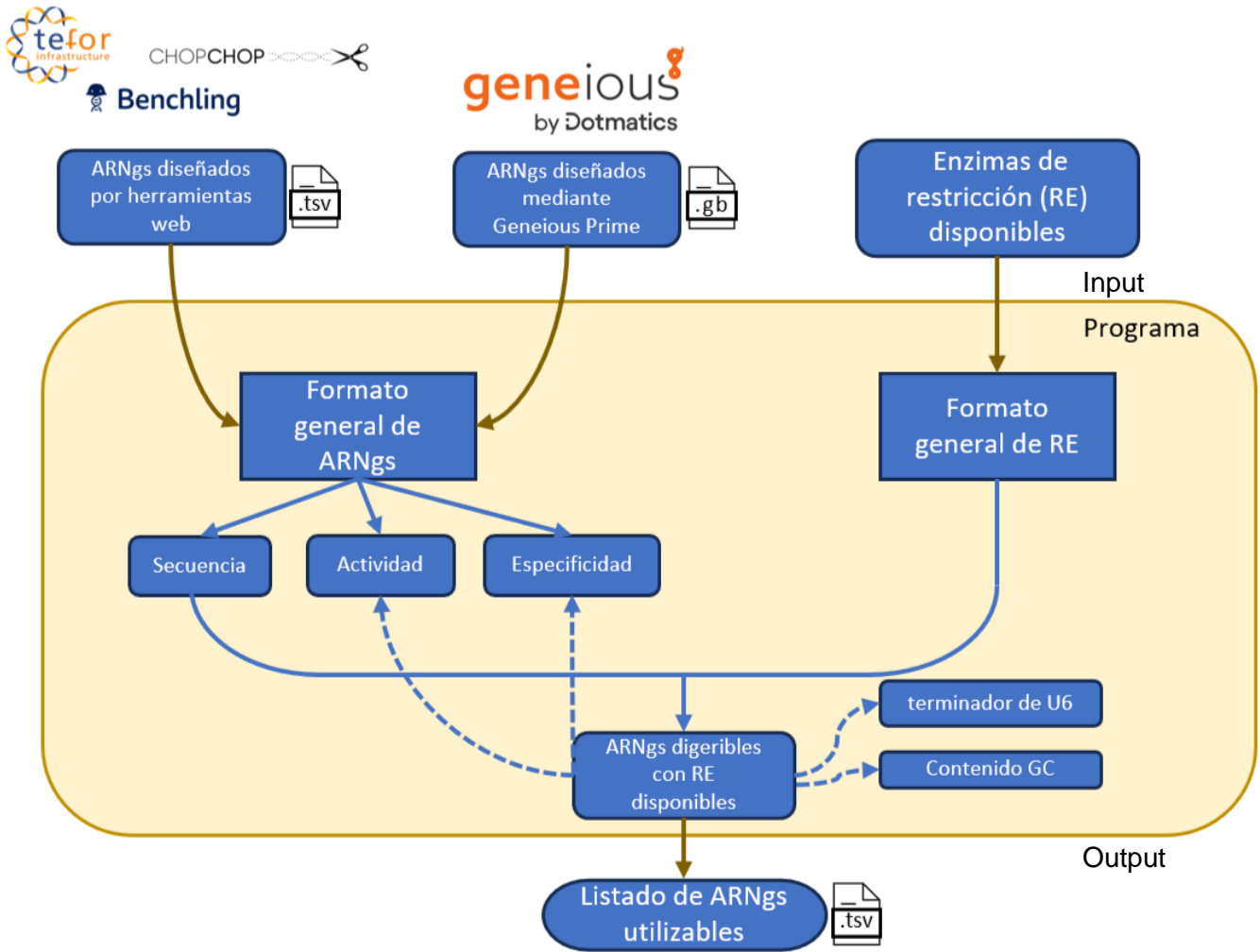
**Figura 11.- Brotes transformantes para la edición de *SIDIS1* en PN y su análisis molecular.** Se realizó transformación estable a partir de tejido de cotiledones de PN con el vector pGGK7-2xARNGs-SIDIS1. A) Se muestran los controles de transformación (C.T.) que corresponden a brotes transformados con un vector reportero 35S:RUBY, brotes PN silvestre (W.T.) y dos brotes regenerados de la transformación con pGGK7-2xARNGs-SIDIS1 B) Se determinó mediante PCR la presencia de gen de Cas9 con dos set de partidores listados en Tabla 2 en la muestra 1 de *DIS1*, indicando que el brote es

transgénico y podría presentar edición en *SIDISI*, se destaca con una estrella las muestras que presentan Cas9.

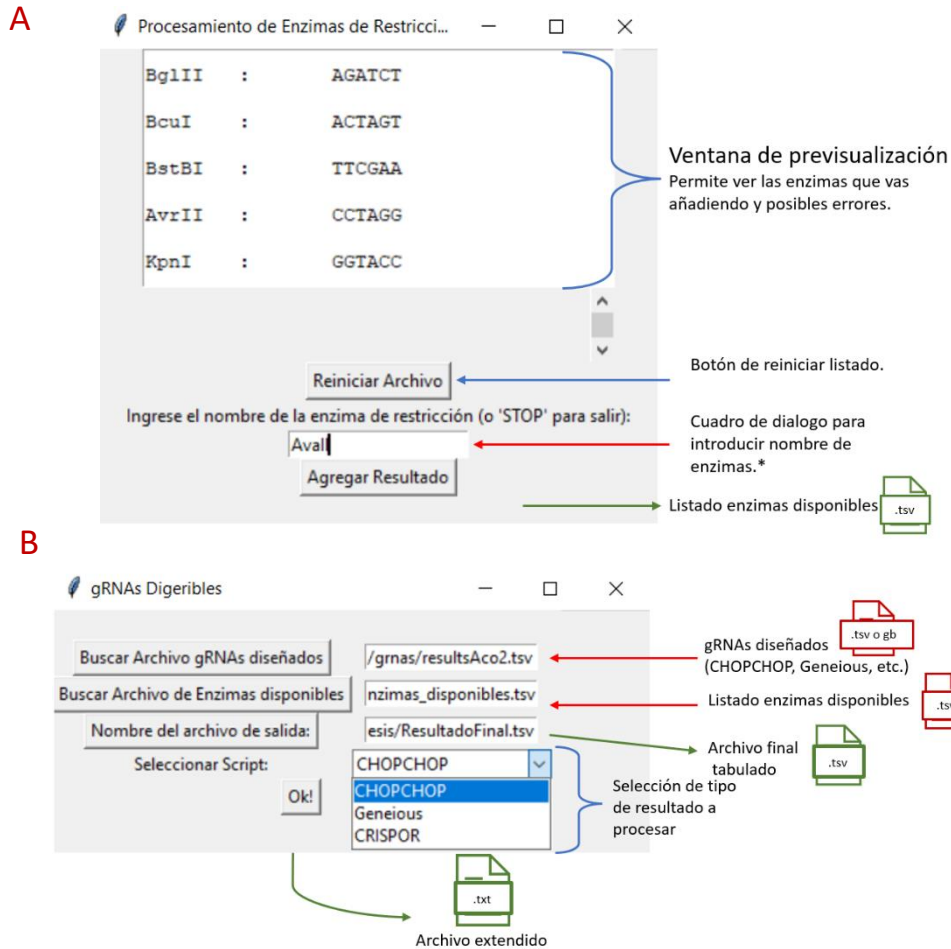
### **3.4 Rediseño de ARNGs y sistema de detección de la edición**

Considerando los resultados obtenidos y la dificultad de determinar la edición de los genes en sistema transitorio y en el/los brotes transgénicos de *SIDISI* y los siguientes que se obtendrán, proponemos aplicar un sistema confiable de análisis dado que las ediciones que produce Cas9 por lo general son indels de alrededor de 1 a 50 nucleótidos (Chakrabarti 2019). Para ello, se generó un programa que permite identificar rápidamente las enzimas de restricción asociadas a los ARNGs diseñados y utilizarlas para la digestión de los productos de PCR. Esta estrategia, además, advirtió que el programa permitirá diseñar ARNGs para futuras construcciones y seleccionar aquellos con buenos atributos de eficiencia y especificidad *in silico* y que además pudiesen ser verificados mediante digestión por enzimas de restricción disponibles en el laboratorio. De este modo se re-diseñaron los ARNGs empleando la herramienta web CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no>) y se filtraron los resultados empleando el programa generado (Figura 12), logrando reducir cientos de resultados posibles por cada gen en alrededor de 5 candidatos de ARNg por gen, que pueden ser verificados con las enzimas de restricción disponibles. En un ensayo, una vez filtrados los candidatos se seleccionaron manualmente aquellos que presentaban los más altos puntajes de eficiencia y especificidad, y no presentasen posibles secuencias terminadores del promotor U6 ARN pol III en su secuencia (Figura 12) o secuencias que se considerasen poco óptimas (Konstantakos 2022). Se listan los ARNGs seleccionados para los genes de este estudio en Tabla 4, y su posición dentro del gen en Figura 13.





**Figura 12.- Esquema general del programa generado para seleccionar ARNs verificables mediante digestion.** Utiliza como *inputs* el listado ARNs diseñados por múltiples plataformas web o el software Geneious Prime, y un listado de las enzimas de restricción disponibles; les otorga un formato general establecido y busca coincidencias de los sitios de reconocimiento de las enzimas dentro de la secuencia blanco de los ARNs, luego les otorga valores de interés como la actividad, especificidad, la presencia de secuencias terminadoras del promotor U6 y el contenido porcentual de guanina y citosina (GC %). Los resultados los entrega en formato de lista como *output*.



**Figura 13.- Interfaz de usuario prototipo de programa generado para seleccionar ARNgs verificables mediante digestión.** Se listan las entradas de datos (*inputs*) en color rojo, las salidas de datos (*outputs*) en color verde y detalles de la interfaz en color azul. A) Interfaz generadora del listado de enzimas de restricción, requiere solamente ingresar el nombre de cada una de las enzimas que se disponen. B) Interfaz del programa filtrador de los datos, requiere el listado de enzimas generado mediante A y el archivo de los ARNgs diseñados ya sea por CHOPCHOP, Geneious o CRISPOR. Y entrega como resultado un archivo tabulado con datos de actividad y especificidad de cada ARNg y un archivo extendido que entrega de manera detallada la enzima que corta cada ARNg y donde se encuentra el sitio de corte.

A

.tsv (CHOPCHOP, CRISPOR)

#	Secuencia Original	Reverso Complementario	Actividad	MM0	MM1	MM2	Contenido de GC	Terminador U6
24	GGGACCAAAAAGGCATCACcagg	cctGGTGATGCCTTTTGGTCCC	58.88	1	0	1	0.55	True
50	ATATGGTGTTGGGACCAAAAagg	cctTTTTGGTCCCAACACCATAT	44.75	1	0	0	0.4	True
51	CAGCTTATCGTTTCGAAGATtgg	ccaATCTTCGAAACGATAAGCTG	34.23	3	0	0	0.4	False

.gb (Geneious)

#	Secuencia Original	Reverso Complementario	Actividad*	Especificidad*	Contenido de GC	Terminador U6
45	GGGACCAAAAAGGCATCACcagg	cctGGTGATGCCTTTTGGTCCC	0.589	69.77%	0.55	True
46	ATATGGTGTTGGGACCAAAAagg	cctTTTTGGTCCCAACACCATAT	0.447	69.42%	0.4	True
121	CAGCTTATCGTTTCGAAGATtgg	ccaATCTTCGAAACGATAAGCTG	0.342	71.43%	0.4	False

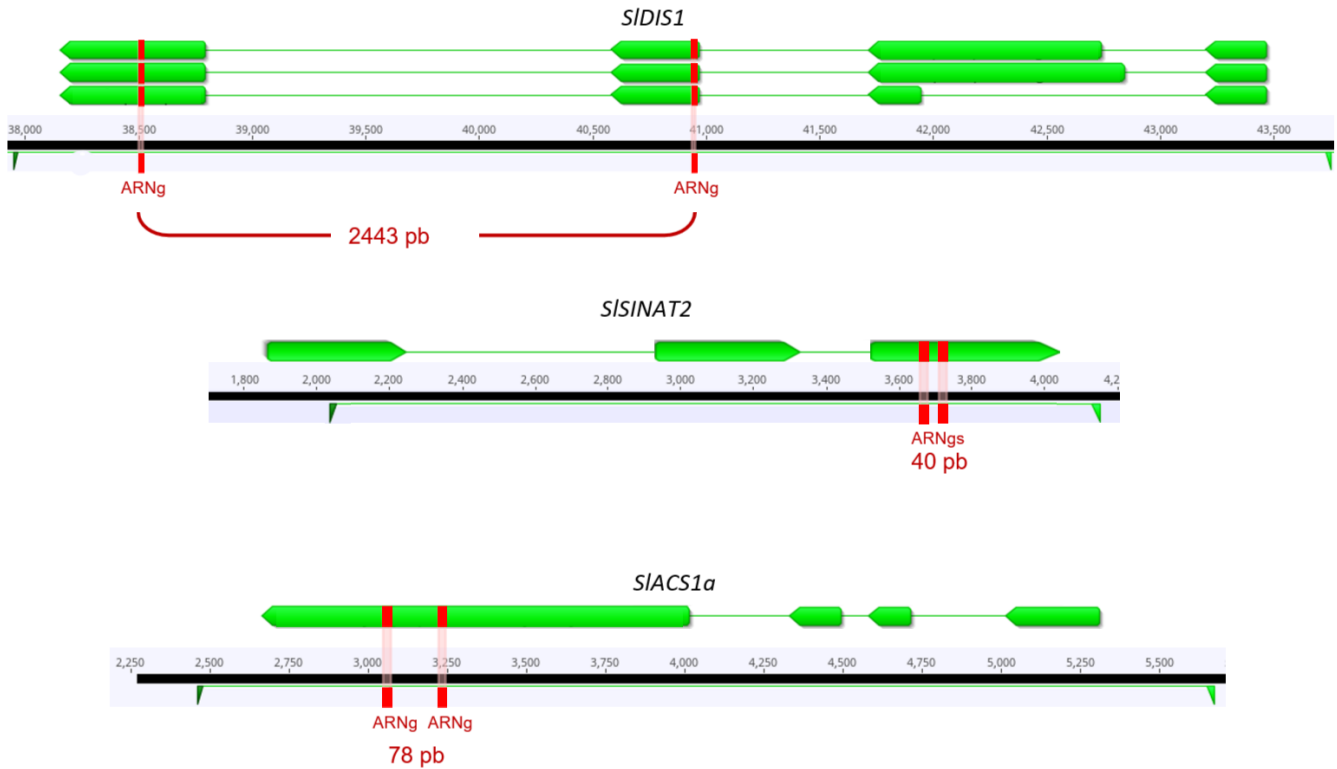
B

```

20 -----
21 Resultado para el gRNA 121: CAGCTTATCGTTTCGAAGATtgg
22 Contenido de GC: 0.40%
23 Reverso complementario para el gRNA 121: ccaATCTTCGAAACGATAAGCTG
24 Especificidad: 71.43%, Actividad: 0.342
25 +
26 Coincidencias encontradas en el gRNA original 121:
27 - Coincidencia BstBI 'TTCGAA': Posiciones: 11
28 Coincidencias encontradas en el reverso complementario 121:
29 - Coincidencia BstBI 'TTCGAA': Posiciones en el reverso: 6
30 -----
31 gRNAs viables para digestión con las enzimas disponibles: 3 de 147 analizados
  
```

Enzima que digiere esta secuencia y posición de inicio del sitio de reconocimiento

**Figura 14.- Archivos finales del programa.** A) Datos tabulados a partir de un archivo “.tsv” (CHOPCHOP o CRISPOR) o “.gb” (Geneious), en ambos casos se mantienen 4 características de cada ARNg, su actividad, especificidad, proporción de GC (GC%) y la presencia del terminador U6.\* los valores de actividad y especificidad son extraídos por la herramienta inicial de diseño empleada y pueden variar en escala, en caso de CHOPCHOP, este no entrega un valor numeral de especificidad por lo que se optó por entregar la presencia de *mismatches* en su defecto. B) Archivo extendido el cual muestra la enzima que digiere dicha secuencia y donde se posiciona esto ayuda a comprobar si la enzima tiene su sitio de reconocimiento en el sitio de corte de Cas9.



**Figura 15.- ARNGs seleccionados tras el rediseño a través del programa generado.**

**Tabla 4.- Detalles ARNGs seleccionados tras el rediseño.** Se listan la secuencia de los seleccionados con su respectivo valor de eficiencia *in silico* generado mediante la plataforma web CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no>)(escala del 0 al 100) y su posición dentro del respectivo gen, además se priorizaron aquellos ARNGs sin ninguna secuencia *off-target* que no presentase *mismatches* (MM0) ni secuencias terminadoras del promotor U6 en su secuencia.

	Secuencia (5'-3') + PAM	Eficiencia (0-100)
SIDis1_ARNg_1	TGTGTTCTGGTTGCAAACCTagg	55,2
SIDis1_ARNg_2	TCTTCTTTTCTGGTGGAGACcgg	48,81
SISINAT2_ARNg_1	TAACATGGCAAGGTGTTCCtagg	50,5
SISINAT2_ARNg_2	TGACTGTCTCGTATACTCCTagg	63,64
SIACS1a_ARNg_1	CAGCTTATCGTTTCGAAGATtgg	34,23
SIACS1a_ARNg_2	CTGACCAAAGGCGAATTCATcgg	51,03

#### **4.- Discusión**

Enmarcado en el proyecto ACT192073 se propuso generar una herramienta de edición para los cultivos de tomate Poncho Negro teniendo como fin último mejorar la respuesta de éste al estrés abiótico generado por salinidad o sequía. En el presente trabajo se generaron vectores de fácil construcción y relativo bajo coste que permitiesen lograr esta tarea de manera óptima. Para ello, se construyeron vectores con la técnica de clonamiento Golden Gate, que permite direccionalidad, no deja “cicatrices” en la secuencia y permite el ensamble en una sola reacción, a diferencias de técnicas de clonamiento basadas en la recombinación sitio específica (Chee & Chin, 2015; Engler & Marillonnet, 2014). De esta manera en un paso de clonamiento se obtuvieron los vectores pGGK7-2xARNgs los cuales expresan en plantas la proteína Cas9 en conjunto con una pareja de ARNgs dispuestos para editar lo que se desee.

#### **Construcción de vectores de edición**

El sistema CRISPR/Cas9 requiere de ARNgs que guían la maquinaria de edición al locus deseado. Para el diseño de estos ARNgs se utilizó el software Geneious Prime el cual genera ARNgs basados en secuencia, reconociendo el patrón PAM y tomando los 20 nucleótidos río arriba de este patrón, a los cuales les asigna un valor de actividad (Doench y col., 2016) y especificidad (Hsu y col., 2013). De los cientos de ARNgs que el programa generó para cada gen se seleccionaron aquellos que mostraron un valor de especificidad del 100%. En su defecto se seleccionaron aquellos con el valor de especificidad más alto, ya que se buscaba evitar posibles ediciones no deseadas. Además, se prefirieron aquellos con el más alto valor de actividad y debían de encontrarse dentro del transcrito del respectivo gen, para lo cual se utilizó como referencia el transcrito reportado de *Solanum lycopersicum* var Heinz. Para los genes *SISINAT2* y *SIDISI* se seleccionó un ARNg por gen con un valor de especificidad del 100% y un valor de actividad relativamente alto (0,682 y 0,614, respectivamente). La selección de estos ARNgs se privilegió ya que se encontraban en el primer exón del transcrito de referencia y esto por lo general incrementa la posibilidad de generar una pérdida de función producto de la edición génica

(Konstantakos 2022), pero la presencia de una solo ARNgs puede disminuir la probabilidad que un evento de edición mueva el marco de lectura del gen, generando un *knockout* efectivo del gen en cuestión. Para *SIACO2* se seleccionaron dos ARNgs buscando posibilitar la escisión del segmento entre estos (Voytas 2013; Brooks 2014), para de esta manera facilitar la detección de la edición génica. Los ARNgs que se seleccionaron se encontraban en el primer y en el cuarto exón del transcrito (2593 pb de distancia) (Figura 3), mostraron valores de especificidad del 100% y valores de actividad de 0,692 y 0,648 (Tabla 3); para este caso se buscó que los valores de actividad *in silico* fueran relativamente cercanos para reducir las posibilidades de que se privilegie la actividad de uno de estos frente al otro y se disminuya así la escisión del segmento que se busca. Finalmente, para *SIACSIa* también se seleccionaron dos ARNgs localizados igualmente en el primer y el cuarto exón del transcrito (2023 pb de distancia) (Figura 3), esta vez no se encontraron ARNgs con una especificidad superior al 80% y se seleccionaron aquellos con valores superiores de especificidad (71,43%) y unos valores de actividad cercanos entre ellos (0,484 y 0,568) (Tabla 3). La imposibilidad de encontrar ARNgs con especificidad del 100% o cercana se debe a la presencia del gen *SIACSIb* el cual presenta una identidad del 91,37% con el gen objetivo *SIACSIa*, además de encontrarse a solo 1300 nucleótidos de distancia. Esto abre las posibilidades de generar una edición en ambos genes con un par de ARNgs como los seleccionados por lo que se puede considerar la evaluación funcional del gen *SIACSIb* y la viabilidad de un tratamiento como este. Se tomó un mayor peso al valor de especificidad por sobre el valor de actividad ya que la especificidad se evalúa en base a la secuencia y el “peso” que la distinta posición de los *mismatches* han mostrado en previos experimentos principalmente y esto no depende en gran medida del organismo tratado (Hsu y col., 2013), en cambio el valor de actividad se empleó de manera referencial ya que está basado en la actividad empírica registrada por secuencias similares en múltiples experimentos, pero es necesario obtener evidencia empírica de la eficiencia de edición de los ARNgs, ya que se ha visto que este valor puede variar en menor o mayor medida dependiendo del organismo, más aún al considerar

que la mayor parte de los modelos predictivos de la eficiencia de la edición mediante CRISPR están hechos en modelos de mamíferos (Konstantakos y col., 2022; Doench y col., 2016).

Ambas estrategias por las que se optó tienen varios puntos a considerar. Cuando trabajamos con múltiples ARNGs debemos de evitar posibles interferencias entre estos, las cuales pueden generarse como la posibilidad de que estos interactúen entre si debido a regiones complementarias. Puede generarse también una competencia por los sitios de unión, o incluso, ARNGs que muestren una baja actividad pueden interferir con la actividad de otro ARNGs con mayor actividad llevando a una reducción de la edición génica efectiva (Thyme y col., 2016). Todo esto es de consideración a la hora del diseño de éstos y del análisis de los resultados. La opción de seleccionar un solo ARNG como candidato disminuye la posibilidad de interferencia entre los propios ARNGs pero a su vez disminuye las posibilidades de encontrar un ARNGs que muestre una alta eficiencia, ya que como se mencionó los modelos predictivos pueden resultar no muy confiable cuando se trabaja con plantas. En cambio, la opción de seleccionar dos ARNGs distintos y distantes, abre las posibilidades de interferencia más que nada con respecto a la actividad, ya que es difícil de predecir que uno de los ARNGs seleccionados presente una baja actividad y termine apantallando el efecto del otro, pero a su vez aumenta las posibilidades de dar con ARNGs con una alta actividad. Además, con dos ARNGs dispuestos en exones diferentes como el caso de *SIACO2* y *SIACSIa* (Figura 3) aparecen distintos posibles resultados a considerar, como que uno de los ARNG actúe en solitario mientras el otro no muestra su efecto, o el caso en el que ambos ARNGs logren editar el gen de manera exitosa produciendo indels de manera simultánea, pero sin lograr una escisión del segmento entre éstos como se espera. Este caso dificulta la detección de la edición, pero puede producir una pérdida de función, o el caso esperado en el que los ARNGs actúen de manera simultánea y el mecanismo de reparación lleve a una escisión del fragmento génico entre los ARNGs, ya que un mecanismo como este facilita la detección y podría llegar a utilizarse para eliminar

de manera precisa fragmentos o genes al completo empleando tan solo dos ARNGs (Voytas 2013; Brooks y col., 2014; Vidigal & Ventura, 2015).

Con los ARNGs diseñados se sintetizaron los partidores necesarios para la generación del fragmento que se introduciría en el vector pGGK7, y aunque la generación del fragmento portador de los ARNGs es llevado a cabo con una enzima de lenta procesividad para minimizar la posibilidad de errores, este proceso podría mejorarse con la implementación de un proceso de secuenciación del fragmento obtenido para verificar la composición del resultado; aun así la tasa de errores de esta polimerasa es de alrededor de 1 error cada 2 millones de nucleótidos, por lo que no se consideró necesario.

Se logró obtener el vector deseado lo cual fue comprobado mediante digestión enzimática. Para esto se utilizó la enzima *AvaII* la cual permitía observar la integración del fragmento que contiene ambos ARNGs ya que presenta sitios de reconocimiento de la enzima alrededor que bordean el sitio donde se integra el fragmento (Figura Suplementaria 4) y luego se realizó una segunda digestión con la enzima *XhoI* la cual poseía un sitio de reconocimiento que se perdía por efecto de la integración del fragmento mediante GG (Figura Suplementaria 5) Esta segunda digestión permitió confirmar la integración del fragmento, además de permitir la eliminación de posibles impurezas.

### **Transformación de PN y verificación de la edición**

Para verificar la edición de los genes blancos mediante los vectores generados, se tuvo que establecer un protocolo de transformación transitorio mediante *A. tumefaciens*, la cual se seleccionó buscando optimizar el tiempo requerido para la verificación de la edición. Esto se abordó empleando el reportero Ruby que destaca por ser fácilmente observable a ojo desnudo (Figura 7) el cual ha sido empleado en *Arabidopsis thaliana*, arroz y bambú, permitiendo una fácil detección de transformación, principalmente en hojas y callos (He y col., 2020; Sun y col., 2023).



La notoria baja expresión Ruby en PN respecto al observado en tabaco (Figura 7) puede deberse a una respuesta exacerbada frente a la bacteria del tomate PN respecto al tabaco. No hay que olvidar que se trata de un patógeno y la respuesta varía en distintas especies e incluso distintas variedades. Podemos observar casos en los cuales el tabaco logra una transformación exitosa con una mayor cantidad de bacteria total (Yamamoto y col., 2018; Niedbała y col., 2021) lo que sugiere una mayor tolerancia de esta especie frente al patógeno, respecto a PN. La baja infectividad de agrobacteria en PN puede deberse a una respuesta de hipersensibilidad (HR, del inglés *hypersensitive response*) gatillada por la infección (Staskawicz y col., 1995) a modo de respuesta para detener la transferencia de material genético, lo que puede relacionarse directamente con una cantidad de bacteria superior a la que este tejido resiste (Kuta & Tripathi, 2005; Hansen, 2000). Esto estaría provocando la inducción de la apoptosis celular y la posterior necrosis tisular, lo que podría ser la causa del relativo bajo éxito de transformación. Además, podría ser la causa del posicionamiento del reportero Ruby en tejido transformado, ya que observamos como este se posiciona en la zona distal del área infiltrada. Podría ser que el tejido cercano a la infiltración gatilla esta HR resultando en la nula transformación de este tejido y su posterior muerte, mientras que la transformación si logra apreciarse en tejidos que podrían enfrentarse a una menor cantidad de la bacteria o incluso puede estar involucrado una respuesta de inmunidad gatillada en el tejido colindante (Sheikh y col., 2014). Otro elemento a consideración es la lignificación de los tejidos ya que esto podría estar impidiendo el avance del patógeno y protegiendo el tejido colindante al servir como barrera física defensiva (Lee y col., 2019) lo que a su vez podría estar relacionado al comportamiento particular que la transformación muestra en hojas de PN. Posibles soluciones a este problema podrían estar relacionadas con la modificación de la cantidad de bacteria inoculada, la utilización de tejido joven o desdiferenciado (Qiu y col., 2007), con la utilización de técnicas de pre-cultivo del tejido que mediante fitohormonas estimulen la desdiferenciación tisular, pero que limitaría las posibilidades de realizar agro-infiltración del tejido *in vivo*; por último se podría considerar la

utilización de mayores concentración de acetosiringona, compuesto fenólico excretado por tejido herido y altamente relacionado con los procesos infecciosos de la bacteria (Kuta 2005).

En cuanto a la transformación estable de PN nos apoyamos en estudios realizados de manera paralela (Díaz, 2023), los cuales establecieron las condiciones óptimas para el cultivo *in vitro* de este organismo. Aunque estas mostraron resultados alentadores para la micropropagación, cuando se sometió a una transformación mediada por *A. tumefaciens* los resultados parecen no lograr la recuperación del tejido a partir de hojas y tallos. Este tipo de explantes fue seleccionado por la mayor disponibilidad de tejido vegetal posibilitando así un mayor número de transformantes, pero parece no ser el tejido óptimo para la transformación, lo cual se apoya en la posterior transformación lograda en cotiledones (Figura 11).

Al igual que con la agro-infiltración, varios factores pueden estar influyendo en la eficiencia observada en la transformación mediada por esta bacteria. Como ya se mencionó, puede estar involucrado el nivel de diferenciación del tejido en la pobre eficiencia de transformación lo cual se puede solucionar empleando cotiledones en etapas tempranas del desarrollo (previo a la aparición de hojas verdaderas) como se recomienda para tomate MoneyMaker (Frery & Earle, 1996). También se debe considerar la utilización de diferentes concentraciones de acetosiringona buscando estimular la transformación efectiva. Por último, lo que se considera el principal problema de este procedimiento fue la sobre proliferación de la bacteria sobre el tejido durante el co-cultivo y que perduró durante el periodo de recuperación del tejido (Sutradhar & Mandal, 2023). Esto puede estar causado por las condiciones en las que se mantiene el cultivo, por la naturaleza de los explantes, por la infectividad propia de la cepa de *A. tumefaciens* empleada y/o por los antibióticos. Por esto se planteó el empleo de explantes provenientes de los cotiledones, buscando la efectividad por sobre la cantidad de tejido transformado (Reem & Van Eck, 2019), el incremento de la concentración del antibiótico timentin empleado para mermar el crecimiento de la bacteria como ya se han visto resultados con cepas infecciosas (Van Eck y col., 2018).

Por último, si este problema persistiese sería necesario sopesar la utilización de otras cepas de la bacteria ya que la cepa empleada (GV3101) ha mostrado una eficiencia de transformación notable en tomate cv. MicroTom. Pero la cepa EHA105, de similares características, ha demostrado mejores resultados en esta variedad de tomate (Chetty y col., 2012); o directamente se podría emplear cepas de menor infectividad buscando evitar la sobre proliferación con el posible detrimento de la eficiencia del proceso.

El material genético extraído del tejido transformado de manera estable permite observar la presencia de la proteína Cas9 (Figura 11 B), pero no se pudo determinar la edición génica. En cuanto al material genético proveniente del tejido transformado de manera transiente, se realizaron PCR de la totalidad del gen lo que mostró dos problemas principales, primero el diseño de los partidores se realizó en la totalidad del gen y estos genes eran de un gran tamaño (entre 2 a 5 kb) para ser amplificados mediante PCR convencional, por lo que para el gen *SIDIS1* y *SIACSIa* no se logró amplificar el gen completo. Aun así, se procedió igualmente con el gen *SIACSIa* ya que se buscaba la posible escisión de un fragmento de aproximadamente 2000 pb entre ambos ARNGs lo que posibilitaría la amplificación de este, con un amplicón aproximado de 1300 pb. Los resultados observados fueron en la mayoría fragmentos de menor tamaño a los esperados (Figura 9), pero se vio un transformante donde el amplicón mostró un tamaño similar al esperado (~1000 pb), mientras que el silvestre muestra amplicones no esperados, lo que puede dar indicios de amplificaciones inespecíficas que pueden estar dadas por contaminación de los partidores o que estos presentan una actividad subóptima, esto se repite en otras muestras pero también es posible que estas se tratasen de variadas escisiones o lesiones generadas por Cas9, lo que podría aumentar el tamaño del posible fragmento recortado, para lo cual sería necesario evaluar mediante secuenciación estos posibles eventos (Reem & Van Eck, 2019; Tran y col., 2020; Kosicki y col., 2022). Aunque es de tomar en cuenta que la que se muestra en la Figura 9 es segunda evaluación de este material genético, ya que la primera evaluación ya mostraba la aparición de posibles positivos eventos de amplificación inespecífica y lo que llevo a su repetición (Figura Suplementaria 6).

Y el posterior método de análisis basado en digestión enzimática mediante EcoRI no permitió observar un evento de edición mediado por Cas9 (Figura 9) lo que pueda deberse a la baja cantidad de material genético resultante del PCR, o a que posibles indels no modificasen el sitio de reconocimiento de la enzima ya que este no se encontraba directamente sobre el posible corte generado por Cas9. Esto sumado a la ambigüedad del amplicón obtenido para este gen (Figura 9) no permiten confirmar la presencia de la edición genética. La amplificación del gen *SISINAT2* mostró un tamaño similar al silvestre en todos los casos evaluados (2116 pb) (Figura 8) y no permitió apreciar posibles indels del orden de los 10 nucleótidos como es usual para este sistema (Chakrabarti y col., 2019). Aunque ciertamente podrían generarse indels del orden de kilobases, esto no es común (Kosicki y col., 2022) y no se llegaron a observar. Dada la estabilidad del amplicón obtenido se optó por utilizar un kit de detección de edición del genoma por CRISPR/Cas9 el cual se basa en la acción de nucleasas que detectan *mismatches* en el apareamiento cortando indels como las generadas por Cas9. Los resultados no lograron mostrar edición por Cas9, aunque no se puede descartar directamente ya que puede deberse a la cantidad de material genético amplificado como se puede observar al comparar con el control del kit y la tenue banda que evidencia la edición genómica, para obtener resultados concluyentes parece necesario mejorar la eficiencia de la amplificación del gen, ya sea modificando las variables del PCR o generando nuevos partidores para este.

A modo general esto podría mejorarse diseñando nuevos sets de partidores los cuales se encuentren cercanos al área objetivo de los ARNg cuyo amplicón objetivo sea del orden de los cientos de pares de base y se encuentren como mínimo a 50 pb de distancia de la zona de corte para evitar perder su función por la posible edición (Chakrabarti y col., 2019). Esto resultaría en una pareja de partidores de PCR por cada ARNg diseñado, los que permitan la generación de tres amplicones para la revisión de la edición, dos amplicones que envuelvan cada ARNg en cuestión, más la posibilidad de un tercer amplicón combinando un partidore de cada pareja que permita evaluar la sección entre los ARNg por

posibles eventos de edición conjunta y la escisión de un fragmento mayor. El diseño y optimización de estos partidores es fundamental para revisar posibles ediciones génicas cualquiera sea el método seleccionado, secuenciación, enzimas de restricción o ensayos de nucleasas (Voytas, 2013).

En la revisión hecha para encontrar los métodos de verificación de la edición, el método de mayor extensión es la secuenciación, pero cuando no se posee acceso directo a ésta, el análisis mediante enzimas de restricción aparece como una gran oportunidad con la única desventaja de limitar el diseño de los ARNGs (Guo y col., 2018; Liu y col., 2015). En vista de las dificultades para verificar la edición génica con los vectores generados pero que si se observó la expresión de Cas9, se optó por rehacer el proceso de diseño y selección de los ARNGs, esta vez centrándose en que estos sean verificables mediante las enzimas de restricción disponibles. Para optimizar éste y futuros procesos generé un programa basado en Python (Figura 12) que permitió filtrar de manera óptima cientos de resultados para encontrar aquellos que permitirían la verificación mediante las enzimas de restricción disponibles, con lo cual logramos reducir de manera general de 100 o más resultados a alrededor de 5 candidatos por gen. Con lo cual se seleccionaron una nueva pareja de ARNGs para cada gen, se priorizaron los ARNGs que podían ser revisados mediante enzimas de restricción, es decir, su sitio de reconocimiento atravesaba el sitio de corte de Cas9 que se encuentra tres nucleótidos río arriba de la secuencia PAM, en caso de no encontrarse se seleccionaron aquellas con el sitio de reconocimiento más cercano al sitio de corte. Se buscó un valor de especificidad relativamente alto, priorizando cero *off-targets* sin *mismatches* (MM0), en cuanto a los valores de actividad teórica se utilizaron solamente de manera referencial ya que se considera que estos valores no presentan evidencia sólida de su acción en plantas (Doench y col., 2016; Konstantakos y col., 2022), a su vez se prefirió un contenido porcentual de guanina y citocina (GC%) entre 40% y 60% (Konstantakos y col., 2022); además cada pareja de ARNGs debía tener su sitio de corte al menos a 15 nucleótidos de distancia y dentro de un exón según el transcrito de referencia para maximizar su funcionalidad, y por último se descartaron aquellos ARNGs que contenían una posible

secuencia terminadora del promotor U6 empleado, lo cual se consideró como una secuencia de cinco timinas seguidas (Gao y col., 2018), de esta manera se busca evitar una terminación no deseada de la transcripción. Consideramos que este programa ofrece ventajas competitivas a la hora del diseño de ARNs y de la evaluación de la edición en plantas y que además puede aplicarse a otros organismos como bacterias y mamíferos.

## 5.- Conclusión

1.- Se obtuvieron vectores binarios de transformación que permiten expresar en plantas la proteína Cas9 en conjunto con una pareja de ARNGs para los genes *SIDIS1*, *SISINAT2*, *SIACSIa* y *SIACO2*.

2.-El sistema Golden Gate es de fácil empleo, tan solo requiriendo el diseño y generación de dos partidores con ambos ARNGs y un sistema de clonamiento mediante la enzima de restricción BsaI.

3.- Se estandarizó método transformación transitorio de PN, aunque el tejido de tomate PN muestra una alta sensibilidad y una aparente baja tasa de transformación transitoria y estable por *A. tumefaciens*.

4.- No se logró demostrar claramente edición mediada por los vectores generados, principalmente por problemas en los métodos empleados para la verificación de la edición.

5.- Se generó un programa basado en Python que permite filtrar resultados de diseño de ARNGs de múltiples plataformas, mostrando aquellos ARNGs cuya acción puede ser verificada mediante las enzimas de restricción disponibles. Este programa además añade detalles que pueden mejorar la selección de ARNGs en un sistema estándar como el empleado en este trabajo.

## Bibliografía

- Angel, Y., Esteban, W., Bustos, R., Pacheco, P., Hurtado, E., & Bastías, E. (2016). Tomate "Poncho negro": Historia y rescate de un cultivo olvidado. *Idesia (Arica)*, 34(5), 65-69.
- Araya-Osses, D., Casanueva, A., Román-Figueroa, C., Uribe, J. M., & Paneque, M. (2020). Climate change projections of temperature and precipitation in Chile based on statistical downscaling. *Climate Dynamics*, 54, 4309-4330.
- Barrett, H., & Rose, D. C. (2022). Perceptions of the fourth agricultural revolution: what's in, what's out, and what consequences are anticipated?. *Sociologia Ruralis*, 62(2), 162-189.
- Begemann, M. B., Gray, B. N., January, E., Gordon, G. C., He, Y., Liu, H., Wu, X., Brutnell, T. P., Mockler, T. C., & Oufattole, M. (2017). Precise insertion and guided editing of higher plant genomes using Cpf1 CRISPR nucleases. *Scientific Reports*, 7(1), 11606.
- 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 Biol* 19, 194.
- Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Patron, N. J., & Nekrasov, V. (2015). Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 76–84.
- Borlaug, N. E. (1968). Wheat breeding and its impact on world food supply. *CIMMYT*.
- 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.
- Chakrabarti, A. M., Henser-Brownhill, T., Monserrat, J., Poetsch, A. R., Luscombe, N. M., & Scaffidi, P. (2019). Target-Specific Precision of CRISPR-Mediated Genome Editing. *Molecular Cell*, 73(4), 699–713.e6.
- Chetty, V. J., Ceballos, N., Garcia, D., Narváez-Vásquez, J., Lopez, W., & Orozco-Cárdenas, M. L. (2012). Evaluation of four *Agrobacterium tumefaciens* strains for the genetic transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar Micro-Tom. *Plant Cell Reports*, 32(2), 239–247.
- Chee, J. Y., & Chin, C. F. (2015). Gateway cloning technology: Advantages and drawbacks. *Cloning Transgenes*, 4, 138.
- Conko, G., Kershen, D. L., Miller, H., & Parrott, W. A. (2016). A risk-based approach to the regulation of genetically engineered organisms. *Nature Biotechnology*, 34(5), 493-503.
- Díaz M. (2023). Prospección estratégica para la edición de genes reguladores negativos a estrés por sequía o salinidad en *Solanum lycopersicum* variedad Poncho Negro [Tesis de Magíster]. Universidad de Chile.



Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 34(2), 184–191.

Engler, C., & Marillonnet, S. (2014). Golden gate cloning. *DNA cloning and assembly methods*, 119–131.

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.

Frary, A., & Earle, E. D. (1996). An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports*, 16(3–4), 235–240.

Gaj, T., Sirk, S. J., Shui, S. L., & Liu, J. (2016). Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(12), a023754.

Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E. H., Doudna, J. A., Lim, W. A., Weissman, J. S., & Qi, L. S. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, 154(2), 442–451.

Gao, Z., Herrera-Carrillo, E., & Berkhout, B. (2018). Delineation of the Exact Transcription Termination Signal for Type 3 Polymerase III. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 10, 36–44. doi:10.1016/j.omtn.2017.11.006

Guo J., Li K., Jin L., Xu R., Miao K., Yang F., Qi C., Zhang L., Botella JR., Wang R. (2018). A simple and cost-effective method for screening of CRISPR/Cas9-induced homozygous/biallelic mutants. *Plant Methods*, 14(1).

Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E. J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T. J., Marraffini, L. A., Bao, G., & Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–832.

Hansen, G. (2000). Evidence for *Agrobacterium*-Induced Apoptosis in Maize Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(6), 649–657.

He, Y., Zhang, T., Sun, H., Zhan, H., & Zhao, Y. (2020). A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Horticulture Research*, 7.

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2022a). Framing and Context. In *Global Warming of 1.5°C: IPCC Special Report on Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-industrial Levels in Context of Strengthening Response to Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty* (pp. 49–92). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781009157940.003

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2022b). Impacts of 1.5°C Global Warming on Natural and Human Systems. In *Global Warming of 1.5°C: IPCC Special Report on Impacts of Global Warming of 1.5°C above Pre-industrial Levels in Context of Strengthening Response to Climate Change, Sustainable Development, and Efforts to Eradicate Poverty* (pp. 175-312). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/9781009157940.005

Izquierdo, T., Abad, M., Gómez, Y., Gallardo, D., & Rodríguez-Vidal, J. (2020). The March 2015 catastrophic flood event and its impacts in the city of Copiapó (southern Atacama Desert). An integrated analysis to mitigate future mudflow derived damages. *Journal of South American Earth Sciences*, 102975.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821.

Kuta, D. D., & Tripathi, L. (2005). Agrobacterium-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against Agrobacterium-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*, 4(8), 752-757.

Kim, J. H., & Jang, C. S. (2021). E3 ligase, the *Oryza sativa* salt-induced RING finger protein 4 (OsSIRP4), negatively regulates salt stress responses via degradation of the OsPEX11-1 protein. *Plant molecular biology*, 105(3), 231–245.

Kim, J. H., Nguyen, N. H., Jeong, C. Y., Nguyen, N. T., Hong, S. W., Lee, H. (2018). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing: advances and opportunities. *Plant biotechnology reports*, 12(1), 1–8.

Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, 50(7), 3616-3637.

Kosicki, M., Allen, F., Steward, F., Tomberg, K., Pan, Y., & Bradley, A. (2022). Cas9-induced large deletions and small indels are controlled in a convergent fashion. *Nature Communications*, 13(1), 3422.

Kumar, P., Roupael, Y., Cardarelli, M., & Colla, G. (2017). Vegetable grafting as a tool to improve drought resistance and water use efficiency. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1130.

Lee, M. H., Jeon, H. S., Kim, S. H., Chung, J. H., Roppolo, D., Lee, H. J., Cho, H. J., Tobimatsu, Y., Ralph, J., & Park, O. K. (2019). Lignin-based barrier restricts pathogens to the infection site and confers resistance in plants. *The EMBO journal*, 38(23), e101948. <https://doi.org/10.15252/embj.2019101948>

Li, J., Jia, H., & Wang, J. (2014). cGMP and ethylene are involved in maintaining ion homeostasis under salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Reports*, 33, 447-459.

Liu, W., Zhu, X., Lei, M., Xia, Q., Botella, J. R., Zhu, J.-K., & Mao, Y. (2015). A detailed procedure for CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana*. *Science Bulletin*, 60(15), 1332–1347.

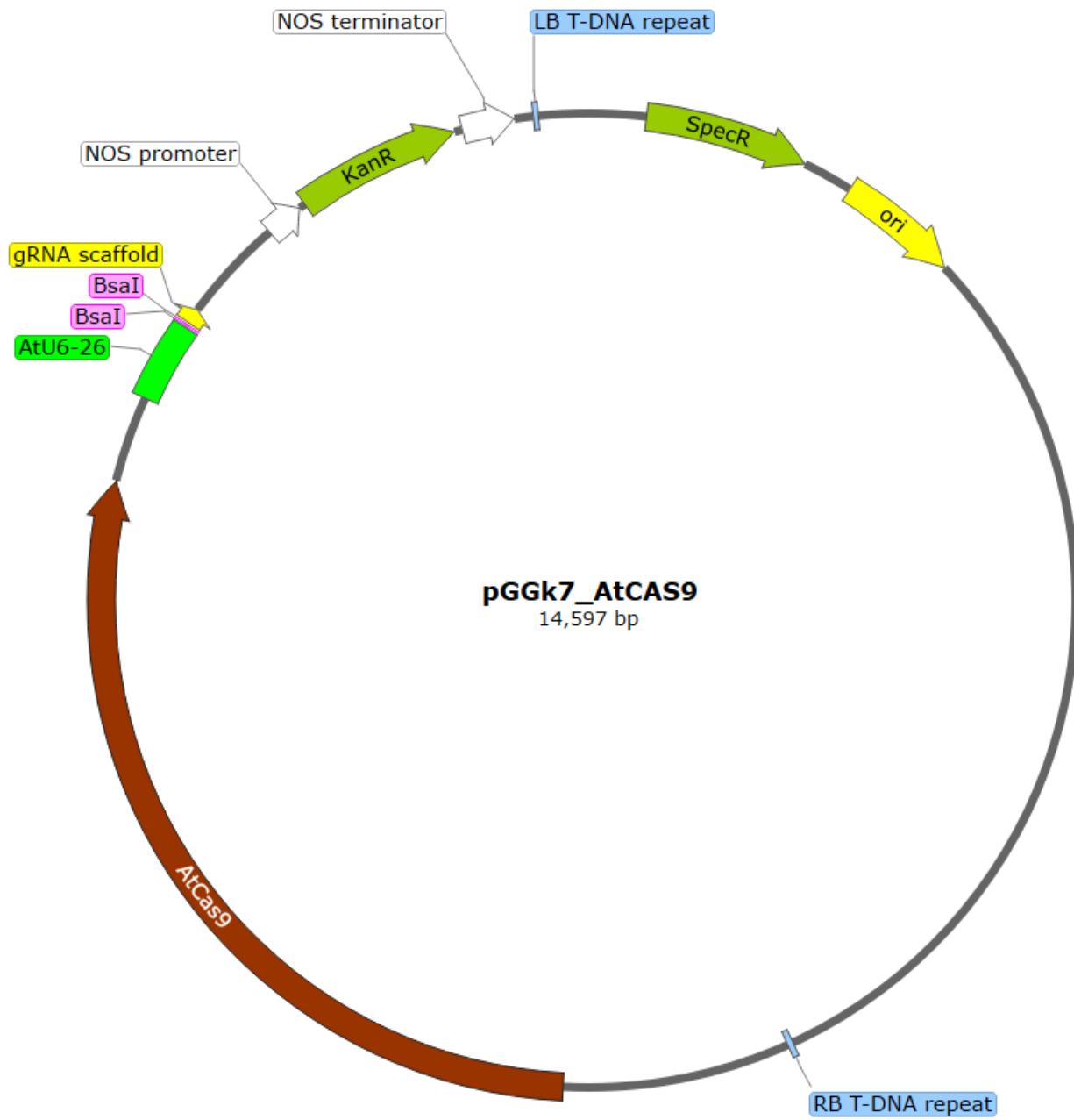
- Louwaars, N. P. (2018). Plant breeding and diversity: A troubled relationship? *Euphytica*, 214(7). doi:10.1007/s10681-018-2192-5
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science*, 758-763.
- Muñoz, M. (2023) Boletín de hortalizas, junio 2023. Odepa. <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-hortalizas-junio-2023>
- Mushtaq, M., Bhat, J. A., Mir, Z. A., Sakina, A., Ali, S., Singh, A. K., Tyagi, A., Salgotra, R. K., Dar, A. A., & Bhat, R. (2018). CRISPR/Cas approach: A new way of looking at plant-abiotic interactions. *Journal of Plant Physiology*, 224-225, 156–162.
- Naing, A. H., Campol, J. R., Kang, H., Xu, J., Chung, M. Y., & Kim, C. K. (2022). Role of ethylene biosynthesis genes in the regulation of salt stress and drought stress tolerance in petunia. *Frontiers in Plant Science*, 13, 844449.
- Niedbała, G., Niazian, M., & Sabbatini, P. (2021). Modeling *Agrobacterium*-Mediated Gene Transformation of Tobacco (*Nicotiana tabacum*)-A Model Plant for Gene Transformation Studies. *Frontiers in Plant Science*, 12, 695110.
- Ning, Y., Jantasuriyarat, C., Zhao, Q., Zhang, H., Chen, S., Liu, J., Liu, L., Tang, S., Park, C. H., Wang, X., Liu, X., Dai, L., Xie, Q., & Wang, G. L. (2011). The SINA E3 ligase OsDIS1 negatively regulates drought response in rice. *Plant Physiology*, 157(1), 242–255.
- Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PloS one*, 12(1), e0169774.
- Qiu, D., Diretto, G., Tavarza, R., & Giuliano, G. (2007). Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Scientia Horticulturae*, 112(2), 172–175.
- Reem, N. T., & Van Eck, J. (2019). Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing in tomato. *Plant Genome Editing with CRISPR Systems: Methods and Protocols*, 171-182.
- Rosa, L., Chiarelli, D. D., Rulli, M. C., Dell'Angelo, J., & D'Odorico, P. (2020). Global agricultural economic water scarcity. *Science Advances*, 6(18), eaaz6031.
- Samal, K. C., & Rout, G. R. (2018). Genetic improvement of vegetables using transgenic technology. In *Genetic engineering of horticultural crops* (pp. 193-224). Academic Press.
- Sheikh, A. H., Raghuram, B., Eschen-Lippold, L., Scheel, D., Lee, J., & Sinha, A. K. (2014). Agroinfiltration by Cytokinin-Producing *Agrobacterium* sp. Strain GV3101 Primes Defense Responses in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(11), 1175–1185.
- Staskawicz, B., Ausubel, F., Baker, B., Ellis, J., & Jones, J. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268(5211), 661–667.

- Su, X., Wang, B., Geng, X., Du, Y., Yang, Q., Liang, B., Meng, G., Gao, Q., Yang, W., Zhu, Y., & Lin, T. (2021). A high-continuity and annotated tomato reference genome. *BMC genomics*, 22(1), 898.
- Sutradhar, M., & Mandal, N. (2023). Reasons and riddance of *Agrobacterium tumefaciens* overgrowth in plant transformation. *Transgenic research*, 32(1-2), 33–52.
- Torres, A., & Acevedo, E. (2008). The salinity problem in the central-south zone of Chile: magnitudes and consequences. *Gayana*, 72(2), 150-157.
- Tripodi, P., & Gómez-Talquenca, S. (2019). Potential use of genetic markers in plant breeding programs. In *Genetic diversity in plants* (pp. 349-375). IntechOpen.
- Velandia, K., & Sentelhas, P. C. (2019). Climate Change Impacts on Agriculture in Brazil: Sectoral Analysis and Modeling. *Climatic Change*, 154(3-4), 417-434.
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*, 4(3), 162–176.
- Wolt, J. D., Wang, K., & Yang, B. (2016). The regulatory status of genome-edited crops. *Plant biotechnology journal*, 14(2), 510-518.
- Wu, J. C., & Finkelstein, R. R. (2021). Water Deficit-Induced Guard Cell Abscisic Acid Signaling: A Continuum of Long-Distance and Localized Actions. *The Plant Cell*, 33(2), 325–346.
- Zayed, Y., & Mahas, A. (2019). Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Plant Genome Editing. In *Plant genomics* (pp. 183-202). Humana, New York, NY.

Anexo



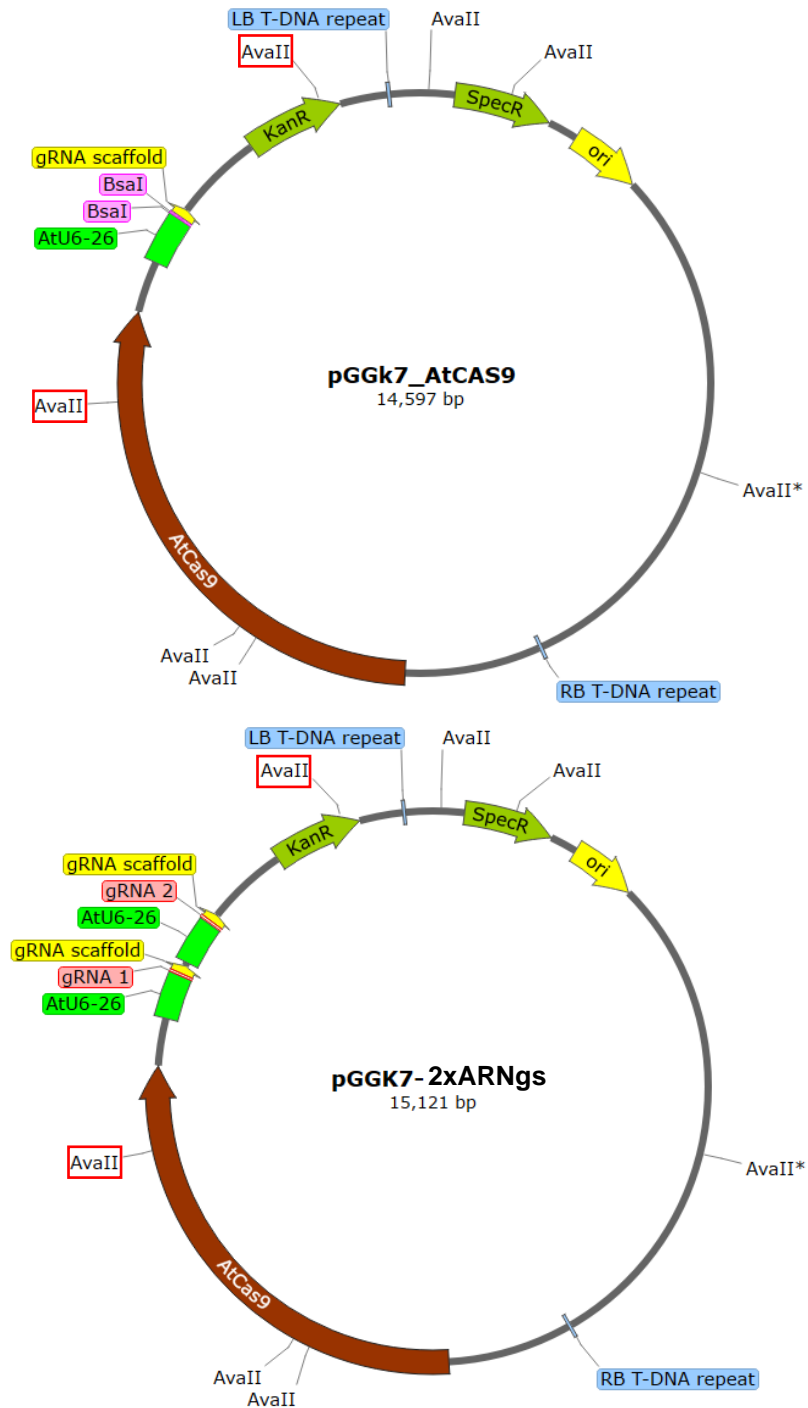
Figura Suplementaria 1.- Esquema simplificado de vector pEN-2xATU6



**Figura Suplementaria 2.- Esquema simplificado de vector pGGk7-AtCas9**

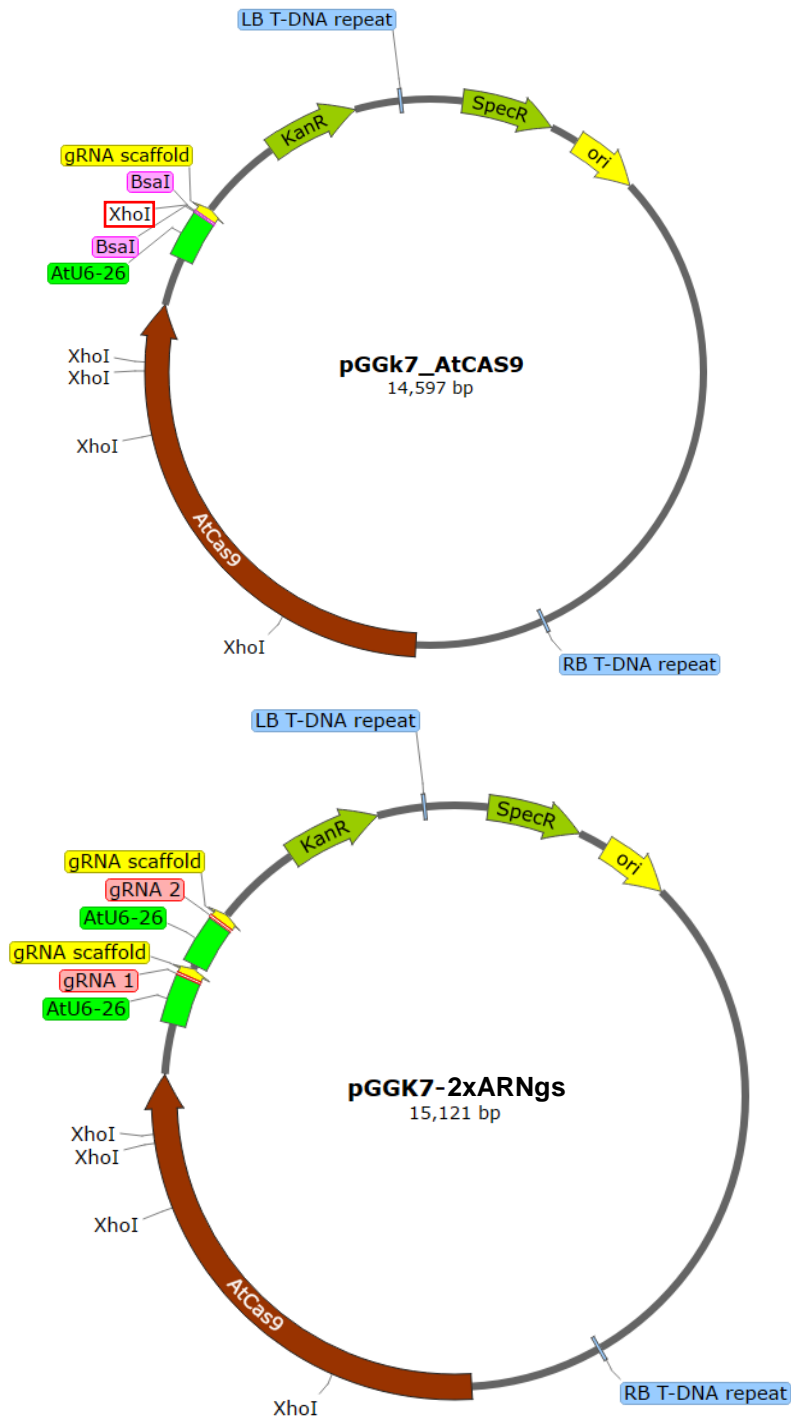


**Figura Suplementaria 3.- Esquema simplificado de vector pGGk7-2xARNgs**

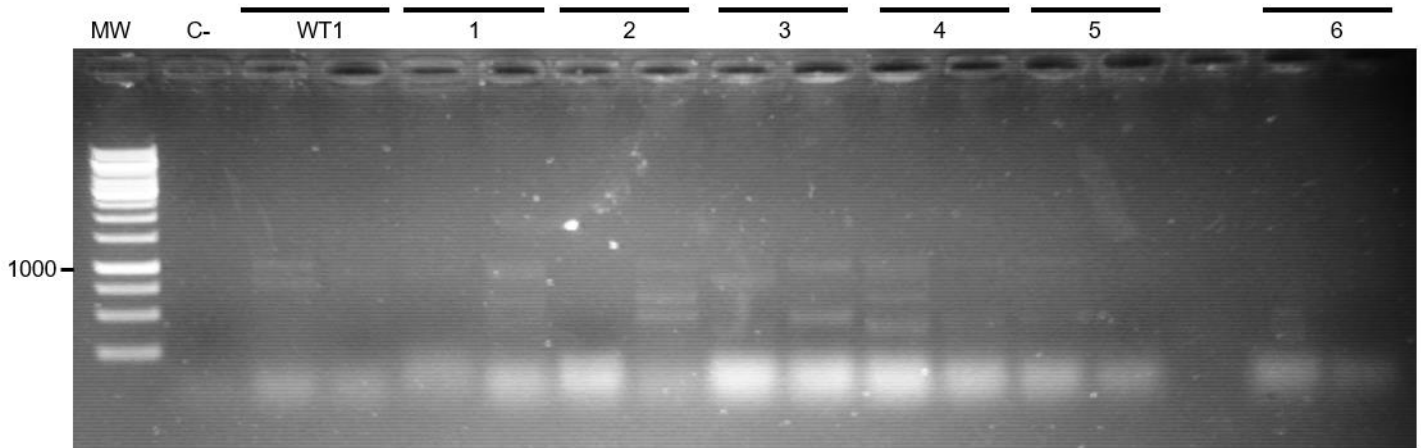


**Figura Suplementaria 4.- Esquema de sitios de corte de *AvaII* de vectores pGGk7-*AtCas9* y pGGk7-2xARNgs.** Se destacan los sitios de restricción que se aprovechan para diferenciar los patrones de digestión correspondientes.

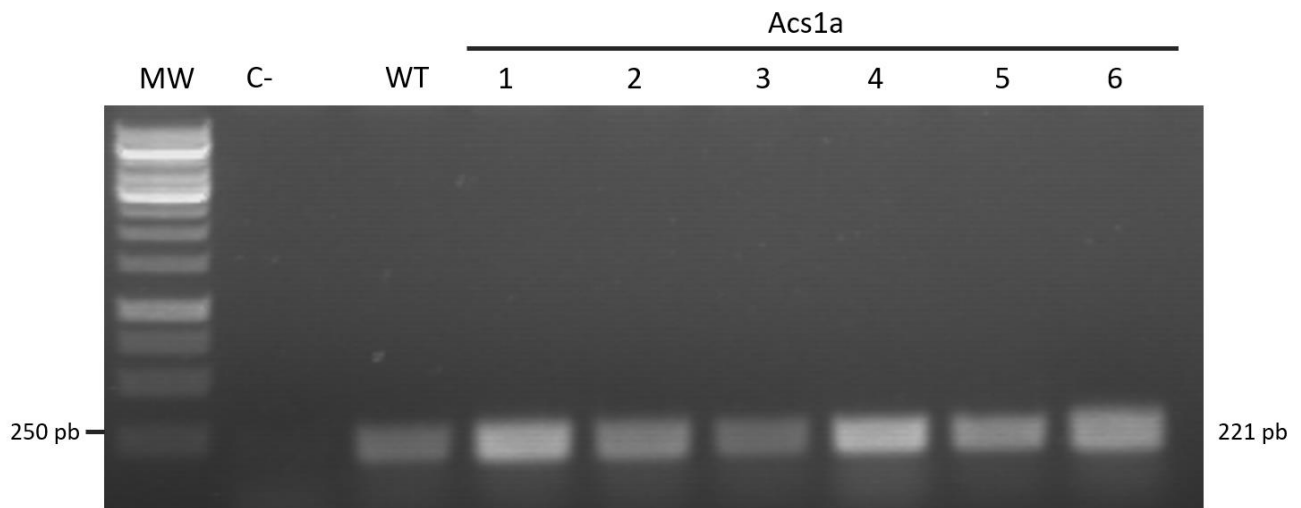




**Figura Suplementaria 5.- Esquema de sitios de corte de *XhoI* de vectores pGGk7-AtCas9 y pGGk7-2xARNgs.** Se destaca el sitio de restricción que se pierde y que se emplea para la diferenciación de patrones de digestión.



**Figura Suplementaria 6.- PCR gen *SIACSIa* a partir de ADNg de hojas infiltradas. Marcador de peso molecular (MW), control negativo de PCR (sin material genético) (C-), muestra silvestre (WT1)**



**Figura Suplementaria 7.- PCR de  $\alpha$ -tub de ADNg de hojas infiltradas con vector de *SIACSIa*.**