

UCH-FC
MAG-BMCN
P695
C.2



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**“Estudio de la función del gen licopeno
 β ciclasa (lcyb) en la biosíntesis de
carotenoides
en *Daucus carota*”**

Tesis Entregada a
La Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias con Mención en
Biología Molecular, Celular Y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Lorena Andrea Pizarro Arcos

Noviembre, 2008

Director de Tesis: Dra. Claudia Stange Klein





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

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

LORENA ANDREA PIZARRO ARCOS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Septiembre del 2008.

Director de Tesis:
Dra. Claudia Stange:

Co-Director:
Dr. Michael Handford:



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Liliana Cardemil:

Dr. Marcelo Baeza:

***“Hay siempre en el alma humana
Una pasión por ir a la caza de algo”***

Charles Dickens (1812-1870).

A mis padres





Nací en Coquimbo un 9 de Junio de 1983. Hija de Antonia y Gabriel. Viví y crecí hasta los 17 años en una parcela en zona de La Cantera, Coquimbo.

Mis estudios comenzaron en el Colegio Inglés Católico de La Serena donde cursé toda mi educación básica y media. Aquí descubrí mi pasión por la biología y mis ganas de aprender, esto se tradujo en lo que más me gusta que es la investigación y la ciencia. En el año 2001, el destino afortunadamente me trajo a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile cuando ingresé a esta carrera, donde he vivido grandes experiencias y conocido gente maravillosa. Espero que en mi futuro siga aprendiendo de ciencia y de la vida.

AGRADECIMIENTOS



Es difícil empezar a agradecer a todas las personas que quiero y me han ayudado directa o indirectamente a terminar este proceso. Por eso comenzaré agradeciendo a los compañeros y amigos. A los inolvidables amigos de la Universidad con los que pase buenos momentos y los que aguantaron mis mañas, mal carácter y migrañas, a la Sole, Mauro, Cintilla, Cata-elfa, Rodrigo. Especial mención merecen esos grandes amigos con los que sufrí estudiando *all night long* o ensayando hasta el cansancio las presentaciones, los que me enseñaron y explicaron tantas cosas: Mauro, Solange y Cintilla. Debo recalcar mis agradecimientos a la Sole, Cintilla y familia, por adoptarme cada vez que lo necesito, por darme calor de hogar.

A los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal por el grato ambiente que generan. A todos mis compañeros, la Ange y Seba. En especial, los amigos que encontré en el laboratorio que siempre me apoyan, cuando los experimentos y, sobre todo, las presentaciones no van bien. Entre ellos, a Pato estrella, Pauli, Isa, Claudia H, Fran, Nallat, Mati, Carlos F, y a todos. A Barbarilla y Pamelilla, porque nos reímos y entendemos, hacemos un gran equipo. A los amigos que he conocido durante este tiempo: a la Ori, Fefi, Vale, Giss y todos, por toda la Alegría y buenos recuerdos.

También al Profe Mike, Profe Lorena y, por supuesto a la Profe Liliana y al Dr. Baeza por los consejos y correcciones. A la Dra. Claudia Stange, mi Profe, porque más allá de los conocimientos, me enseñó una forma de trabajar, de

aprender y de hacer investigación con alto grado de compromiso y cariño. Por su apoyo, confianza, paciencia y cariño. En resumen, por ser "El Tutor" que yo necesitaba y quiero.

Finalmente, agradezco a mi familia. A mi mamá por darme la fuerza y tranquilidad, a mi papá por entenderme y quererme siempre, a mi hermano por quererme y alentarme, y a mi viejita por su amor incondicional que siempre me acompaña.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS	18
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Materiales	20
Material Biológico.	20
Medios de cultivo.	20
Reactivos.	20
Métodos	21
Extracción de DNA de tejido vegetal con buffer CTAB.	21
Extracción de RNA de tejido vegetal.	21
Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.	22
RT-PCR semicuantitativo del gen <i>lcyb</i> .	22
Tratamiento del RNA con DNasa I.	22
Transcripción Reversa, síntesis de cDNA.	23
Amplificación del fragmento del gen <i>lcyb</i> mediante PCR.	23
PCR y RT-PCR del gen de neomicina fosfotransferasa (<i>nptII</i>) y del gen del RNA ribosomal 18S (<i>rRNA18s</i>).	24
Embriogénesis somática y transformación de <i>Daucus carota</i> .	25
Esterilización de semillas de <i>Daucus carota</i> .	25
Embriogénesis somática de hipocotilos y epicotilos de <i>Daucus carota</i> .	26
Transformación de hipocotilos y epicotilos de <i>D. carota</i> mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	26



Determinación de la concentración de carotenoides.	27
Extracción de carotenoides.	27
Cuantificación de carotenoides totales mediante espectrofotometría.	28
Cuantificación de carotenoides mediante espectrofotometría y HPLC.	29
RT-PCR en tiempo real.	29
RESULTADOS	31
Transformación de <i>Daucus carota</i> mediante <i>A. tumefaciens</i> con las construcciones para silenciamiento génico post-transcripcional del gen <i>lcyb</i>.	31
Análisis molecular de las líneas transformantes de <i>D. carota</i> resistentes a kanamicina.	36
Análisis de la transgénesis de las líneas de <i>D. carota</i> transformantes resistentes a kanamicina mediante PCR y RT-PCR.	36
Determinación del nivel de silenciamiento del gen <i>lcyb</i> en las líneas transformadas de <i>D. carota</i> mediante RT-PCR semi-cuantitativo y en tiempo real.	42
Evaluación de la función del gen de <i>lcyb</i> de <i>D. carota</i> mediante análisis de las líneas transformadas.	48
Análisis de la composición de carotenoides en las líneas transformadas de <i>D. carota</i> mediante espectrofotometría y HPLC.	48
Análisis de expresión de otros genes carotenogénicos mediante RT-PCR en tiempo real.	55
DISCUSIÓN	59
Transgénesis de las líneas transformadas.	59
Silenciamiento de las líneas transformadas	61
Expresión génica de <i>lcyb</i> y efecto del silenciamiento del gen <i>lcyb</i> sobre la biosíntesis de carotenoides en <i>D. carota</i>.	64
CONCLUSIÓN	73
PROYECCIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1	Ruta de síntesis de carotenoides en plantas.	6
Figura 2	Esquema del mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional.	17
Figura 3	Esquema de los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S.	34
Figura 4	Embriogénesis somática de la transformación de <i>D. carota</i> con los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S.	35
Figura 5	Análisis molecular de la presencia del gen nptII en líneas transformantes AS de <i>D. carota</i> .	39
Figura 6	Análisis molecular de la presencia del gen nptII en líneas transformantes ASD y S de <i>D. carota</i> .	40
Figura 7	Análisis de expresión del gen nptII en líneas AS, ASD y S mediante RT-PCR.	41
Figura 8	Análisis de la expresión del gen lcyb en hojas y raíz modificada de las líneas transformadas AS23, AS37 y AS48 de <i>D. carota</i> .	45
Figura 9	Análisis de la expresión del gen lcyb en hojas y raíz modificada de las líneas transformadas ASD1, ASD2 y ASD4 de <i>D. carota</i> .	46
Figura 10	Análisis de la expresión del gen lcyb en hojas y raíz modificada de las líneas transformadas S1, S5 y S6 de <i>D. carota</i> .	47
Figura 11	Expresión relativa del gen lcyb de <i>D. carota</i> en hojas y raíz modificada de las líneas transformadas de zanahoria AS, ASD y S.	50
Figura 12	Niveles de carotenoides en tejido fotosintético (hojas) de las líneas AS, ASD y S de <i>D. carota</i> .	51
Figura 13	Niveles de carotenoides en la raíz modificada las líneas AS, ASD y S de <i>D. carota</i> .	52

- Figura 14** Efecto del silenciamiento de *lcyb* en la expresión de otros genes carotenogénicos en raíz modificada de *D. carota*. 57
- Figura 15** Efecto del silenciamiento del gen *lcyb* en la biosíntesis de fitoeno en la raíz modificada de *D. carota*. 58



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Secuencias de partidores utilizados	25
Tabla 2	Expresión de lcyb y concentración de carotenoides en las líneas transformadas de <i>D. carota</i> .	54



LISTA DE ABREVIATURAS

35S CaMV: Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

ABA: Ácido Abscísico.

BrEt: Bromuro de Etidio

C β HX: β caroteno hidroxilasa

C ϵ HX: ϵ caroteno hidroxilasa

CCS: capsantina capsurrubina sintasa

cDNA: DNA complementario

CRTISO: carotenoide isomerasa

CTAB: Cetil trimetilamonio bromuro

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DEPC: Dietilpirocarbonato

D.O.: Densidad óptica

DMAPP: Dimetil alil pirofosfato

dsRNA: RNA de doble hebra

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GGPS Geranilgeranil pirofosfato isomerasa:

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

IPI: Isopentenil pirofosfato isomerasa

IPP: Isopentenil pirofosfato

Kan: Kanamicina

LB: Luria Bertani

LCYB: Licopeno β ciclasa

LCYE: Licopeno ϵ ciclasa

MVA: Ácido mevalónico

mRNA: RNA mensajero

nm: nanometro

MS: Medio basal Murashige &Skoog

NXS: Neoxantina sintasa
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDS: Fitoeno desaturasa
PSY: Fitoeno sintasa
RNA: ácido ribonucleico
RNAp: RNA polimerasa dependiente de RNA
RNasa: Ribonucleasa
rpm: Revoluciones por minuto
RT: Transcripción Reversa
RT-PCR: Transcripción reversa acoplada a reacción de cadena de la polimerasa
SDS: Dodecil sulfato de sodio
SGPT: Silenciamiento Génico Post-Transcripcional
siRNA: RNA pequeño interferente
UV: Ultra-violeta
VDE: Violaxantina de-epoxidasa
WT: planta silvestre
Z-CDS: ξ – caroteno desaturasa
ZEP: Zeaxantina epoxidasa
 μ L: Microlitro
 $^{\circ}$ C: Grados Celsius

RESUMEN

En plantas se sintetiza el carotenoide β -caroteno en los organelos vegetales, cloroplastos y cromoplastos. El β -caroteno es precursor de la hormona vegetal ácido abscísico y está involucrado en la captación de luz en los cloroplastos. En animales los pigmentos β -caroteno y α -caroteno son precursores de la vitamina A y del retinol, implicados en importantes procesos fisiológicos. La enzima licopeno β ciclasa (LCYB) está involucrada directamente en la síntesis de β -caroteno. En algunas plantas, como tomate, existen dos genes que codifican para LCYB, llamados *lcyb* y *cycb*, que son expresados de manera órgano-específica en hojas y en fruto, respectivamente. *Cycb* tiene alta identidad nucleotídica con el gen capsantina capsurrubina sintasa (*ccs*) de pimentón que codifica para CCS y que, además, posee actividad LCYB.

Daucus carota (zanahoria) acumula altos niveles de β -caroteno en sus órganos fotosintéticos como en su raíz modificada o de reserva. Recientemente, se describió una secuencia de cDNA completo de *lcyb* y *ccs* en *D. carota*, los cuales podrían codificar para la enzima LCYB. Para determinar si *lcyb* tiene función específica en *D. carota*, es decir si su expresión es necesaria para la síntesis de β -caroteno en tejido fotosintético o en la raíz modificada de *D. carota*, nosotros redujimos el nivel de transcrito del gen *lcyb* mediante silenciamiento génico post-transcripcional. Para esto, transformamos de manera estable plantas de *D. carota* con construcciones para el silenciamiento génico de *lcyb*. Estas construcciones sobre-expresan un fragmento de 494pb de la región codificante del gen *lcyb* de *D.*

carota. Producto de esta transformación se obtuvieron líneas transformadas de *D. carota* con distinto grado de silenciamiento, determinado por RT-PCR semi-cuantitativo y en tiempo real. Estas líneas presentaron una disminución significativa de los niveles de β -caroteno y carotenoides totales en hojas y en la raíz modificada. Estos resultados indican que el gen *lcyb* codificaría para una enzima con actividad LCYB, y que su expresión es necesaria para la síntesis de β -caroteno en toda la planta, y por lo tanto, no presenta una función órgano-específica. Además, el silenciamiento de *lcyb* en las líneas transformadas indujo la disminución significativa de la expresión de los genes carotenogénicos *ccs*, *psy1* y *psy2*. Esto sugiere que el β -caroteno o un compuesto sintetizado río abajo de éste, como el ácido abscísico, podría tener una regulación positiva sobre la expresión de otros genes carotenogénicos.

ABSTRACT

In plants, β -carotene, a carotenoid synthesized in the organelles chloroplast and cromoplasts, is the precursor of abscisic acid and is involved in light harvesting. In animals, β -carotene and α -carotene, are precursors for vitamin A and retinol, which have important physiological functions. The enzyme lycopene β cyclase (LCYB) is directly involved in the synthesis of β -carotene and α -carotene. In some plants, such as tomato, two genes code for LCYB. These are *lcyb* and *cycb*, which have an organ-specific expression in leaves and fruits, respectively. *Cycb* has a high sequence identity with the capsanthin capsorubin synthase gene (*ccs*) of pepper, which codes for a CCS with proven LCYB activity.

Daucus carota (carrot) accumulates high levels of β -carotene in the photosynthetic organs and in its modified root. Recently, complete cDNA sequences for *lcyb* and *ccs* have been described in *D. carota*, which are predicted to code for a protein with LCYB activity. To determine if *lcyb* is necessary for β -carotene biosynthesis in *D. carota* and has an organ-specific function, we reduced the transcript abundance of *lcyb* gene by means of post-transcriptional gene silencing. To achieve this objective, we over-express a conserved cDNA fragment of 494 bp of the *lcyb* gene. of *D. carota* Carrot transgenic lines with different silencing levels, determined by semi-quantitative and real-time RT-PCR, were produced. These plants have a significant reduction of β -carotene and total carotenoid levels in their leaves and modified roots, suggesting that *lcyb* gene has a LCYB activity and that it

has a non organ specific LCYB function in *D. carota*. The decrease in *lcyb* in transgenic lines, induces also a significant decrease in the expression of other carotenogenic genes such as *ccs*, *psy1* and *psy2*. Therefore, we suggest that β -carotene or other products synthesized downstream of the pathway, such as abscisic acid, may positively regulate the expression of carotenogenic genes.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza, sintetizados por algas, plantas, algunas bacterias y levaduras. En plantas, los carotenoides son sintetizados en los organelos llamados plastidios, específicamente en cloroplastos y cromoplastos. En los cloroplastos se realiza la fotosíntesis, proceso en el cual los carotenoides cumplen una importante función al formar parte de los sistemas cosechadores de luz y del centro de reacción de los fotosistemas en las membranas tilacoidales. Es allí donde actúan como pigmentos accesorios encargados de absorber energía lumínica en la longitud de onda dentro del rango de 400-500 nm, complementando la energía absorbida por la clorofila (400-500 nm y 600-700 nm) y aumentando la eficiencia del proceso de fotosíntesis (Young, 1993; Winslow and Briggs, 1999).

Adicionalmente, los carotenoides tienen un rol antioxidante en los organismos que los sintetizan, dada su estructura rica en dobles enlaces que es capaz de atrapar especies reactivas del oxígeno evitando el daño foto-oxidativo sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ohshima y col, 1996; Young y Lowe, 2001; Demmig-Adams and Adams, 2002; Zhang y col, 2007). En plantas y cianobacterias los carotenoides también cumplen una función fotoprotectora a través de la disipación térmica mediada por el ciclo de las xantofilas, donde participan de manera directa los carotenoides zeaxantina, anteraxantina y violaxantina (Figura1) (revisado en Niyogi, 1999, Paulsen,

1999; Cogdell y Frank, 1987). Los carotenoides en los cloroplastos también cumplen un rol fotoprotectivo 1999; Cogdell y Frank, 1987). Los carotenoides en los cloroplastos también cumplen un rol fotoprotectivo frente al daño foto-oxidativo, a través del apagamiento de especies reactivas del oxígeno (Demmig-Adams and Adams, 2002). Adicionalmente, los carotenoides ejercen funciones similares a las presentes en cloroplastos en otros organismos fotosintetizadores, como cianobacterias y algas (Paulsen, 1999; Cogdell y Frank, 1987).

En cromoplastos de plantas, los carotenoides se encuentran asociados a lípidos polares y proteínas, formando complejos lipo-proteicos en estructuras globulares, cristalinas, membranosas, fibrilares o tubulares (Vishnevetsky y col, 1999; Camara y col, 1995). Estas estructuras permiten la estabilización y almacenaje de carotenoides en los cromoplastos otorgándole a estos órganos color amarillo, anaranjado o rojizo, característico de estos pigmentos. De esta forma, órganos vegetales con alto contenido de cromoplastos, como flores y frutos, adquieren colores más atractivos para animales e insectos que permiten la dispersión de polen y semillas (Bartley and Scolnik, 1995). Además, los carotenoides son precursores de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) cuya función es de vital importancia en la resistencia a estrés abiótico y en la formación y desarrollo de semillas (Leung and Giraudat, 1998). Todas estas funciones muestran que los carotenoides son compuestos imprescindibles para los organismos fotosintetizadores.

Los animales, y en particular los humanos, no son capaces de sintetizar los carotenoides *de novo*, por lo que estos pigmentos deben ser incorporados en la dieta. Carotenoides como el α -caroteno y β -caroteno, son precursores del ácido retinoico y la vitamina A, moléculas necesarias para la visión, la regulación de procesos inmunológicos, y de diferenciación celular, entre otros (Chew y Soon, 2004; Cooper,

2004; Tapiero y col, 2004). Al igual que en otros organismos, los carotenoides actúan como antioxidantes en mamíferos protegiendo del daño oxidativo, disminuyendo la activación y progresión de enfermedades crónicas, entre ellas cáncer, enfermedades cardiovasculares y daño a la mácula de la retina (Snodderly, 1995; Mayne, 1996; Fraser y Bramley, 2004; Tapiero y col, 2004).

Como ya fue mencionado, la síntesis de carotenoides en plantas se realiza en los cromoplastos y cloroplastos. Comienza con la formación de una molécula de 5 carbonos: el isopentenil pirofosfato (IPP). Esta molécula puede ser generada a través de dos rutas, una vía citosólica, la ruta del ácido mevalónico (MVA) que utiliza como precursor al acetil-CoA y tiene al mevalonato como primer intermediario. El IPP generado por esta ruta es utilizado, principalmente, en la síntesis de esteroides y ubiquinonas (Disch y col, 1998). Por otro lado, el IPP también se sintetiza por la ruta plastidial independiente del MVA que utiliza como precursor al gliceraldehido-3-fosfato, generando al 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato como primer intermediario de la síntesis de IPP, por acción de la enzima Deoxi-xilulosa sintasa. El IPP producido por esta ruta es usado, principalmente para la síntesis de clorofila, plastoquinonas, tocoferoles y carotenoides (Lichtenthaler y col, 1997; Schwender y col, 1997). Aunque estas rutas son independientes, existe una cooperación entre ellas (Figura 1), donde la ruta independiente de MVA (plastidial) puede compensar la carencia de IPP citosólico y en menor grado la ruta citosólica puede compensar la ruta independiente de MVA transfiriendo IPP al plastidio (Laule y col, 2003). Luego, la molécula de IPP isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) mediante la acción de la enzima IPP isomerasa (IPI) (Figura 1). Posteriormente, tres moléculas de IPP son condensadas con una molécula de DMAPP por la geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS), para generar una molécula de 20 carbonos, el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP). En la siguiente etapa dos

moléculas de GGPP reaccionan cola a cola para formar fitoeno (Figura 1), reacción que es catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY). Luego, esta molécula de 40 carbonos es blanco de una serie de desaturaciones para dar origen al licopeno. Las desaturaciones son catalizadas por dos enzimas, la fitoeno desaturasa (PDS) que da origen al intermediario ξ -caroteno (Figura 1), la ξ -caroteno desaturasa (ZDS) actúa sobre el ξ -caroteno para producir el tetra-cis-licopeno (Bartley y col, 1999; Isaacson y col, 2004). Los enlaces cis de esta molécula son isomerizados por la enzima carotenoide isomerasa (CRTISO) obteniendo la molécula de licopeno (trans-licopeno) (Isaacson y col 2004; Isaacson y col, 2002). El licopeno es sustrato de la enzima licopeno β ciclasa (LCYB) que puede ciclar sus extremos generando anillos en configuración β y la enzima, licopeno ϵ ciclasa (LCYE) que puede ciclar un extremo del licopeno para generar un anillo en configuración ϵ (Figura 1). Producto de la acción de estas enzimas en plantas podemos encontrar dos carotenoides: el β -caroteno, carotenoide bicíclico que posee dos anillos β , y el α -caroteno, carotenoide bicíclico que posee un anillo β y otro ϵ (Figura 1). Los carotenoides sintetizados hasta este punto en la ruta son llamados carotenos, mientras que los sintetizados posteriormente se les llama xantófilas por tener grupos de oxígeno en sus estructuras. De esta forma, el β -caroteno puede ser hidroxilado por acción de la β -caroteno hidroxilasa (C β Hx), generando zeaxantina. Mientras que el α -caroteno puede ser hidroxilado por C β Hx y la ϵ -caroteno hidroxilasa (C ϵ Hx) produciendo luteína, el producto final de la rama del α -caroteno en la mayoría de las plantas (Figura 1). Siguiendo con la ruta de síntesis de la rama β -ciclada, la zeaxantina es epoxidada generando anteraxantina y luego violaxantina por efecto de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP). Esta reacción puede ser revertida por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) (Figura 1) y el equilibrio de estas dos reacciones, llamado ciclo de las xantofilas, regula el sistema de

fotoprotección en cloroplastos así como fue mencionado previamente (Niyogi, 1999). Luego, sobre la violaxantina actúa la enzima neoxantina sintasa, generando neoxantina (Figura 1). Ambas, violaxantina y neoxantina son los precursores plastidiales finales del ácido abscísico (ABA), pues luego estos pigmentos son divididos y las moléculas producidas son transferidas al citosol donde son utilizadas para la síntesis de ABA (revisado en Nambara y Marion-Poll, 2005). Los carotenoides anteraxantina y violaxantina en algunos modelos vegetales son sustrato de la enzima capsantina capsurrubina sintasa, generando capsantina y capsurrubina, respectivamente (Figura 1).

Todas estas enzimas son codificadas por genes nucleares y una vez sintetizadas son importadas a los plastidios por la presencia de péptidos de destinación plastidial localizados en el extremo amino terminal de las proteínas (Cunningham y Gantt, 1998). Dadas las importantes funciones que cumplen los carotenoides solo se han descrito algunos mutantes con pérdida de función para enzimas carotenogénicas. En *A.thaliana* se han descrito mutantes para PDS y ZDS, y en girasol (*Helianthus annuus*) para PDS. Estos mutantes son letales en condiciones homocigotas y en heterocigosis presenta un “fenotipo deficiente de carotenoides” que se caracteriza por presentar un blanqueamiento de sus hojas, acumular especies reactivas del oxígeno, muerte celular en sus hojas con una distribución en mosaico, baja resistencia al estrés abiótico y semillas con germinación temprana (vivíparas) (Conti y col, 2004; Dong y col, 2007). Estas dos últimas características corresponden al “fenotipo deficiente de ABA”. Recientemente, fue descrito en arroz (*Oryza sativa*) dos mutante del gen *lcyb*, *phs4-1* y *phs4-2*, que presentan deleciones en la región codificante del gen. La actividad licopeno β ciclasa es codificada por un solo gen en arroz, por esto las mutantes homocigotas *phs4-1* y *phs4-2* son letales a las 4 semanas después de la germinación y

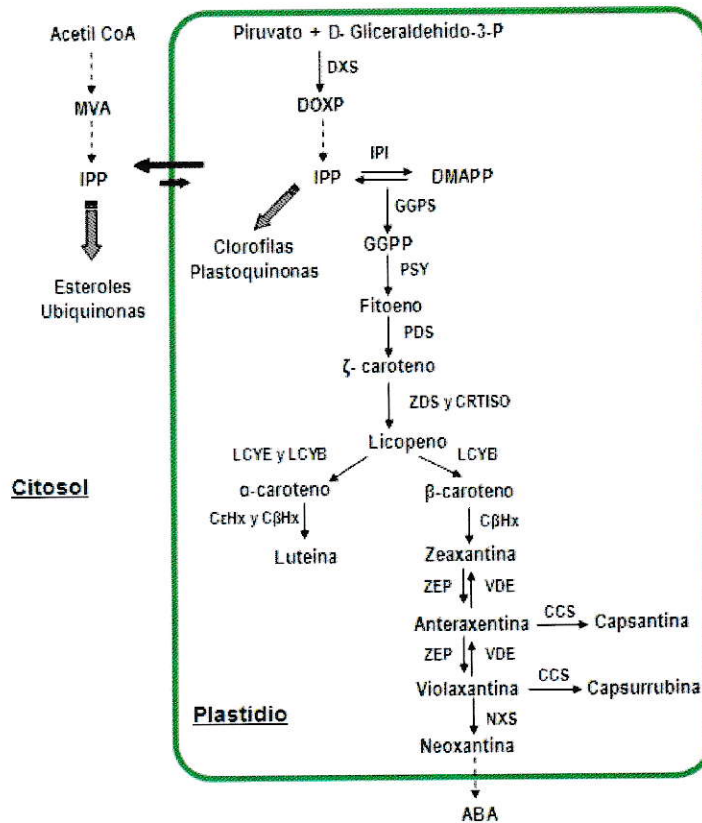


Figura 1. Ruta de síntesis de carotenoides en plantas.

El isopentenil pirofosfato (IPP) precursor de la ruta de carotenogénesis, se sintetiza principalmente por la ruta independiente de ácido mevalónico (plastidial) que involucra la participación de la enzima 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS). El IPP isomeriza a dimetilalil pirofosfato (DMAPP), por la acción de la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa (IPI), y ambos son condensados para formar el geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), reacción que es catalizada por la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS). Luego, dos moléculas de GGPP son utilizadas para formar fitoeno mediante la acción de la enzima fitoeno sintasa (PSY). El fitoeno sufre desaturaciones a cargo de las enzimas fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS), produciendo tetra-cis-licopeno, estos enlaces cis son isomerizados para formar licopeno, por acción de la enzima carotenoide isomerasa (CTRISO). El licopeno puede ser ciclado por las enzimas licopeno β ciclasa (LCY β) y licopeno ϵ ciclasa (LCY ϵ) para generar β -caroteno y α -caroteno. Luego, estas moléculas pueden ser hidroxiladas por enzimas como C β Hx y C ϵ Hx para dar origen a zeaxantina y luteína. A partir de zeaxantina se sintetiza anteraxantina y violaxantina por la acción de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP). Luego, la neoxantina sintasa (NXS) a partir de violaxantina sintetiza neoxantina. Neoxantina y violaxantina son los últimos carotenoides plastidiales precursores del ácido abscísico (ABA). En algunos modelos vegetales anteraxantina y violaxantina pueden dar origen a capsantina y capsurrubina, respectivamente, por acción de la enzima capsantina capsurrubina sintasa (CCS). Flecha discontinua indica que en ese paso de la ruta se llevan a cabo varias reacciones.

en condiciones heterocigotas generan el “fenotipo deficiente de carotenoides y de ácido abscísico”, descrito anteriormente. Este es el único mutante descrito del gen *lcyb* en plantas que poseen un solo gen que codifique para licopeno β ciclasa, esto muestra la importancia de esta actividad para la vida de las plantas. En tomate existen los mutantes *Beta*, *Old-gold* y *Old-gold-crimson* que presentan mutaciones en el gen *cycb*, que codifica para una enzima con actividad licopeno β ciclasa que es específica de fruto (Ronen y col, 2000). El mutante *Beta* sobre-expresa al gen *cycb* generando la acumulación de altos contenidos de β -caroteno en el fruto de tomate, mientras que los mutantes *Old-gold* y *Old-gold-crimson* presentan una delección en el gen *cycb* y esto provoca la acumulación de licopeno en el fruto de tomate. Sin embargo, pese a que los *Old-gold* y *Old-gold-crimson* presentan pérdida de función generan plantas viables, ya que en tomate existe otro gen, el gen *lcyb*, que codifica para la actividad licopeno β ciclasa, por lo tanto, no se pierde totalmente esta actividad (Ronen y col, 2000). De manera similar, existe un mutante llamado “yellow pigment” que sintetiza menos carotenoides en los frutos, debido a que el gen *psy1* de tomate (específico de fruto) genera una proteína no funcional (Fray y Grierson, 1993), pero este organismo cuenta con 2 genes que codifican para PSY (Fraser y col, 1999, Fraser y col, 1994), por lo tanto la pérdida de función fitoeno sintasa no es completa, lo que permite la viabilidad de la planta. Además, se han descrito mutantes que presentan alterados los niveles de carotenoides en frutos de tomate debido a mutaciones en genes que codifican para proteínas que participan en la cascada de transducción de señales que regulan la síntesis de carotenoides. Ejemplo de esto son los mutantes “high pigment” (*hp-1*, *hp-2*, *hp-3*) que tiene mutado un gen que codifica para una proteína que participa en la transducción de señales del fitocromo y como consecuencia de estas mutaciones sintetizan más carotenoides en el fruto que una planta silvestre (Peters y col, 1998;

Mustilli y col, 1999; Cookson y col, 2003, Galpaz y col, 2008). En otros modelos vegetales, entre ellos papaya y naranja también se han observado mutantes que presentan alterados los niveles de carotenoides, por efecto de mutaciones en los genes carotenogénicos (Alquezar y col, 2008; Liu y col, 2007, Rodrigo y col, 2003).

La regulación de la expresión de los genes carotenogénicos y su correlación con la biosíntesis de carotenoides ha sido motivo de estudio hace varias décadas. Estos estudios indican que la regulación de los genes carotenogénicos es dependiente de luz y ocurre principalmente a nivel transcripcional (Römer y col, 2005). Esto ha sido descrito en modelos en los que el aumento del contenido de carotenoides está relacionado con la presencia de luz, como ocurre durante la maduración de frutos y la de-etiolación de hojas donde ocurre la transición de etioplastos a cloroplastos. Los etioplastos son cloroplastos deficitarios en clorofila presentes en plantas etioladas, crecidas en condiciones insuficientes de luz. Cuando plantas etioladas son traspasadas a condiciones normales de luz, los etioplastos de hojas se transforman en cloroplastos ya que comienza la biosíntesis de clorofila y de carotenoides, y esto es un proceso dependiente de la luz (Rascio y col, 1984). En *Nicotiana tabacum* durante el proceso de transición de etioplastos a cloroplastos aumentan los niveles de transcrito del gen *psy*, junto al aumento de los carotenoides (von Lintig y col, 1997). Esto también ocurre en *Arabidopsis thaliana*, donde el promotor del gen de fitoeno sintasa (*psy*) se encuentra activo a niveles basales en oscuridad y su transcripción aumenta en tratamientos con luz (Welsch y cols, 2003). Además, en ensayos de luz/oscuridad realizados en hojas de *Capsicum annuum* (pimentón), se observó que plantas crecidas en condiciones normales (fotoperiodo de 16 horas) que luego fueron expuestas a luz de alta intensidad aumentó la transcripción de genes carotenogénicos como *psy*, fitoeno desaturasa (*pds*), ξ -caroteno desaturasa (*zds*) y licopeno β ciclasa (*lcyb*),

mientras que al someterlos a oscuridad, la expresión de éstos, disminuyó (Simkin y col, 2003). De manera similar, en hojas de *Nicotiana tabacum* expuestas a luz de mayor intensidad se observó un aumento de la transcripción de los genes carotenogénicos analizados caroteno β hidroxilasa ($c\beta hx$), zeaxantina epoxidasa (zep) y violoxantina de epoxidasa (vde) (Woitsh y Römer, 2003).

Por otra parte, se ha descrito que la maduración de frutos es dependiente de luz, entre otros factores (hormonas, temperatura, genes de desarrollo) (Adams-Phillips y col, 2004). Asociado a la maduración, aumenta la biosíntesis de carotenoides en frutos, la cual está regulada principalmente a nivel transcripcional, aumentando la expresión de algunos genes y disminuyendo la expresión de otros para favorecer la acumulación de un carotenoide en particular, como ocurre en tomate, naranja y damasco (Giuliano y col, 1993; Corona y col, 1996; Ronen y col, 1999; Bramley, 2002; Kato y col, 2004; Rodrigo y col, 2004; Kita y col, 2007). En tomate, se observa un aumento de los transcritos del gen D-xilulosa sintasa (dxs), pds y $psy1$, al mismo tiempo que disminuye la expresión de licopeno β ciclasa ($lcyb$) y licopeno ϵ ciclasa ($lcy\epsilon$) dirigiendo la acumulación de licopeno en los frutos de tomate maduro (Fraser y col, 1994; Pecker y col, 1996; Ronen y col, 1999; Lois y col, 2000). Además, se ha observado que los niveles de carotenoides en frutos de tomate son mayores en tomates que han sido tratados con mayor intensidad de luz respecto a los crecidos en baja intensidad lumínica (Gautier y col, 2008), lo cual correlaciona con el aumento de la expresión del gen psy en fruto de tomate tratados con luz (Alba y col, 2000). Entonces, de acuerdo a lo descrito en estos modelos, la biosíntesis de carotenoides es activada por luz y esta regulación opera principalmente a nivel transcripcional.

En modelos vegetales caracterizados por una alta síntesis de carotenoides, se ha descrito más de un gen que codifica para una misma actividad enzimática. En tomate, por ejemplo se han descrito 2 genes que codifican para PSY, uno de ellos de expresión predominante en tejido fotosintético, asociado a cloroplasto, llamado *psy2*; el otro, participa en la biosíntesis de carotenoides durante la maduración de fruto de tomate, asociado a cromoplasto (Fraser y col, 1999, Fraser y col, 1994). Por otro lado, PSY es codificada por tres genes en arroz, dos de ellos regulados por fitocromo, por lo tanto, regulado por luz, y un tercer gen dependiente de la síntesis de ABA (Welsch y col, 2008). La enzima C β Hx de tomate también se encuentra codificada por dos genes, uno de ellos (*crtR-b1*) tiene expresión constitutiva en hojas, mientras que el otro (*crtR-b2*) es activado principalmente en flores (Galpaz y col, 2006). La expresión de *crtR-b2* en fruto se expresa en bajos niveles, mientras que en hojas no se detecta su expresión (Galpaz y col, 2006).

En tomate también existen dos genes que codifican para la actividad licopeno β ciclasa, enzima clave en la regulación de la biosíntesis de carotenoides (Ronen y col, 1999; Bramley, 2002), uno de ellos es *lcyb*, asociado principalmente a la biosíntesis de carotenoides en tejido fotosintético, mientras que *cycb*, al igual que *psy1*, presenta expresión fruto específica (cromoplasto) (Ronen y col, 2000). En pimentón (*Capsicum annuum*) se han descrito 2 genes que codifican para la actividad licopeno β ciclasa, estos son *lcyb* y *ccs* (Huguene y col, 1995). Este último codifica para una proteína que además tiene actividad capsantina capsurrubina sintasa (CCS), encargada de la síntesis de capsantina y capsurrubina a partir de las xantófilas anteraxantina y violaxantina, respectivamente (Bouvier y col, 1994; Figura 1). Estos pigmentos de color rojo, son los que dan la tonalidad característica a los pimentones. Análisis de expresión de estos genes muestran que *lcyb* se expresa preferentemente en hojas y casi no es

percibido durante la maduración de frutos, mientras que *ccs* es transcrito principalmente durante la maduración de frutos de pimentón (Huguene y col, 1995; Huguene y col, 1996). Estos estudios indican que en estos modelos vegetales que sintetizan alto contenido de carotenoides en órganos ricos en cromoplastos, existe más de un gen que codifica para enzimas claves en la biosíntesis de carotenoides como PSY y LCYB, donde uno de ellos es específico de tejido fotosintético (cloroplastos) y el otro es específico de fruto (cromoplastos).

Esta tesis utiliza como modelo de estudio a *Daucus carota*, zanahoria. Este modelo vegetal se caracteriza por sintetizar altos niveles de carotenoides, en especial en su raíz modificada o de reserva. La raíz modificada de zanahoria es un órgano con alto contenido de cromoplastos, capaz de almacenar altas concentraciones de carotenoides (11 mg/g peso fresco). De éstos, aproximadamente el 70% corresponde a β -caroteno (Fraser y Bramley, 2004), convirtiendo a la zanahoria en una importante fuente de vitamina A. La síntesis de carotenoides en zanahoria también se produce en sus hojas, que se encuentran expuestas a la luz, por ello, es posible que la expresión de los genes carotenogénicos sea activada por luz en las hojas de *D. carota*, tal como ha sido descrito en otros modelos vegetales. Sin embargo, una de las particularidades de este modelo es que sintetiza altos niveles de carotenoides en su raíz modificada, que se encuentra en condiciones de oscuridad, lo cual supone que en este órgano existiría algún tipo de regulación distinta a la descrita actualmente, convirtiéndola en un modelo de gran interés de estudio. En la base de datos Genbank se encuentran disponibles secuencias de cDNA para la mayoría de los genes carotenogénicos de *D. carota*, encontrando que existen publicados 3 cDNAs completos que codifican para C β Hx, 2 para PSY y ZDS, y una secuencia de cDNA completa para PDS, CRTISO, LCYB, CCS, LCYE, ZEP y VDE (Just y col, 2006). Sin embargo, hasta el momento no

existe publicado ningún estudio de la regulación y de la función de estos genes en zanahoria. Para comenzar con el estudio de la regulación de la biosíntesis de carotenoides en *D. carota*, en esta tesis se abordó dilucidar la función del gen *lcyb* que codificaría para la enzima licopeno β ciclasa, enzima clave en la síntesis de β -caroteno el principal carotenoide acumulado en zanahoria. Además, como fue mencionado, esta enzima es clave en la regulación de la biosíntesis de carotenoides en otros modelos vegetales (Bramley, 2002).

Respecto al gen *lcyb* de *D. carota*, actualmente, en la base de datos Genbank, se encuentran 4 secuencias de cDNA asociadas a este gen y que codificarían para una enzima con actividad licopeno β ciclasa. De ellas solo una corresponde a un cDNA completo: *lcyb* (DQ192190, 2022 pb, Just y cols., 2007), mientras que las otras 3 son secuencias parciales de aproximadamente 300pb de cDNA: *lcyb2* (AM181169) y *lcyb3* (AM181168), obtenidas a partir de fruto y *lcyb 4* (AF208531). La identidad nucleotídica que presentan estas secuencias respecto a *lcyb* es superior al 94%, lo cual sugiere que corresponde a un solo gen. Además, *lcyb* de *D. carota* presenta sobre un 75% de identidad nucleotídica con los cDNAs de *lcyb* de otras plantas, un 45% con algas y cerca de un 10% con cianobacterias.

Es importante destacar que Just y col (2007), mediante mapeo cromosómico, análisis de rasgo cualitativo asociado a loci (QTL) y polimorfismos de nucleótido único (SNP) no sólo identificó a *lcyb* (DQ192190), sino que también propuso al gen *ccs* (DQ192192) como *lcyb2* el cual podría codificar para una licopeno β ciclasa, argumentando que en zanahoria no se encuentran los pigmentos capsantina ni capsurrubina, productos directos de la enzima CCS. Apoyando esta propuesta, el gen *ccs* de pimiento codifica para una enzima que es capaz de tener actividad licopeno β ciclasa, *in vitro* e *in vivo* mediante ensayos de complementación con *Escherichia coli*

(Bouvier y col, 1994; Ronen y col, 2000). Además, análisis previos muestran que los genes de ccs de pimentón, naranja, zanahoria y cycb de tomate, tienen sobre 67% de identidad nucleotídica en la región codificante, lo cual sugiere que estos genes son ortólogos, y que por lo tanto, ccs de *D. carota* podría codificar para una enzima con actividad licopeno β ciclasa. Estos antecedentes apoyan la hipótesis de que en zanahoria podría existir más de un gen que codifique para una enzima con actividad licopeno β ciclasa (lcyb y ccs) y que estos genes podrían presentar una función órgano específica en zanahoria.

En resumen, en frutos y órganos fotosintéticos la regulación de la biosíntesis de carotenoides ocurre a nivel transcripcional en un proceso dependiente de luz. Siendo los genes que codifican para PSY y LCYB los principales puntos de esta regulación. Además, en modelos como tomate existen 2 genes que codifican para LCYB: lcyb, asociado a tejido fotosintético (cloroplasto) y cycb de expresión fruto específico (cromoplasto), que como ya mencionamos posee una alta identidad nucleotídica con los genes ccs de otras plantas. Por otro lado, *D. carota* presenta dos genes que codificarían para enzimas con actividad licopeno β ciclasa, estos son los genes lcyb y ccs. Este modelo sintetiza β -caroteno en órganos fotosintéticos (cloroplastos) y en la raíz modificada (cromoplastos) bajo condiciones de luz y oscuridad, respectivamente. Además, ambos órganos tienen un desarrollo temporal y estructural diferente, lo que sugiere que la regulación en la expresión de genes carotenogénicos y la biosíntesis de carotenoides debe ser diferente en ambos órganos. Adicionalmente, se han publicado secuencias completas de los cDNA para el gen lcyb (DQ192190) y ccs (DQ192192) en zanahoria. Todos estos antecedentes nos hace suponer que existiría más de un gen que codificarían para la actividad licopeno β ciclasa en *D. carota*, y que además, presentarían expresión diferencial. Además, considerando que el gen lcyb de *D. carota*

posee un 75% de identidad nucleotídica con los genes *lcyb* de otras plantas, mientras que *ccs* no presenta identidad nucleotídica con estos genes, nos permite proponer que el gen *lcyb* (DQ192190) sería un buen candidato para codificar para una enzima con actividad licopeno β ciclasa en zanahoria. Por lo tanto, nosotros proponemos en esta tesis que la expresión del gen *lcyb* es necesaria para la síntesis de β -caroteno en tejido fotosintético (asociado a cloroplasto) o en la raíz modificada (asociado a cromoplasto), es decir, presenta una función órgano específica. Para responder esta pregunta nosotros disminuimos el nivel total de transcrito para el gen *lcyb* de zanahoria mediante silenciamiento génico post-transcripcional y de esta forma de determinar en que órgano de la planta el gen *lcyb* es necesario para la síntesis de carotenoides, ya sea en la raíz modificada o en las hojas, dependiendo de donde se observe el efecto de la disminución de la presencia de transcritos para este gen. Para esto, se utilizaron los vectores binarios para el silenciamiento específico del gen *lcyb* de *D. carota*, pBIN19/L-S, pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ADS, que fueron diseñados y construidos durante el Seminario de Título de Lorena Pizarro (2007).

El silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) es un sistema molecular que consiste en la degradación específica de una población de RNAs homólogos. Uno de los mecanismos que inducen el SGPT, se basa en la presencia de una copia del transgen en sentido y con una alta tasa de transcripción, de esta forma cuando se sobrepasa el nivel umbral se activa una RNA polimerasa dependiente de RNA (RNAPd) que sintetiza la hebra complementaria al mRNA endógeno (Figura 2), lo que permite la formación de un RNA de doble hebra (dsRNA) (van Blockland y cols, 1994; Tang y col, 2003). Es así como transgenes con promotores fuertes gatillan con una mayor eficiencia el SGPT (Que et al, 1997). El vector pBIN19/L-S fue diseñado para generar silenciamiento mediante este mecanismo, mientras que los vectores pBIN19/L-AS y

pBIN19/L-ASD utilizan la siguiente estrategia que se basa en inducir eficientemente el silenciamiento a través de la expresión antisentido del gen blanco o un fragmento de éste. De esta forma se genera un mRNA complementario al gen blanco, el cual hibrida con el mensajero endógeno blanco formando el dsRNA que inicia el SGPT (Figura 2). Se ha descrito que para que un transgen sea capaz de inducir silenciamiento de una secuencia homóloga se requiere una identidad nucleotídica superior al 80% y un tamaño mínimo de 100pb del transgen o un fragmento de éste (Burton y col, 2000, Ingelbrecht y col, 1999; Mueller y cols, 1995; Schweizer y col, 2000).

Así, una vez inducida la maquinaria de silenciamiento, los dsRNAs intermediarios son cortados por la acción de una RNAsa de tipo III llamada Dicer, generando pequeñas moléculas de 21-23 nucleótidos de dsRNA, llamado RNA interferente (siRNA) corto y otras de 24-26 nucleótidos, llamado siRNA largo (Susi y col, 2004; Tang y col, 2003). El siRNA corto participa en el SGPT local uniéndose al complejo RISC que reconoce al RNA endógeno blanco y sintetiza el RNA de doble hebra. Mientras que el siRNA largo se transmite a través del sistema vascular de la planta, imitando el movimiento de partículas virales llegando a otra células vegetales, donde a través de RISC genera el dsRNA silenciando el gen blanco propagando el silenciamiento a toda la planta (Hamilton y col, 2002; Voinnet y col, 1998).

Entonces, de acuerdo a estas características el silenciamiento génico post-transcripcional permite elegir a un gen blanco y silenciarlo de manera sistémica y altamente específica. Además, permite generar distintas líneas con diferentes grados de silenciamiento (knock down), evitando de esta forma, obtener la pérdida de función completa del gen es estudio (knock out). Las plantas knock out poseen interrumpida la secuencia del gen de interés, obtenido mediante la inserción al azar de un T-DNA a través de la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Luego, mediante técnicas

moleculares se selecciona la mutante heterocigota, la cual se debe autopolinizar para generar plantas mutantes homocigotas. Como se describió previamente existen muy pocas plantas mutantes con pérdida de función completas en genes involucrados en la síntesis de carotenoides (por ej. *lcyb*) debido a la importancia que éstos poseen en la fisiología vegetal. Además, *D. carota* es una planta bianual, por lo tanto se podrían realizar los cruzamientos entre heterocigotos mutantes sólo al segundo año. Estos antecedentes permiten descartar la metodología de knock out como herramienta para el análisis de la importancia del gen *lcyb* y convierten al knock down llevado a cabo mediante silenciamiento génico post-transcripcional, en la herramienta para el estudio funcional del gen *lcyb* de *D. carota*, tal como fue descrito para el estudio del gen *cycb* de tomate (Ronen y col. 2000) y otros genes esenciales en el metabolismo de las plantas (Matthew, 2004).

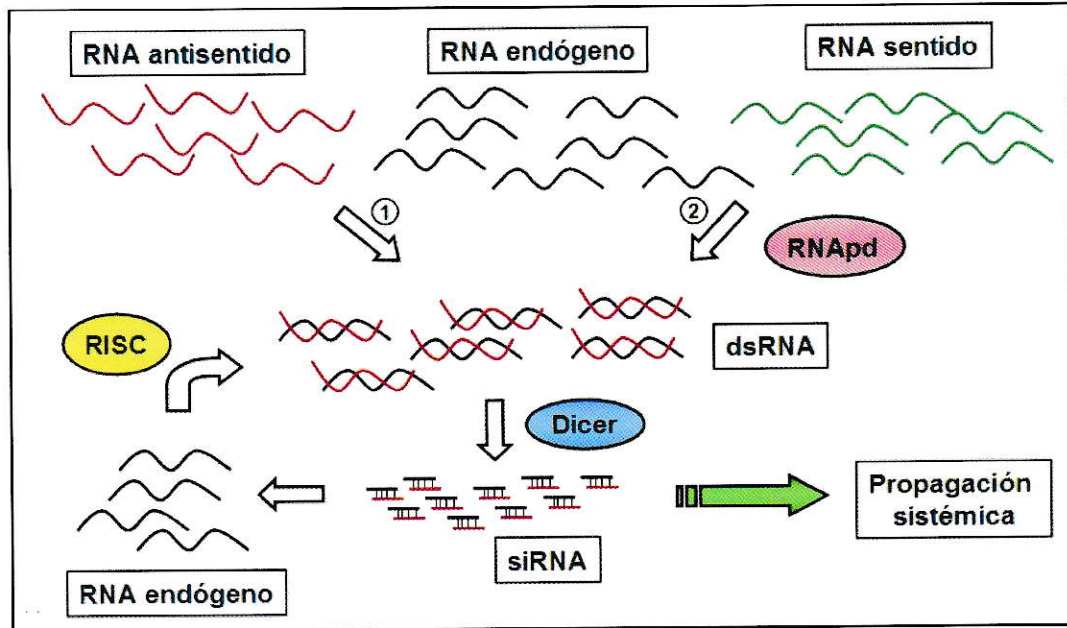


Figura 2: Esquema del Mecanismo de Silenciamiento Génico Post-transcripcional.

En la figura se muestran los dos mecanismos capaces de inducir silenciamiento génico post-transcripcional. En 1 el RNA endógeno o mensajero blanco (en negro) hibrida con el RNA antisentido (en rojo) formando el RNA de doble hebra o dsRNA. En 2 cuando el RNA sentido (en verde) junto al RNA endógeno sobrepasan el nivel umbral se activa la RNA polimerasa dependiente de RNA (RNAPd) que sintetiza la hebra complementaria (antisentido) del gen blanco generando el dsRNA. El dsRNA es cortado por DICER, produciendo los siRNA que junto al complejo RISC reconocen al mensajero endógeno, sintetizando la hebra complementaria, y formando el dsRNA que es cortado por DICER, silenciando el gen blanco. Los siRNA, además, son propagados de manera sistémica a través del floema, generando el silenciamiento en toda la planta.

HIPÓTESIS:

“La expresión del gen *lcyb* en *Daucus carota* es necesaria para la síntesis de β -caroteno en el tejido fotosintético o la raíz modificada, es decir, es órgano-específica”.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA:

“La expresión del *lcyb* en *Daucus carota* es necesaria para la síntesis de β -caroteno en toda la planta, es decir, no es órgano-específica”.

OBJETIVOS:

1. Objetivo General:

“Evaluar la función del gen *lcyb* de *D. carota* en la biosíntesis de carotenoides, mediante Silenciamiento Génico Post-Transcripcional (PTGS)”.

2. Objetivos Específicos:

2.1. Transformación de *Daucus carota* mediante *A. tumefaciens* con las construcciones para silenciamiento génico post-transcripcional de *lcyb*.

2.2. Análisis molecular de las líneas transformantes de *D. carota* resistentes a kanamicina.

2.2.1. Análisis de la transgénesis de las líneas transformantes de *D. carota* resistentes a kanamicina mediante PCR y RT-PCR.

2.2.2. Determinación del nivel de silenciamiento del gen *lcyb* en las líneas transformadas de *D. carota* mediante RT-PCR semicuantitativo y en tiempo real.

2.3. Evaluación de la función del gen de *lcyb* de *D. carota* mediante análisis de las líneas transformadas.

2.3.1. Análisis de la composición de carotenoides en las líneas transformadas de *D. carota* mediante espectrofotometría y HPLC.

2.3.2. Análisis de expresión de otros genes carotenogénicos mediante RT-PCR en tiempo real.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Material Biológico.

- ***Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101:**

C58, plásmido TI curado, Gen^R, Rif^R.

- ***Daucus carota* Lineus, subespecie Nantes.**

1.2. Medios de Cultivo.

- **Medio LB:** 2% triptona; 0,8% NaCl.

- **Medio MS:** MS (Murashige & Skoog basal medium) 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20%. pH = 5,8

- **Medio MS-Agar:** MS (Murashige & Skoog basal medium) 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20%, agar-agar 7%. pH = 5,8

1.3. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados son de calidad para biología molecular y/o calidad para análisis y fueron obtenidos de Merck, Sigma-Aldrich, Phyto Technology Laboratories, Promega, Omega Bio-tek, Fermentas, Stratagene.

2. MÉTODOS.

2.1. Extracción de DNA de tejido vegetal con buffer CTAB.

Se tomaron aproximadamente 200 mg de hojas o raíz modificada de *D. carota* de 3 meses de desarrollo, se congeló con Nitrógeno líquido y se maceró completamente en mortero agregando 0,6 mL de buffer CTAB (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM y Tris-HCl pH=8 100mM). Se incubó a 70°C por 30 minutos. Luego, se adicionó 0,4 mL de buffer CTAB y se incubó a 70°C por otros 15 minutos. A la mezcla se agregó 0,4 mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión varias veces. Se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm. Se tomó 0,7 mL de la fase superior y fue puesto en un tubo nuevo. Se agregó 0,7 mL de isopropanol y se dejó por 30 minutos a -20°C para inducir la precipitación del DNA. Pasado este tiempo se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 0,7 mL de etanol 70%. Se centrifugó 5 minutos a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 40 µL agua destilada estéril.

2.2. Extracción de RNA de tejido vegetal.

Para la extracción de RNA de hojas y raíz de *Daucus carota* de 3 meses de edad se utilizó el reactivo RNA-Solv Reagent de Omega Bio-tek siguiendo las indicaciones del proveedor. Se utilizó 1 ml de RNA-solv para macerar 100 mg de tejido congelado con Nitrógeno líquido y molido en mortero. Se agregó 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), homogenizando por inversión. Se incubó en hielo por 10 minutos, luego se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos. La fase acuosa (superior) fue traspasada a un tubo nuevo y se agregó 500 µL de isopropanol frío. Luego, se

centrifugó a 12.000 rpm por 10 minutos y se eliminó en sobrenadante. Al precipitado de RNA se agregó 1 ml de etanol 70% en agua libre de RNAsa (0,01% DEPC en agitación a 37°C por lo menos durante 4 horas, luego de esto se autoclavó a 120°C por 30 minutos) y se centrifugó a 7.500 rpm por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente, se resuspendió el RNA en 40 µL de agua libre de RNAsa. Todo el procedimiento se realizó en hielo para evitar la desnaturación del RNA. Luego, el RNA se visualizó en un gel de agarosa al 1%. La concentración del RNA se determinó mediante espectrofotometría (Sambrook y col, 1989.).

2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa.

Los ácidos nucleicos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% en buffer de corrida TAE al 1X (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 19 mM, EDTA 1 mM) con 20 mg/L de bromuro de etidio (BrEt). El voltaje utilizado fue entre 80 y 100 V para geles de DNA, mientras que los geles de RNA fueron corridos a 70V, por 10 minutos. Las bandas de ácidos nucleicos fueron visualizadas por la fluorescencia emitida por el BrEt, que se intercala en la molécula de DNA, al ser expuesta a la luz UV de un transiluminador. La imagen fue fotografiada utilizando el equipo Dark Room Multigenius Syngene y un transiluminador Syngene mediante el programa Gene Snap de Syngene y la fluorescencia fue cuantificada por el programa Gene Tools de Syngene.

2.4. RT-PCR semicuantitativo del gen Icyb.

2.4.1. Tratamiento del RNA con DNAsa I.

Se tomaron 2 µg de RNA obtenido previamente (2.2.) y se le adicionaron 50 unidades de DNAsa I libre de RNAsa (Fermentas), buffer de DNAsa I 1X (10 mM Tris-

HCl pH 7,5; 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM CaCl₂) y 0,5 µL de inhibidor de RNAsa (Fermentas), correspondiente a 20 unidades de enzima. Se completó con agua tratada con di-etil piro-carbonato (DEPC) hasta un volumen total de 10 µL. Luego, se incubó a 37 °C por 30 minutos. Para inactivar la DNAsa I se agregó 1 µL de EDTA 25 mM en agua DEPC. Después de este tratamiento el RNA es utilizado directamente en la síntesis de la hebra complementaria (cDNA).

2.4.2. Transcripción Reversa, síntesis de cDNA.

Para la reacción de transcripción reversa se utilizó la mitad del volumen del RNA tratado con DNAsa I (5,5 µL), correspondiente a 1µg de RNA. Se agregó 1 µL de oligo AP (5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGCTTCG3') 10 µM en un volumen final de 10 µL, completados con agua DEPC. Esta solución fue puesta en el termociclador a 70°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo se incubó en hielo por 2 minutos y se agregó 7 µL de una mezcla que contiene 4 µL de buffer 5X de la enzima transcriptasa reversa ImProm-II™ (Promega), 1 µL de dNTP 10 mM disueltos en agua DEPC, 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM y 2 µL de agua DEPC. La mezcla se incubó 2 minutos a 25°C y se agregó 1 µL de enzima ImProm-II™ (Promega). Posteriormente, se incubó a 42°C por 60 minutos y por último se detuvo la reacción a 70°C durante 15 minutos.

2.4.3. Amplificación del fragmento del gen Icyb mediante PCR.

Se amplificó mediante PCR un fragmento de 650pb de la secuencia codificante del gen Icyb (Nº acceso: DQ192190) utilizando partidores específicos (Tabla 1) y como molde los cDNAs obtenidos, según lo descrito en 2.4.2. Además, se amplificó un fragmento de 220 pb del gen ribosómico 18S, utilizado como calibrador de la expresión, debido a que este gen tiene una expresión constitutiva en las condiciones de estudio. La mezcla de reacción fué la siguiente: 2 µL de molde, buffer 1X correspondiente a la Paq500 DNapolimerasa (Stratagene), 0,5 µL de dNTPs 10 mM,

0,5 μL de cada partidor a 10 μM y 0,2 μL de enzima (1 U), en un volumen total de 25 μL . Además, se realizaron dos controles de la reacción, uno de ellos utilizando el RNA tratado con DNAsa (control sin transcripción reversa, S/RT) y un control negativo de la reacción de PCR sin molde (C-). El programa de amplificación que se utilizó fue iniciado por una denaturación a 95°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos para amplificar el fragmento del gen 18S y 39 ciclos para amplificar el fragmento del gen lcyb, del siguiente programa: denaturación a 95°C por 50 seg, 52°C por 40 seg para la unión de los partidores y por último una temperatura de elongación de 72°C por 50 seg. La reacción continuó con una extensión final a 72°C por 8 minutos y concluyó manteniendo las muestras a 4°C. La amplificación de ambos fragmentos (18S y lcyb) se realizaron al mismo tiempo, por lo tanto al término del ciclo 35, fueron retiradas las reacciones correspondientes a la amplificación del fragmento del gen 18S. Para determinar el número óptimo de ciclos de amplificación para cada uno de los genes se realizó previamente una curva de amplificación en gradiente a los ciclos 29, 33, 35, 37, 39, 43 para cada uno de los fragmentos analizados (lcyb, 18S y nptII) y determinar así en cual de éstos ciclos el fragmento amplificado se encuentra en la etapa exponencial de concentración y abundancia.

2.5. PCR y RT-PCR del gen de neomicina fosfotransferasa (nptII) y del gen del RNA ribosomal 18S (RNAr18S).

Para la amplificación de un fragmento de los genes RNAr18S y nptII, se utilizaron partidores específicos (Tabla 1) y 100 ng de DNA genómico (2.1) o 2 μL de cDNA (2.4.2), buffer 1X de la enzima Paq500 DNAPolimerasa (Stratagene), 0,5 μL de dNTPs 10 mM, 0,5 μL de cada partidor específico a 10 μM (Tabla 1) y 0,2 μL de enzima Paq500 DNAPolimerasa (1 U), en un volumen total de 25 μL . El programa de

amplificación de los fragmentos del gen RNAr18S y nptII es igual al descrito previamente, extendiéndose por 35 ciclos para el RNAr18S y por 38 ciclos para el gen nptII. La amplificación del fragmento del gen RNAr18S se realizó a todos los DNAs y cDNAs debido a que se consideró como parámetro de integridad del material genético utilizado.

Tabla 1: Secuencia de Partidores utilizados.

Se presentan las secuencias de los partidores que fueron utilizados en esta tesis, con su respectiva temperatura de fusión, el tamaño del fragmento amplificado, el nombre del gen y el origen del cual provienen.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Gen	Tamaño Amplificado
5' lcyb 3' lcyb	GGGTTAGCGGTAGCACAAAC GCCTCTGCCTGTACTCCCTC	60 62	lcyb de <i>D. carota</i>	760 pb
5' nptII 3' nptII	CAAGATGGATTGCACGCA CTATGTCCTGTAGCGGT	54 52	Neomicina fosfotransferasa II	650 pb
5' 18S 3' 18S	TTGATTACGTCTGCCCTT ACAATGATCCTTCCGCAGTT	56 58	rRNA 18S de <i>D. carota</i>	180 pb
5' Qlcyb 3' Qlcyb	TGAGTGC AGCTTACACC TACTTGATTA AACTGCAGAAGATCTTGGAGA	74 60	lcyb de <i>D. carota</i>	160 pb
5' Qpsy1 3' Qpsy1	AGTCGATGGAGCATTACCATAATTC CTAATGGGTTACAGAGGGTTGTGTTA	70 74	psy 1 de <i>D. carota</i>	95 pb
5' Qpsy2 3' Qpsy2	GTTCTTAGCTAATAAACTTCCGTGGG GCTGGAGTTAGTGCTACCC	74 60	psy 2 de <i>D. carota</i>	100 pb
5' Qccs 3' Qccs	GATTCCTCTGTGTCCATATCTCCC GATTGCCAGAAAGACTCAACAG	72 68	ccs de <i>D. carota</i>	70 pb
5' Qubi 3' Qubi	GCTCGAGGACGGCAGACC CTGGGCTTGGTGTAGGTCTTC	76 64	Ubiquitina de <i>D. carota</i>	110 pb

2.6. Embriogénesis somática y Transformación de *Daucus carota*.

2.6.1. Esterilización de semillas de *Daucus carota*.

Semillas de *D. carota* de la variedad Nantes se esterilizaron superficialmente con el fungicida Captan al 2% por 20 minutos. Se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente, se trataron con hipoclorito de sodio al 20% por 1 hr y se lavaron con agua destilada estéril. Luego, fueron secadas en papel absorbente estéril y depositadas en medio MS-agar. Se mantuvieron en fotoperiodo de 16 hrs luz por una

semana hasta su germinación, posteriormente se cultivaron bajo fotoperíodo de 16 horas luz.

2.6.2. Embriogénesis somática de hipocotilos y epicotilos de *Daucus carota*.

Para lograr obtener embriones somáticos de *D. carota*, se modificó la técnica descrita por Chen y Punja (2002) y Punja (2001). Se cortaron secciones de hipocotilos y epicotilos (raíz y tallo de planta joven, respectivamente) de plántulas de 10 días cultivadas *in vitro* (2.6.1) y se depositaron en placas con medio MS suplementado con 1mg/L de la auxina, 2,4 D (ácido 2,4-Dichlorophenoxyacético, fitohormona sintética) por 4 semanas en oscuridad. Posteriormente, los explantes fueron transferidos a medio MS con 0,5 mg/L de 2,4D por 4 semanas. Finalmente, se depositaron los embriones inmaduros en medio MS en ausencia de hormonas hasta su completa maduración. Las plántulas obtenidas fueron transferidas a tierra al alcanzar 5 cm de altura.

2.6.3. Transformación de hipocotilos y epicotilos de *D. carota* mediante *A. tumefaciens*.

Esta actividad se abordó basándose en el protocolo descrito por Chen y Punja (2002) y Punja (2001). La cepa GV3101 de *A. tumefaciens* transformada con los vectores pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S que poseen la construcción para el silenciamiento génico post-transcripcional de *lcyb* y la construcción de selección, realizados en el seminario de título de Lorena Pizarro (2007) se crecieron toda la noche con los antibióticos adecuados (rifampicina 10 µg/mL, gentamicina 50 µg/mL y kanamicina 50 mg/L). Además, como control del sistema se transformó utilizando el vector pBIN19 que solo posee la construcción de selección. Sin embargo, las líneas generadas no fueron utilizadas por problemas técnicos y por ello una de las líneas producidas por la transformación con el vector pBIN19/L-S se utilizó como control del sistema.

Luego, el medio de cultivo se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 30 ml de medio MS (MS 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 30%, pH = 5,8) estéril con 0,4 mM de acetosiringona. Se incubó con agitación por aproximadamente 3 horas, hasta alcanzar una D. O.= 0,6 a 600 nm. Luego, en ambiente estéril se depositó el cultivo en una placa Petri estéril y se co-incubó con secciones de hipocotilo de *D. carota* por 10 minutos. A las secciones de zanahoria se les hicieron pequeñas heridas para facilitar la infección del *A. tumefaciens*. Posteriormente, los explantes de zanahoria fueron secadas en papel absorbente estéril y puestas en medio MS-agar. Se mantuvo en oscuridad durante 48 horas. Luego, estos explantes fueron sometidos a embriogénesis somática (descrito en 2.6.2) agregando a los medios MS-Agar, 400mg/L carbenicilina para eliminar a *A. tumefaciens*, y 25mg/L de kanamicina como agente de selección. El segundo mes de cultivo se pasaron las placas a fotoperíodo, se aumentó la concentración de kanamicina a 50mg/L para seleccionar aquellos embriones generados de células transformadas y se disminuyó la concentración de hormona a 0,5 mg/L de 2,4D, medio en el que maduraron los embriones generando brotes. Al tercer mes los brotes fueron pasados a un tercer medio sin hormonas y con 100 mg/L de kanamicina donde las plántulas elongaron lo suficiente como para ser traspasadas posteriormente a tierra.

2.7. Determinación de la concentración de Carotenoides.

2.7.1. Extracción de Carotenoides.

Aproximadamente 200 mg de tejido fué molido en presencia de N₂ líquido. Se agregó 1ml de una solución de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v) y se maceró en mortero. El macerado se puso en un tubo Eppendorf, se agitó en vortex durante 2

minutos y se mantuvo en hielo y oscuridad por otros 2 minutos. Luego, fue centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los carotenoides fueron recuperados de la fase superior, recolectándolos en un tubo de ensayo. El proceso se repitió hasta que el precipitado quedase blanquecino, como indicativo de la extracción completa de carotenoides desde el tejido. Durante todo el proceso se mantuvo el macerado y la extracción en oscuridad y frío. Finalmente, la solución que contiene los carotenoides extraídos fue secada con N₂ gaseoso.

2.7.2. Cuantificación de los carotenoides totales mediante espectrofotometría.

La extracción de carotenoides secada en N₂ gaseoso fue resuspendida en 2mL de éter de petróleo. Luego, se midió la concentración total de carotenoides de esta solución en un espectrofotómetro (Shimadzu) a 474 nm. El resto de la extracción fue secada con N₂ gaseoso y analizada posteriormente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa. La ecuación utilizada para la determinación de la concentración de carotenoides es la siguiente:

$$\text{Carotenoides Totales} = \frac{\text{Volumen Resuspension} \times \text{Densidad Optica} \times 100}{21 \times \text{gramos Peso Seco}}$$

La transformación de peso fresco a peso seco se realizó multiplicando el peso fresco de la muestra por un factor de conversión. Este factor de conversión se determinó mediante la diferencia de peso de 3 gramos de tejido, hoja y raíz modificada y el peso obtenido de estas muestras al secarlas durante 48 horas a 60°C, tiempo suficiente para deshidratar estos tejidos. Obteniendo los siguientes factores de conversión: para raíz modificada: 0.098 g peso seco/g peso fresco; hojas 0,285 g peso seco/g peso fresco.

2.7.3. Cuantificación de carotenoides mediante espectrofotometría y HPLC.

La extracción de carotenoides se resuspendió en un volumen conocido de acetona y 20 µL de esta solución se utilizaron para el análisis mediante HPLC en fase reversa, el cual fue realizado en una columna Hipersy C18 de fase reversa de 15 cm (Merck). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo de 1 ml/min. Mediante el análisis de los cromatogramas detectados a 474 nm (tiempo de retención) y los espectros de absorción obtenidos, se determinaron los carotenoides presentes de manera preponderante en las muestras (β -caroteno, α -caroteno y luteína). El área correspondiente a los picos de interés se correlacionó con la concentración de los carotenoides totales (2.8.2.). La concentración de fitoeno se determinó de acuerdo a datos generados en la Tesis Doctoral de Aniela Wozniak (Wozniak, 2008).

2.8. RT-PCR en tiempo real.

Para este procedimiento se utilizó como molde 2 µL de cDNA de zanahoria obtenido como se indicó en 2.4.2. y partidores específicos para la región 5' o 3' no traducible de los genes *lcyb*, *psy1*, *psy2*, *ccs* y ubiquitina de *D. carota* (Tabla 1). La reacción de RT-PCR en tiempo real fue realizada en un volumen total de 25 µL que contienen 140 nM de cada partidador, 12,5 µL Brilliant SYBR® Green® QPCR Master Mix (Stratagene) y $7,5 \times 10^{-2}$ µM de ROX como tinción de referencia. El programa de amplificación comenzó con 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos compuesto de 30 segundos a 95 °C para denaturar el DNA, una temperatura de unión de 52 °C durante 30 segundos y finalmente 30 segundos a 72 °C para la elongación del producto de PCR. Además, el programa contó con un ciclo final con 1 minuto a 95 °C en la etapa de denaturación, mientras que la etapa de unión y elongación se mantuvieron durante los

tiempos y temperaturas señaladas. El cDNA utilizado fue previamente probado mediante amplificación por PCR del fragmento del gen 18S como se indicó en 2.6.

La cuantificación de los fragmentos amplificados se realizó utilizando los datos de Ct (Cycle threshold) generados por el programa LightCycler Analysis Software. El valor Ct es definido como el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia de la muestra sobrepase el nivel umbral dado por la tinción de referencia y el ruido de la muestra. Luego, la determinación de los niveles de transcrito fue determinada basándonos en los valores de Ct del gen blanco y del gen ubiquitina que fue utilizado como calibrador. Con estos datos y utilizando el método de comparación de Ct (revisado en Schefe y col, 2006) se obtuvo el valor de los niveles de transcrito relativo a la abundancia del transcrito de ubiquitina, lo cual fue graficado.

RESULTADOS

1. Transformación de *Daucus carota* mediante *A. tumefaciens* con las construcciones para silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb*.

Para generar el silenciamiento del gen *lcyb* de *D. carota*, transformamos *D. carota* con los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S (Figura 3) mediante *A. tumefaciens*. Estos vectores binarios fueron diseñados y construidos en el seminario de título de Lorena Pizarro (2007) y forma parte del trabajo adelantado de esta tesis. El sistema de transformación de *A. tumefaciens* utilizando vectores binarios, permite insertar en el genoma vegetal la región del vector binario flanqueada por los bordes RB y LB que en este caso corresponde a la construcción para el silenciamiento de *lcyb* de *D. carota* y la construcción de selección de la transformación (Figura 3).

Los vectores pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S difieren entre sí, sólo por el diseño de la construcción para el silenciamiento. El vector pBIN19/L-AS posee la **construcción de silenciamiento antisentido** (Figura 3), que expresa de manera constitutiva un fragmento de 494 pb de la región codificante del gen *lcyb* de *D. carota* en orientación antisentido respecto al promotor doble 35S (35Sd) del virus del mosaico del coliflor (35SCaMV). El promotor 35SCaMV es un promotor constitutivo y fuerte de expresión en plantas ampliamente utilizado para sobre expresar un gen de interés en todo el organismo vegetal. El promotor 35Sd posee dos repeticiones de la unión de factores de transcripción lo que induce una mayor tasa de transcripción del transgen en varios modelos vegetales, entre ellos en *D. carota* (Kay y col, 1987; Wally y col, 2008).

El vector pBIN19/L-ASD fue obtenido por azar producto de una doble ligación del fragmento 35Sd-AS y por lo tanto porta la **construcción doble de silenciamiento antisentido** (Figura 3). Este vector fue utilizado en este trabajo ya que al poseer dos construcciones antisentido esperábamos mayor eficiencia en la inducción de silenciamiento que el pBIN19/L-AS. Por lo tanto, si el vector pBIN19/L-AS no generaba suficiente silenciamiento el vector pBIN19/L-ASD si lo induciría. Este sistema antisentido para generar SGPT (Figura 2) permite que el fragmento antisentido del gen *lcyb*, presente en la construcción de silenciamiento, hibride con el transcrito endógeno de este gen (sentido), gatillando la maquinaria de silenciamiento génico post-transcripcional sobre el gen *lcyb* (Susi y col, 2004; Vaucheret y col, 2001; figura 2).

El otro vector utilizado en esta tesis fue el vector binario **pBIN19/L-S** el cual tiene la construcción de silenciamiento sentido que consta del promotor 35Sd dirigiendo la expresión en sentido del fragmento de 494pb de la región codificante gen *lcyb* de *D. carota* (la misma secuencia utilizada para los vectores **pBIN19/L-AS** y **pBIN19/L-ASD**). Este vector fue diseñado para inducir silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb* por el mecanismo de co-supresión (Figura 2 alternativa 2). Sin embargo, dado que el mecanismo de inducción de silenciamiento de este vector necesita sobrepasar el nivel umbral de mensajero sentido (Susi y col, 2004; Vaucheret y col, 2001) en una línea transgénica (S5) no se generó silenciamiento y fue utilizada como control del sistema.

Luego de la transformación de los explantes de *D. carota* (con los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S) mediante *A. tumefaciens* (métodos 2.6.), éstos fueron sometidos a embriogénesis somática (figura 4A-D). Para ésto, los explantes transformados fueron mantenidos durante un mes en medio de inducción de tejido pre-embriogénico (MS-agar 2,4 D 1 mg/L), en presencia del agente

de selección (Kan 25 mg/L, Figura 3A). Aproximadamente, el 80% de estos explantes indujo tejido pre-embriogénico, mientras que en el control positivo que no fue sometido a transformación con *Agrobacterium* y cultivado en medio sin agente de selección, el 100% de los explantes indujo tejido pre-embriogénico. Por otro lado, un segundo control consistente en explantes de *D. carota* sin transformar y puestos en medio de inducción con kanamicina (25 mg/L), no indujeron embriogenesis, sufriendo necrosis después de un mes por su sensibilidad al agente de selección (Figura 3C-D).

Los explantes transformados que indujeron tejido pre-embriogénico, fueron transferidos luego de 1 mes a un segundo medio con la mitad de concentración de la hormona 2,4D y el doble de kanamicina como agente de selección (MS- agar, 0,5 mg/L de 2,4 D, 50 mg/L, Kan, Figura 4E). En este medio los explantes fueron sometidos a una presión de selección más fuerte, y solo en un 30% de los explantes iniciales generaron tejido pre-embriogénico. El tejido pre-embriogénico maduró a brotes (en el control sin agente de selección un 90% de los explantes con tejido pre-embriogénico maduró). Finalmente, estos brotes fueron transferidos a medio MS-agar sin hormonas con kanamicina 100 mg/L, donde termina el proceso de selección y embriogenesis (Figura 4F). Luego, las plantas de zanahoria resistentes a kanamicina fueron transferidas a tierra, donde completaron su desarrollo a plantas adultas (Figura 4G). Estos resultados nos muestran que la transformación de *D. carota* es muy eficiente logrando la inducción de embriones en presencia del agente de selección en un 28% de los explantes inicialmente utilizados para la transformación. Por lo tanto, las plantas regeneradas a través de nuestro protocolo de transformación y embriogenesis son plantas transformantes que presentan resistencia a kanamicina (Figura 4).

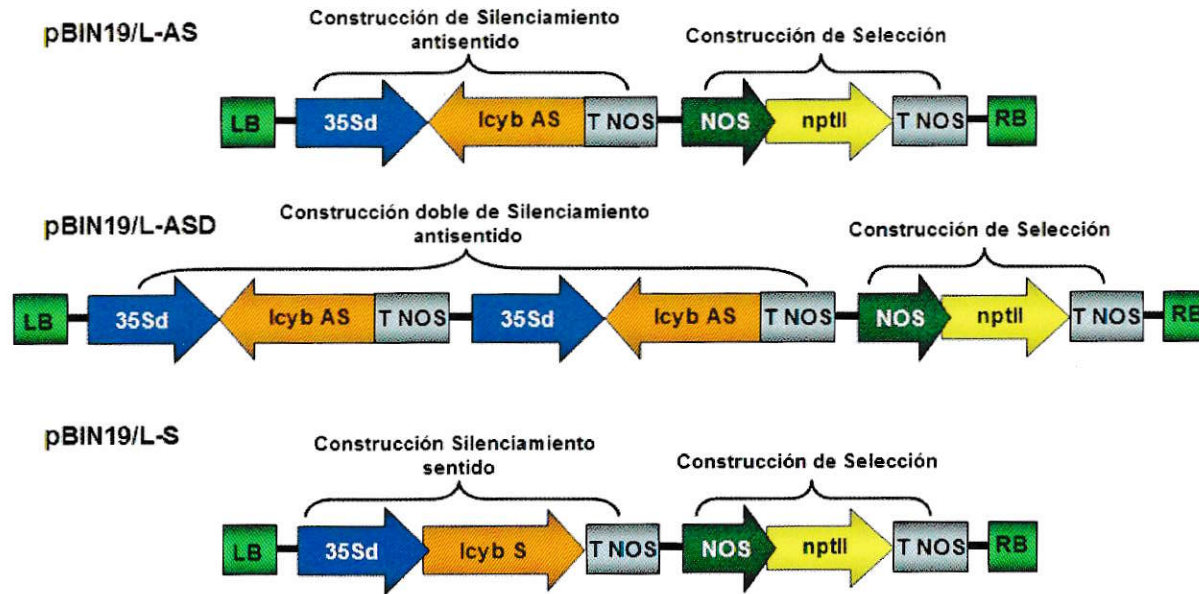


Figura 3. Esquema de los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S.

pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S son vectores binarios diseñados para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *Icyb* de *D. carota*. Están compuestos por una construcción para el silenciamiento del gen *Icyb* de *D. carota*, y una construcción de selección. La **construcción de selección** está presente en los tres vectores, consta del gen de neomicina fosfotransferasa (*nptII*), que confiere resistencia a kanamicina, cuya expresión está dirigida por el promotor (NOS) y el terminador (TNOS) del gen nopalina sintasa de *A. tumefaciens*. El vector binario **pBIN19/L-AS** para el silenciamiento del gen *Icyb* de *D. carota* tiene la **construcción de silenciamiento antisentido** compuesta por el doble 35SCaMV (35Sd) que esta dirigiendo la expresión de un fragmento del gen *Icyb* de *D. carota* en orientación antisentido y el terminador TNOS. El vector binario **pBIN19/L-ASD** posee una **construcción doble de silenciamiento antisentido** que consta de dos **construcciones de silenciamiento antisentido**. Por último, el vector pBIN19/L-S porta la **construcción de silenciamiento sentido**, la cual esta compuesta por el promotor 35Sd dirigiendo la expresión del fragmento del gen *Icyb* de *D. carota* en orientación sentido y el terminador TNOS. Además, los vectores tienen las secuencias llamadas borde izquierdo y borde derecho (LB y RB, respectivamente) que corresponde a los repetidos invertidos que dirigen y delimitan la inserción en el genoma vegetal mediante la transformación con *A. tumefaciens*.

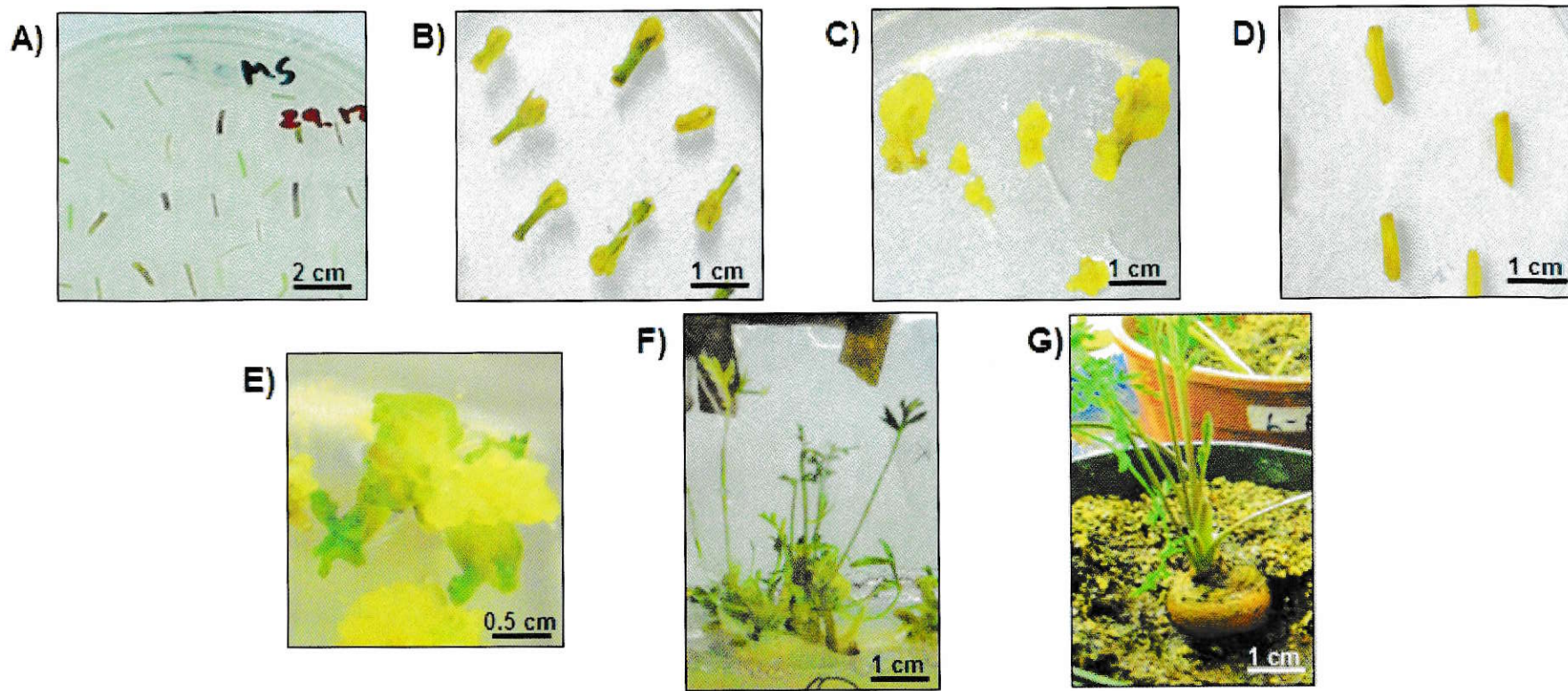


Figura 4. Embriogénesis somática de la transformación de *D. carota* con los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S.

En la figura observamos explantes luego de transformación con *A. tumefaciens* (A, Día 0) puestos en medio de inducción de embriones en presencia de hormona 2,4 D 1 mg/L y del agente de selección Kan 25 mg/L. Luego de un mes se genera tejido pre-embriogénico (B, semana 4-6), a partir de los explantes iniciales, los que son pasados a medio con 0,5 mg/L de 2,4 D, 50 mg/L Kanamicina donde se desarrollan pequeñas plántulas (E, semana 8-10). Luego, estas plántulas son pasadas a medio MS con 100 mg/L de kanamicina para su desarrollo (F, semana 12-14), para ser finalmente pasadas a tierra, donde terminan su desarrollo a planta de zanahoria adulta generando las hojas y raíz modificada característica de este estado (G, semana 20-22). En C y D se muestra el control positivo y negativo de la embriogénesis, respectivamente.

Producto de la transformación con los vectores binarios pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S y posterior embriogenesis somática, generamos en promedio 50 líneas transformantes de *D. carota* resistentes a kanamicina, para cada uno de los tres vectores utilizados. Estas líneas transformantes las hemos llamado **AS**, **ASD** y **S**, dependiendo del vector con el cual fueron transformadas, pBIN19/L-AS, pBIN19/L-ASD y pBIN19/L-S, respectivamente. Posteriormente, estas líneas fueron analizadas mediante PCR y RT-PCR para determinar su transgénesis, es decir, si poseen o no las construcciones del marcador de selección y para silenciamiento del gen *lcyb* de *D. carota* y luego se determinó el nivel de silenciamiento de estas líneas, mediante RT-PCR semicuantitativo en tiempo real.

2. Análisis molecular de las líneas transformantes de *D. carota* resistentes a kanamicina.

2.1. Análisis de la transgénesis de las líneas de *D. carota* transformantes resistentes a kanamicina mediante PCR y RT-PCR.

Para comenzar el análisis de las líneas transformantes resistentes a kanamicina, se extrajo DNA genómico de 17 de las líneas AS de *D. carota* transformantes y resistentes a kanamicina (Métodos 2.1). Utilizando este DNA se amplificó mediante PCR, usando partidores específicos, un fragmento del gen ribosómico 18S y un fragmento del gen *nptII* (Métodos 2.5.). La amplificación del fragmento del gen endógeno 18S permite determinar la integridad del DNA de las líneas analizadas (Figura 5). En este caso de las 17 líneas analizadas, 15 de ellas amplificaron el fragmento del gen 18S, reduciendo el n muestral de este análisis a 15. Por otro lado, la amplificación del fragmento del gen *nptII*, que confiere resistencia a kanamicina, fue positiva en 12 líneas AS transformantes mientras que en la planta silvestre no se observa el amplificado del gen *nptII* (Figura 5). Esto

muestra que estas 12 líneas transformantes, fueron efectivamente transformadas y tienen la construcción de selección insertada en el genoma. Esto sugiere que estas 12 líneas transformantes también poseen la construcción de silenciamiento antisentido del gen *lcyb* de *D. carota*. Este mismo análisis fue realizado a 4 de las líneas transformantes ASD resistentes a kanamicina (Figura 6). Obteniendo que las 4 líneas ASD analizadas fueron efectivamente transformadas con el vector pBIN19/L-ASD mediante *A. tumefaciens*. Por lo tanto, este ensayo indica que estas plantas transformadas tienen insertado en su genoma la construcción del marcador de selección y por ende la **construcción doble de silenciamiento antisentido**, obteniendo un 100% en la eficiencia de transformación con este vector binario. De manera análoga se analizaron 7 líneas pBIN19/L-S transformantes (Figura 6), resistentes a kanamicina. De las líneas analizadas, 5 presentaron amplificación del gen *nptII*, lo que indica que poseen en su genoma la construcción de selección y por ende la **construcción de silenciamiento sentido** (71% eficiencia de transformación). Por lo tanto, mediante este análisis de PCR confirmamos 12 líneas de *D. carota* transformadas con el vector pBIN19/L-AS, 4 líneas transformadas con el vector pBIN19/L-ASD y 5 líneas transformadas con el vector pBIN19/L-S, determinando su transgénesis.

La presencia de las construcciones de silenciamiento y de selección en el genoma vegetal, no implica necesariamente la expresión de estas construcciones aunque la resistencia a kanamicina es un claro indicio de ello. Por lo tanto, para verificar la funcionalidad de estas construcciones determinamos mediante RT-PCR la expresión del gen *nptII* (Métodos 2.5.). Para este análisis se seleccionaron 3 de las líneas **AS** transformadas (AS23, AS37 y AS48), 4 líneas ASD transformadas (ASD1, ASD2, ASD3, ASD4) y las 4 líneas S transformadas (S1, S3, S5, S6) analizadas previamente. La elección de las líneas se realizó en base a la robustez y fuerza que presentaban las plantas, de manera tal de contar con el tejido necesario

para todos los estudios que fueron realizados en esta tesis. Luego, realizamos una extracción de RNA de estas líneas (Métodos 2.2), seguido por la transcripción reversa (Métodos 2.4.1; 2.4.2) y la amplificación por PCR de un fragmento del gen *nptII* (Método 2.5.). Este análisis se realizó por triplicado para cada una de las líneas analizadas, obteniendo siempre los mismos resultados. De esta forma determinamos que las líneas **AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD3, ASD4, S1, S3, S5 y S6**, que poseen en su genoma la construcción de selección, expresan el gen *nptII* que les confiere resistencia a kanamicina (Figura 7A, B, C) y que solo en la línea **S7** no se detectó la expresión este gen a pesar de tener la construcción de selección y de haber sido seleccionada a kanamicina (Figura 7C).

Basándonos en el hecho que la construcción del marcador de selección *nptII* y la construcción para el silenciamiento de gen *lcyb* de *D. carota* son insertadas juntas en un mismo lugar del genoma de la planta, luego de la transformación mediante *A. tumefaciens*, y que la funcionalidad de estas construcciones depende en gran medida de la posición en que fueron insertadas en el genoma, se tomó como referencia que la funcionalidad de la construcción del marcador de selección en las líneas **AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD3, ASD4, S1, S3, S5 y S6**, se correlaciona con la funcionalidad de la construcción para el silenciamiento génico post-transcripcional de *lcyb* de *D. carota*. Es por ello que se esperó que en estas líneas transformadas, el fragmento antisentido y sentido de *lcyb* fuese transcrito y capaz de inducir el silenciamiento génico post-transcripcional en las plantas de zanahoria transformadas. Para determinar el silenciamiento del gen *lcyb* realizamos análisis de RT-PCR semi-cuantitativo y en tiempo real a algunas de estas líneas.

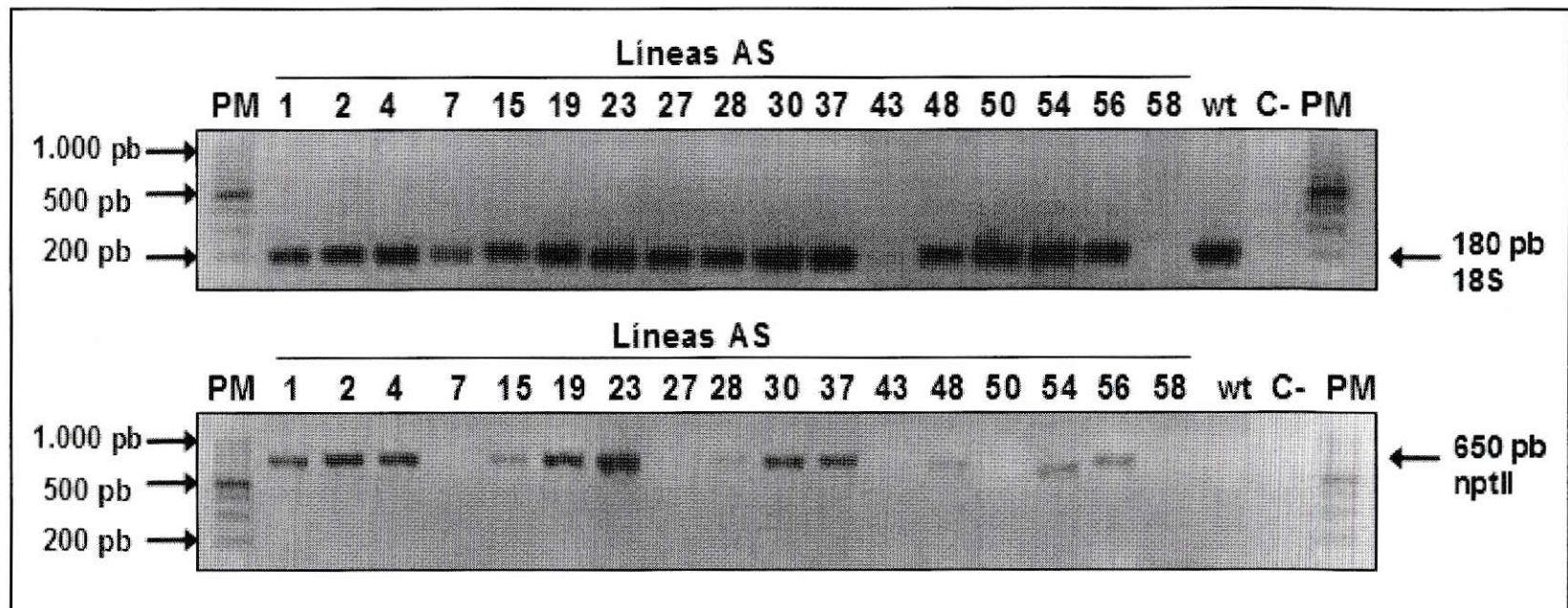


Figura 5. Análisis molecular de la presencia del gen nptII en líneas transformantes AS de *D. carota*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto de PCR obtenido de la amplificación de un fragmento de 180 pb del gen 18S (superior) y de un fragmento de 650 pb del gen nptII (inferior) utilizando como molde DNA genómico de 17 líneas **AS** transformantes y resistentes a kanamicina. De éstas, 15 presentaron el amplificado del fragmento del gen 18S y 12 amplificaron el fragmento del gen nptII. **Wt:** *D. carota* silvestre, **C-:** control negativo de la reacción realizada sin DNA. **PM;** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

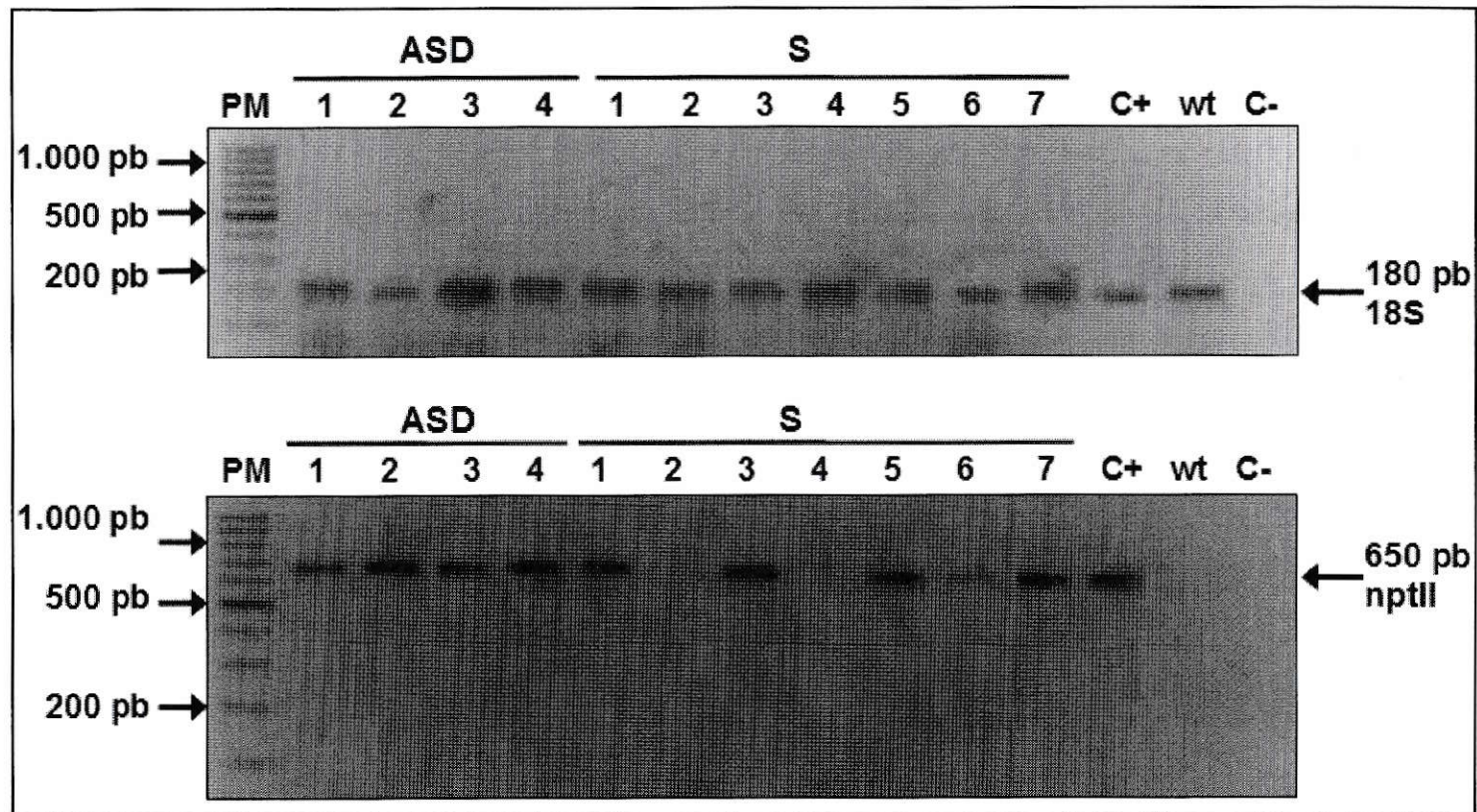


Figura 6. Análisis molecular de la presencia del gen nptII en líneas transformantes ASD y S de *D. carota*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto de PCR obtenido de la amplificación de un fragmento de 180 pb del gen 18S (superior) y de un fragmento de 650 pb del gen nptII (inferior) utilizando como molde DNA genómico de 4 líneas **ASD** y 7 líneas **S** de *D. carota* transformantes y resistentes a kanamicina. Wt: *D. carota* silvestre C-, control negativo de la reacción realizada sin DNA. **PM**, marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

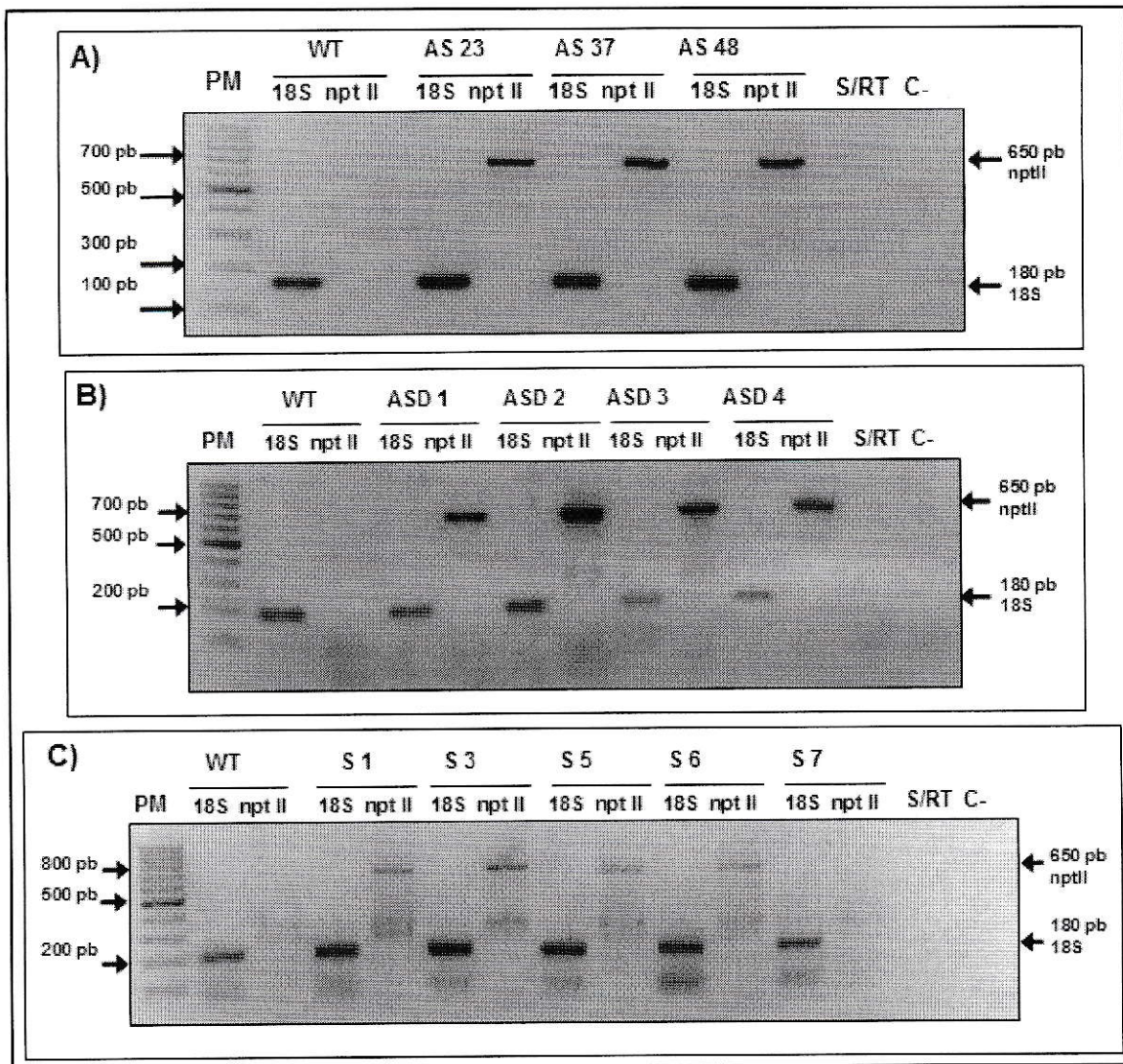


Figura 7. Análisis de expresión del gen nptII en líneas AS, ASD y S mediante RT-PCR.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto de RT-PCR del gen nptII, realizado a las líneas de *D. carota* transformadas. **A:** Líneas **AS23, AS37 y AS48**. **B:** **ASD1, ASD2, ASD3 y ASD4** y **C:** **S1, S3, S5, S6 y S7**. La amplificación de un fragmento de un fragmento de un fragmento de 650 pb, muestra la expresión del gen nptII. Como control de la calidad del cDNA se realizó un RT-PCR con partidores específicos para el gen 18S (180 pb). **WT:** plantas de *D. carota* silvestre, **S/RT:** Control de RTPCR en el que se utilizó RNA como molde para el PCR. **C-**, Control negativo de la reacción realizada sin DNA. **PM;** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

2.2. Determinación del nivel de silenciamiento del gen *Icyb* en las líneas transformadas de *D. carota* mediante RT-PCR semicuantitativo y en tiempo real.

Para determinar si existe silenciamiento del gen *Icyb* en las líneas **AS23**, **AS37** y **AS48** transformadas con el vector binario pBIN19/L-AS, las líneas **ASD1**, **ASD2** y **ASD4** transformadas con el vector binario pBIN19/L-ASD y las líneas **S1**, **S5** y **S6**, realizamos un RT-PCR semi-cuantitativo (Métodos 2.4.) del gen *Icyb* en plantas silvestres y transformadas en relación a la expresión del gen ribosómico 18S, cuya expresión es constitutiva. Para la amplificación del transcrito del gen *Icyb* se utilizaron partidores específicos que no hibridan con el fragmento de *Icyb* presente en los vectores de silenciamiento. De esta forma aseguramos que el transcrito que detectamos mediante el RT-PCR corresponde al mensajero endógeno y no a la expresión del fragmento del gen *Icyb* que se encuentra en las construcciones para el silenciamiento de este gen.

El RT-PCR semicuantitativo se realizó en tejido fotosintético (considerado en las figuras como hojas) y en raíz modificada (considerada en las figuras como raíz) de 3 líneas AS (AS23, AS37 y AS 48), 3 líneas ASD (ASD1, ASD2 y ASD3) y 3 líneas S (S1, S5, S6). Las líneas seleccionadas para este análisis se determinaron de acuerdo a los parámetros de robustez y fuerza que presentaron las plantas y que fue mencionado anteriormente. Este experimento se realizó en triplicado utilizando 3 extracciones de RNA de cada línea. Además, se realizó una replica técnica del PCR del gen *Icyb* obteniendo resultados consistentes.

Los resultados de la Figura 8 muestran que en las líneas AS37 y AS48 no se pudo detectar el transcrito del gen *Icyb*, tanto en tejido fotosintético como en raíz modificada. La línea AS23 presentó silenciamiento completo de *Icyb* en hoja, mientras que en raíz modificada se detectó la presencia del transcrito de *Icyb*, aunque esta expresión es menor que la detectada en raíz de plantas silvestre (wt).

lo cual se puede concluir luego de analizar la expresión del gen *lcyb* respecto a la expresión del gen ribosómico 18S en ambas plantas. De esta forma determinamos que las líneas AS37 y AS48, que poseen la construcción de silenciamiento antisentido, presentan silenciado el gen *lcyb* en su tejido fotosintético y raíces modificada. Por otro lado, la línea AS23 presenta silenciado *lcyb* en el tejido fotosintético, mientras que la disminución en la expresión en la raíz modificada es algo menor ya que se observa la banda de amplificación para *lcyb*. Para definir el grado de silenciamiento en esta línea, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real (descrito mas adelante).

En las líneas ASD1, ASD2 y ASD4 que tienen en su genoma la construcción doble de silenciamiento antisentido, se observó que presentan silenciado el gen *lcyb* en su raíz modificada (Figura 9B). En tejido fotosintético, las líneas ASD1 y ASD2 también tienen silenciado el gen *lcyb*, pero la línea ASD4 presenta un nivel de silenciamiento menor (Figura 9A), ya que se pudo detectar expresión del gen *lcyb*, aunque la expresión es menor que en las plantas silvestres (Figura 9A). Por lo tanto, con estos resultados podemos afirmar que ambas construcciones (AS y ASD) para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb* de *D. carota*, pudieron inducir de manera eficiente el silenciamiento de *lcyb* al sobreexpresar un fragmento en antisentido del gen.

Por último, en el análisis de RT-PCR semi-cuantitativo de las líneas S1, S5, y S6 se logró detectar el transcrito del gen *lcyb* en niveles similares a los presentados por plantas de zanahoria silvestre tanto en tejido fotosintético como en la raíz modificada de estas líneas (Figura 10). Este resultado indica que mediante esta técnica los niveles de transcrito del gen *lcyb* de *D. carota* no se alteraron en estas líneas, que tienen la construcción de silenciamiento en sentido. Por lo tanto, mediante este análisis podemos decir que la construcción de silenciamiento sentido no es tan efectiva para generar silenciamiento génico post-transcripcional de *lcyb*.

Sin embargo, para corroborar estos resultados se realizó un análisis de RT-PCR en tiempo real a estas líneas.

El nivel de transcrito de las 9 líneas transformadas y de plantas silvestres de *D. carota*, también fue analizada mediante RT-PCR en tiempo real, técnica de mayor sensibilidad, de esta forma corroborar los resultados obtenidos a través del RT-PCR semi-cuantitativo. Para este análisis se utilizaron 2 cDNA distintos para cada línea, obtenidos de acuerdo a lo detallado en los Métodos (2.4.1., 2.4.2.). Este cDNA fue utilizado para realizar el PCR en tiempo real en duplicado (réplica técnica) (Métodos 2.8.). Los resultados de este análisis muestran que efectivamente las líneas AS23, AS37 y AS48 presentaron una muy baja expresión, por lo tanto, presentaron silenciamiento, tanto en hojas como en raíz modificada (Figura 11). De manera similar, en las líneas ASD1, ASD2, y ASD4 también se corroboró el silenciamiento, dada la baja expresión de *lcyb* que se muestra en hojas, mientras que en raíz la expresión bajo las condiciones realizadas no fue detectada, sugiriendo junto con los resultados obtenidos por el RT-PCR semi-cuantitativo, que *lcyb* está efectivamente silenciado en la raíz de estas líneas (Figura 11). Análisis estadístico indica que tejido fotosintético de todas la plantas transgénicas salvo la línea S5, presentan diferencia significativa del nivel de transcrito de *lcyb* respecto a la planta silvestre. Por otro lado, en raíz modificada las líneas S no presentan diferencia significativa en la expresión de *lcyb* respecto a la planta silvestre. Al analizar en detalle la expresión del gen *lcyb* entre las líneas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, y ASD4 en tejido fotosintético y en raíz modificada, se determinó que no existe diferencia significativa entre las líneas AS. La expresión de *lcyb* en las líneas ASD indica un nivel de expresión muy bajo que no fue detectado en este análisis, bajo las condiciones utilizadas. La expresión relativa del gen *lcyb* en la raíz de líneas S1, S5, y S6 no presentan diferencias significativa respecto a la planta de zanahoria silvestre (Figura 11), por lo tanto esto corrobora la información

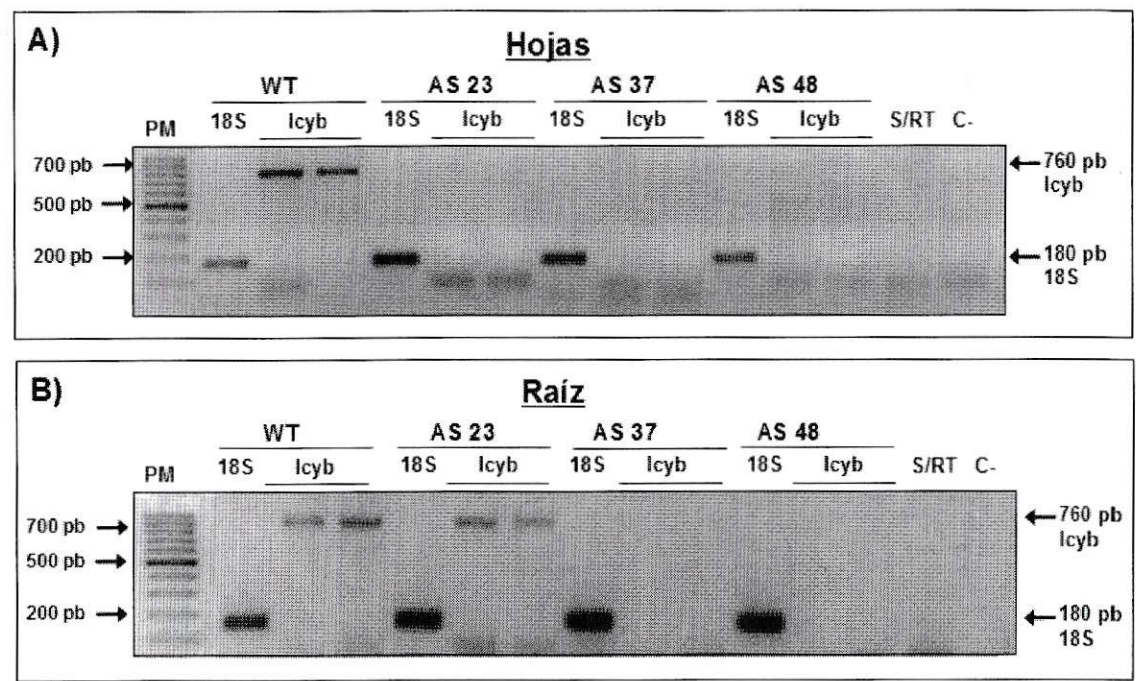


Figura 8. Análisis de la expresión del gen *lcyb* en tejido fotosintético (Hojas) y raíz modificada (Raíz) en las líneas transformadas AS23, AS37 y AS48 de *D. carota*

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto de RT-PCR semi-cuantitativo del gen *lcyb* (en duplicado) y 18S. El fragmento amplificado del gen *lcyb* corresponde a una banda de 760 pb, mientras que la banda de 180 pb corresponde a la amplificación del fragmento del gen 18S. A: Expresión semi-cuantitativa del gen *lcyb* en tejido fotosintético (hojas y tallos) las líneas **AS23**, **AS37**, **AS48** y de una planta silvestre (**wt**). B: Expresión semi-cuantitativa del gen *lcyb* en raíz modificada de las líneas **AS23**, **AS37**, **AS48** y de una planta silvestre (**wt**). **S/RT**: Control de la reacción de RT-PCR, en el que se usó RNA como molde para el PCR con partidores para *lcyb* y 18S. **C-**, Control negativo de la reacción realizada sin DNA utilizando ambos pares de partidores. **PM**; marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

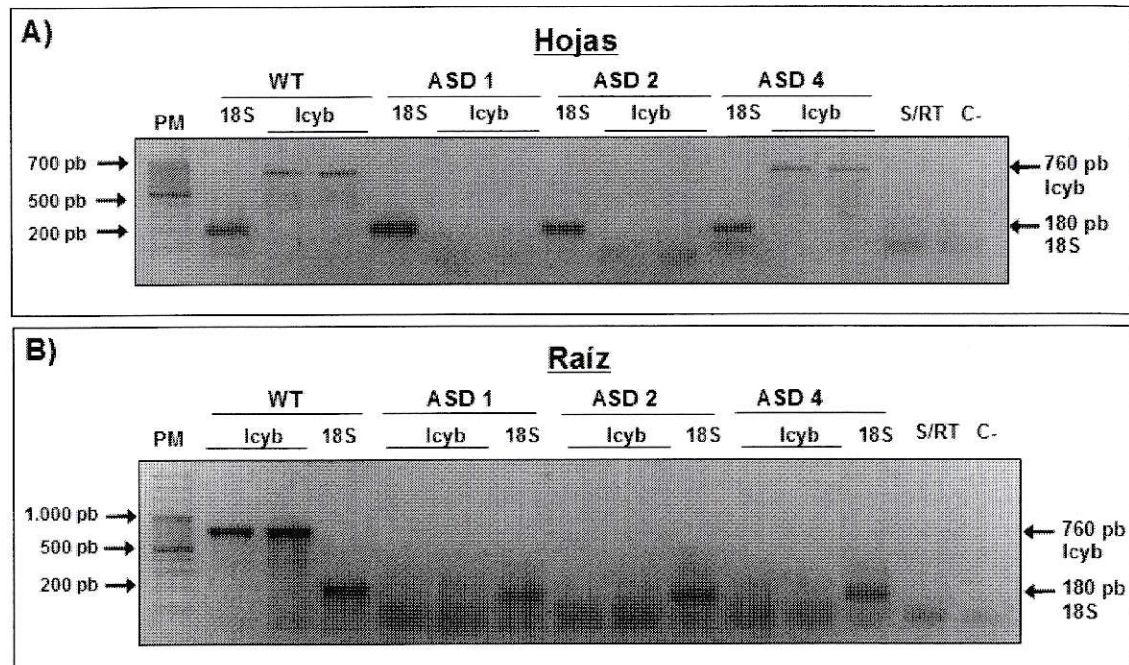


Figura 9. Análisis de expresión del gen lcyb en tejido fotosintético (Hojas) y raíz modificada (Raíz) de las líneas transformadas ASD1, ASD2 y ASD4 de *D. carota*

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto de RT-PCR semi-cuantitativo del gen lcyb (en duplicado) y 18S. El fragmento amplificado del gen lcyb corresponde a una banda de 760 pb, mientras que la banda de 180 pb corresponde a la amplificación del fragmento del gen 18S. **A:** Expresión semi-cuantitativa del gen lcyb en tejido fotosintético (hojas y tallos) de las líneas **ASD1, ASD2, ASD4** y de una planta silvestre (**wt**). **B:** Expresión semi-cuantitativa del gen lcyb en raíz modificada de las líneas **ASD1, ASD2, ASD4** y de una planta silvestre (**wt**). **S/RT:** Control en el que se usó RNA como molde para el PCR, utilizando ambos pares de partidores (lcyb y 18S). **C-**, Control negativo de la reacción realizada sin DNA utilizando ambos pares de partidores (lcyb y 18S). **PM;** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

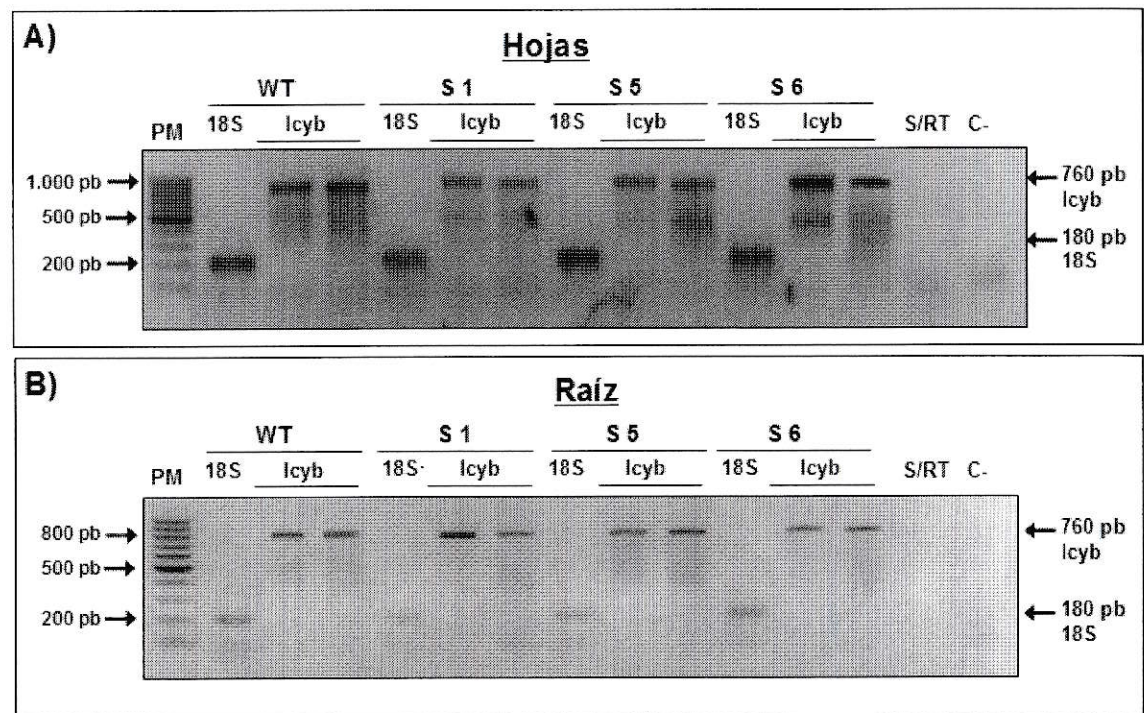


Figura 10. Análisis de expresión del gen *lcyb* en tejido fotosintético (Hojas) y raíz modificada (Raíz) de las líneas transformadas S1, S5 y S6 de *D. carota*.

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del producto de RT-PCR semi-cuantitativo del gen *lcyb* (en duplicado) y 18S. El fragmento amplificado del gen *lcyb* corresponde a una banda de 760 pb, mientras que la banda de 180 pb corresponde a la amplificación del fragmento del gen 18S. **A:** Expresión semi-cuantitativa del gen *lcyb* en tejido fotosintético (hojas y tallos) de las líneas **S1, S5, S6** y de una planta silvestre (**wt**). **B** Expresión semi-cuantitativa del gen *lcyb* en raíz modificada de las líneas **S1, S5, S6** y de una planta silvestre (**wt**). **S/RT:** Control en el que se usó RNA como molde para el PCR, utilizando ambos pares de partidores (*lcyb* y 18S). **C-:** Control negativo de la reacción realizada sin DNA utilizando ambos pares de partidores (*lcyb* y 18S). **PM:** marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas).

determinada en raíz mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Sin embargo, en tejido fotosintético las líneas S1 y S6 muestran menor expresión de *Icyb*, es decir, presentan cierto grado de silenciamiento de acuerdo a este análisis, que no fue detectado mediante RT-PCR semi-cuantitativo evidenciando la menor sensibilidad de esta técnica. Este efecto no se observa en la línea S5 que no presenta diferencia significativa en su nivel de expresión en tejido fotosintético ni en raíz modificada. Esto convirtió a la línea S5 en un buen candidato para ser utilizado como parámetro control para ser comparada con las líneas silenciadas.

Entonces, a través de ambos análisis de expresión hemos determinado que dado el bajo nivel o no detección del transcrito de *Icyb*, mediante RT-PCR en tiempo real y semi-cuantitativo, respectivamente, las líneas AS37, AS48, ASD1 y ASD2 tienen silenciado el gen *Icyb*. Luego, para evaluar la función de *Icyb* en zanahoria correlacionaremos estos resultados de nivel de silenciamiento con el efecto en la síntesis de carotenoides tanto en tejido fotosintético como en raíz modificada, en especial en las líneas que consideramos silenciadas (AS37, AS 48, ASD1 y ASD2). Por ello, a continuación se muestran las cuantificaciones de los niveles de carotenoides que fueron realizadas.

3. Evaluación de la función del gen *Icyb* de *D. carota* mediante análisis de las líneas transformadas.

3.1. Análisis de la composición de carotenoides en las líneas transformadas de *D. carota* mediante espectrofotometría y Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa..

Para realizar la cuantificación de carotenoides se extrajeron carotenoides (Métodos 2.7.1) de cada una de las líneas analizadas, por triplicado. A estas extracciones se le determinó la concentración de carotenoides totales mediante

espectrofotometría a 474 nm, donde absorben los carotenoides (Métodos 2.7.2). Luego, mediante HPLC se determinó la composición de carotenoides existente en la muestra de tejido fotosintético y raíz modificada de las líneas transformadas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6 y en plantas silvestres (wt) (Métodos 2.7).

En plantas silvestres la composición de carotenoides se caracteriza porque los principales pigmentos detectados en tejido fotosintético son β -caroteno, luteína y α -caroteno, mientras que en raíz modificada son β -caroteno y α -caroteno. Esta distribución de los pigmentos en tejido fotosintético y raíz modificada se mantuvo en todas las líneas transformadas que fueron analizadas. Sin embargo, la concentración de estos carotenoides en las líneas que tienen silenciado el gen *lcyb*, AS37, AS48, ASD1 y ASD2 disminuyen de manera significativa. Esta característica es más evidente en los niveles de carotenoides totales y β -caroteno tanto en tejido fotosintético como en la raíz modificada (Figura 12). Este mismo comportamiento se presenta en hojas de la línea ASD4 que también tiene una baja expresión del gen *lcyb*. Esta disminución en la concentración de β -caroteno en las plantas que tienen *lcyb* silenciado indica que el gen *lcyb* es necesario para la síntesis de β -caroteno tanto en tejido fotosintético, como en la raíz modificada. Adicionalmente, en tejido fotosintético de las líneas silenciadas se observa una disminución significativa de luteína debido a que el gen de *lcyb*, que codifica para la enzima LCYB participa en la síntesis de α -caroteno, precursor de luteína (Figura 1), el cual también disminuye en estas líneas transformadas (Figura 12, Figura 13) aunque de una manera no significativa. Del mismo modo, en la raíz de estas plantas el α -caroteno también disminuye de manera no significativa respecto a la planta silvestre. Estos resultados indican que efectivamente el gen *lcyb* endógeno en estudio es requerido para la

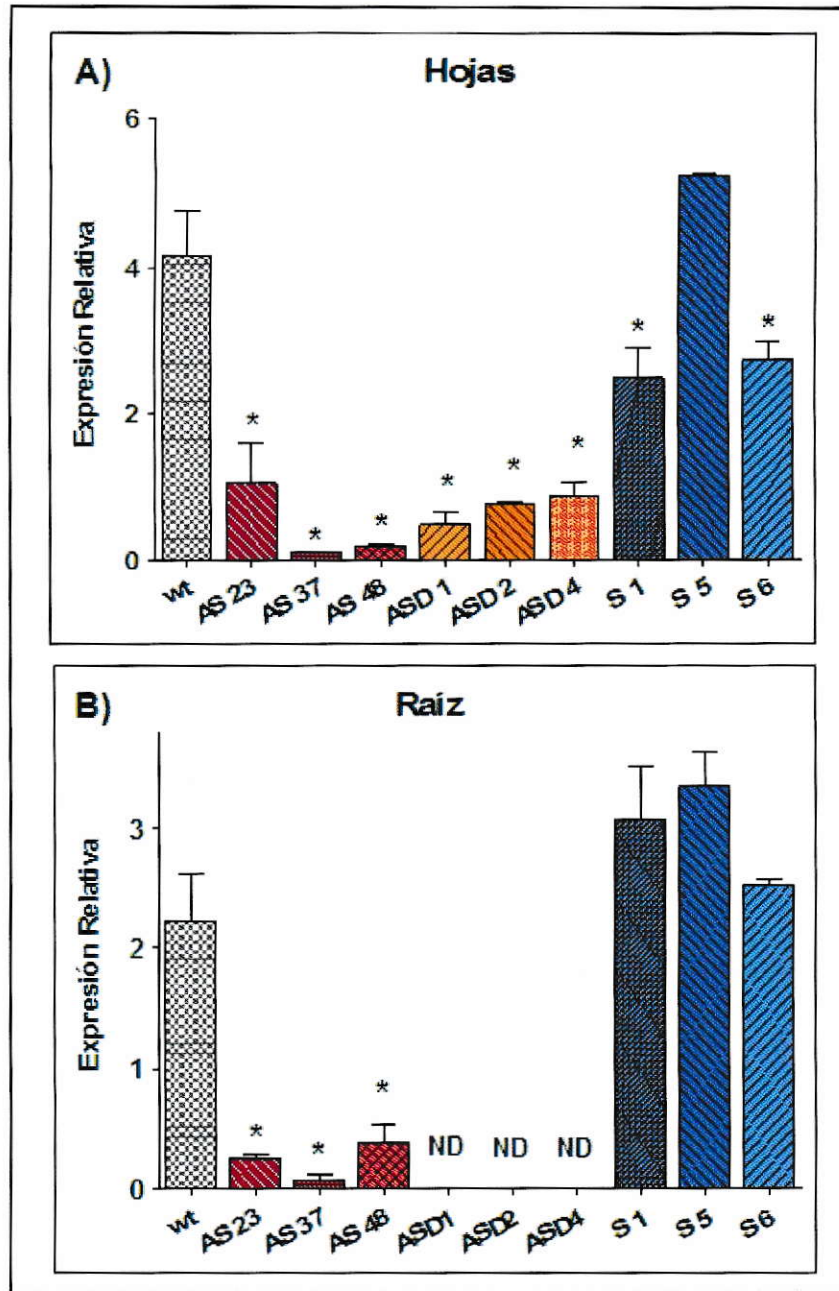


Figura 11. Expresión relativa del gen *lcyb* de *D. carota* en tejido fotosintético (Hojas) y raíz modificada (Raíz) de líneas transformadas de zanahoria, AS, ASD y S.

A: Expresión relativa del gen *lcyb*, respecto a la expresión del gen constitutivo ubiquitina, en tejido fotosintético (hojas y tallos) de zanahoria de las líneas transformadas **AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6** y plantas silvestres (**wt**), determinada mediante RT-PCR en tiempo real. **B:** Expresión relativa del gen *lcyb*, respecto a la expresión del gen constitutivo ubiquitina, en raíz modificada de zanahoria de las líneas transformadas **AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6** y plantas silvestres (**wt**), determinada mediante RT-PCR en tiempo real. **ND:** No detectada. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posterior análisis de Tukey ($p < 0,05$). Con * se indican los resultados con diferencia significativa, respecto a la planta silvestre.

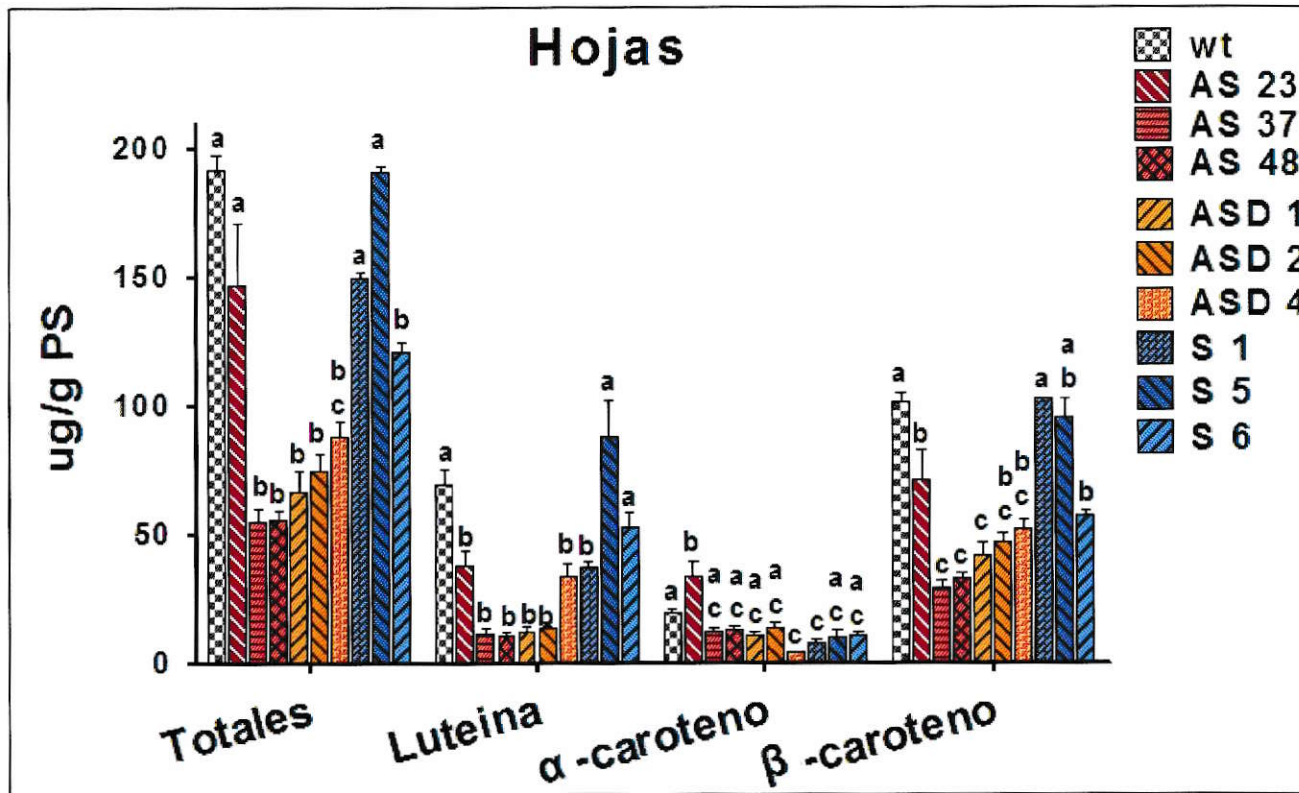


Figura 12. Niveles de carotenoides en tejido fotosintético (Hojas) de las líneas AS, ASD, S de *D. carota*.

Mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinaron la concentración de carotenoides (ug/g de peso seco) en las líneas transformadas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6 y plantas silvestres (wt). Composición de carotenoides en hojas y tejido fotosintético. Concentración de carotenoides totales (Totales), luteína, α-caroteno (a-caroteno) y β-caroteno (b-caroteno). Este experimento se realizó por triplicado en plantas transformadas y silvestre de 3 meses de edad y los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posterior análisis de Tukey ($p < 0,05$). Con * se indican los resultados con diferencia significativa respecto a la planta silvestre.

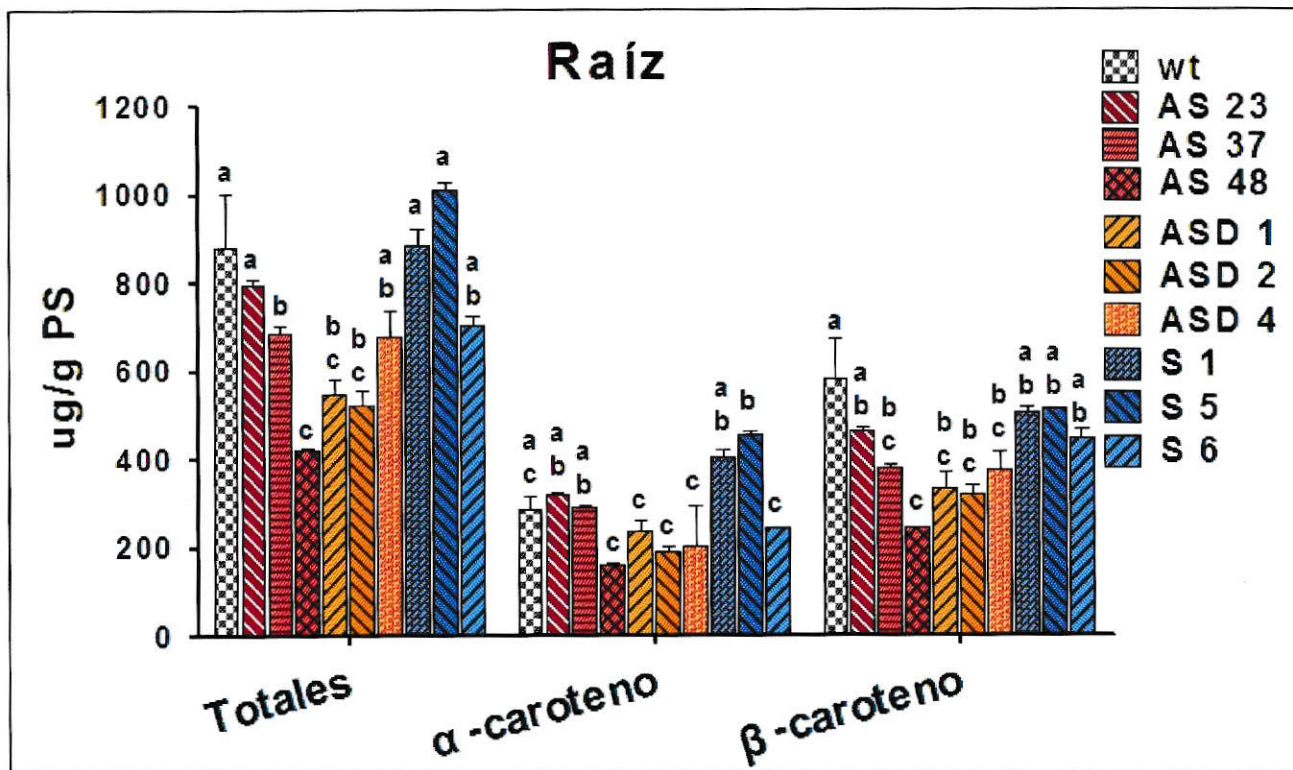


Figura 13. Niveles de carotenoides de la raíz modificada de las líneas AS, ASD, S de *D. carota*.

Mediante espectrofotometría y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinaron la concentración de carotenoides (ug/g de peso seco) en las líneas transformadas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6 y plantas silvestres (wt). Composición de carotenoides en raíz modificada. Se muestra la concentración de carotenoides totales, α-caroteno y β-caroteno(a-caroteno y b-caroteno, respectivamente). Este experimento se realizó por triplicado en plantas transformadas y silvestre de 3 meses de edad y los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posterior análisis de Tukey ($p < 0,05$). Con * se indican los resultados con diferencia significativa respecto a la planta silvestre.

síntesis de β -caroteno y α -caroteno en tejido fotosintético y raíz modificada de *D. carota*. Además, se observa que en la línea S5 que presenta una expresión de *lcyb* muy similar a una planta silvestre, las concentraciones de carotenoides totales y β -caroteno no presentan diferencias significativas respecto a la planta silvestre (Figura 11, Figura 12, Figura 13). Esto indica que esta línea es un buen control de las plantas transformadas.

Mediante el análisis de las líneas AS37, AS48, ASD1 y ASD2 de *D. carota* que presentan silenciado el gen *lcyb*, vimos que la disminución de la expresión del gen *lcyb* en tejido fotosintético y en raíz modificada (silenciamiento sobre 80%), se correlaciona con la disminución de los niveles de β -caroteno en tejido fotosintético (sobre un 50%) y raíz modificada de estas líneas (sobre 34%) (Tabla 2). Por lo tanto, el gen *lcyb* es necesario para la síntesis de β -caroteno tanto en hojas como en raíz de *D. carota*, es decir, no presenta una función órgano-específica en *D. carota*.

La composición de carotenoides en la raíz de la línea S1 es comparable a la planta silvestre y a la línea S5. Este resultado es esperable dado que el nivel de expresión del gen *lcyb* es similar en la raíz de ambas líneas y la planta silvestre. Sin embargo, en hojas de las líneas AS23, S1 y S6 y en la raíz modificada de las líneas AS23 y S6 se observan niveles de carotenoides totales y de β -caroteno que no se correlacionan claramente con el grado de silenciamiento del gen *lcyb* (Tabla 2). Esto puede ser debido a que el nivel de expresión alcanzado por estas líneas no haya sido suficiente para obtener un efecto claro de la función de *lcyb* o debido a un efecto indeterminado durante la transformación.

Adicionalmente, para determinar si el silenciamiento del gen *lcyb* produce un efecto sobre la expresión de otros genes carotenogénicos en la raíz de zanahoria,

analizamos los niveles de expresión de los genes *ccs*, *psy1* y *psy2* en las líneas AS23, AS37, AS48 y en plantas silvestres de *D. carota*.

Tabla 2: Expresión de gen *lcyb* y concentración de carotenoides en las líneas transformadas de *D. carota*.

Se presentan los promedios de los niveles de expresión relativa del gen *lcyb* determinados mediante RT-PCR en tiempo real y el grado de silenciamiento de *lcyb* respecto a la planta silvestre (wt); la concentración de carotenoides totales y el correspondiente porcentaje de disminución respecto a la planta silvestre y la concentración de β -caroteno y la disminución de este pigmento respecto a la planta silvestre (wt) de las líneas transformadas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6 de *D. carota*. NP, indica la no presencia de silenciamiento o disminución de *lcyb* o carotenoides, respectivamente. ND, indica que no se detectó la expresión del gen *lcyb*. PS: peso seco.

Hoja	Expresión relativa <i>lcyb</i>	Silenciamiento <i>lcyb</i> (%)	Concentración carotenoides ($\mu\text{g/g PS}$)	Disminución carotenoides (%)	Concentración β-caroteno ($\mu\text{g/g PS}$)	Disminución β-caroteno (%)
Wt	4,2 +/- 1,2	---	191,5 +/- 10	---	101,2 +/- 6	---
AS 23	1,0 +/- 0,8	74,9	146,9 +/- 41	23,3	71,4 +/- 20	29,4
AS 37	0,1 +/- 0,01	97,4	54,7 +/- 9	71,4	29,1 +/- 6	71,2
AS 48	0,2 +/- 0,06	95,6	55,7 +/- 7	70,9	33,1 +/- 3	67,3
ASD 1	0,5 +/- 0,06	88,4	66,6 +/- 14	65,2	41,8 +/- 9	58,7
ASD 2	0,7 +/- 0,32	82,1	74,8 +/- 12	60,9	47,2 +/- 6	53,4
ASD 4	0,9 +/- 0,07	79,2	88,2 +/- 10	53,9	51,8 +/- 6	48,8
S 1	2,5 +/- 0,83	40,0	150,0 +/- 3	21,7	102,4 +/- 1	NP
S 5	5,3 +/- 0,06	NP	191,0 +/- 3	NP	95,5 +/- 12	5,6
S 6	2,7 +/- 0,49	34,3	121,3 +/- 6	36,6	57,2 +/- 38	43,4
Raíz	Expresión <i>Lcyb</i>	Silenciamiento <i>lcyb</i> (%)	Concentración carotenoides ($\mu\text{g/g PS}$)	Disminución carotenoides (%)	Concentración β-caroteno ($\mu\text{g/g PS}$)	Disminución β-caroteno (%)
Wt	2,2 +/- 0,7	---	882,5 +/- 211	---	579,8 +/- 166	---
AS 23	0,3 +/- 0,05	88,7	796,0 +/- 23	9,8	463,7 +/- 16	20,0
AS 37	0,1 +/- 0,05	96,7	686,0 +/- 30	22,3	380,1 +/- 15	34,5
AS 48	0,4 +/- 0,26	82,8	423,0 +/- 4	52,1	242,9 +/- 1	58,1
ASD 1	ND	ND	549,3 +/- 56	37,8	334,0 +/- 62	42,4
ASD 2	ND	ND	521,7 +/- 60	40,9	320,6 +/- 39	44,7
ASD 4	ND	ND	676,7 +/- 103	23,3	375,3 +/- 74	35,3
S 1	3,1 +/- 0,3	NP	884,5 +/- 65	NP	505,5 +/- 25	12,8
S 5	3,4 +/- 0,1	NP	1009,6 +/- 34	NP	512,7 +/- 5	11,6
S 6	2,5 +/- 0,1	NP	702,2 +/- 38	20,4	447,5 +/- 36	22,8

3.2. Análisis de expresión de otros genes carotenogénicos mediante RT-PCR en tiempo real.

En este análisis se utilizó cDNA de la raíz modificada de las líneas AS23, AS37 y AS48 (2.8), para observar el efecto del silenciamiento de *lcyb* en la expresión de los genes carotenogénicos. Seleccionamos el análisis de los genes *ccs*, *psy1* y *psy2* por las siguientes razones: Se ha propuesto que el gen *ccs* podría codificar para una enzima con actividad licopeno β ciclasa, por lo tanto podría compensar el silenciamiento de *lcyb*. Por otra parte, se ha descrito que *psy* es un importante punto de regulación en otros modelos vegetales, por esto, la expresión de estos genes se puede ver afectada por el silenciamiento de *lcyb* en *D. carota*.

Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de estos tres genes carotenogénicos disminuyen en las plantas silenciadas, AS23, AS37 y AS48 de manera significativa, salvo la expresión de *psy2* en la línea 23. Por lo tanto, estos resultados indican que el silenciamiento del gen *lcyb* está acompañado de la disminución de la expresión de los genes *ccs*, *psy1* y *psy2* (Figura 14). La disminución de la expresión de *ccs* indica que este gen no está compensando el silenciamiento de *lcyb* en la raíz modificada, aunque no se puede descartar que tenga actividad licopeno β ciclasa o que cumpla esta función en órganos fotosintéticos.

Adicionalmente, y debido a que la expresión de los genes *psy1* y *psy2*, que codificarían para la enzima fitoeno sintasa, disminuyen en las plantas transformadas determinamos la concentración de fitoeno (Métodos 2.7.3) en las líneas transformadas y en plantas silvestres de *D. carota* (Figura 15).

De este análisis se obtuvo que las líneas AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, y ASD4 presentan una disminución significativa en la acumulación de fitoeno, respecto a la planta silvestre, correlacionando el silenciamiento del gen *lcyb* con la disminución en

la síntesis de fitoeno. Es interesante destacar que entre las líneas AS y ASD no existe diferencia significativa en la biosíntesis de fitoeno. La línea S consistentemente a los otros análisis no muestra una diferencia significativa respecto a la planta silvestre.

Por lo tanto, de acuerdo a estos análisis, en plantas en las que el gen *lcyb* está silenciado, disminuyen los niveles de β -caroteno, la expresión de los genes carotenogénicos *ccs*, *psy1* y *psy2* y la síntesis de fitoeno, precursor de la síntesis de todos los carotenoides (Figura 1). Estos resultados sugieren fuertemente que en una planta silvestre, el β -caroteno o un compuesto río abajo de éste regula de manera positiva la expresión de genes carotenogénicos y consecuentemente la síntesis de carotenoides.

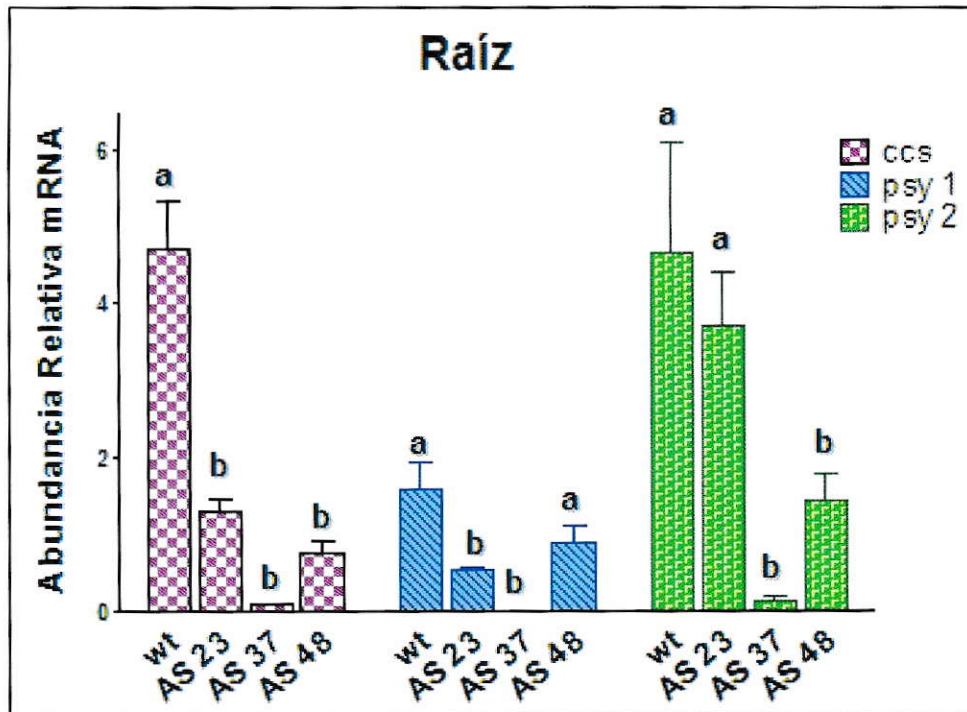


Figura 13. Efecto del silenciamiento de *lcyb* en la expresión de otros genes carotenogénicos en raíz modificada de *D. carota*.

A: Expresión relativa de los genes *ccs*, *psy1* y *psy2*, respecto a la expresión del gen constitutivo ubiquitina, en raíz modificada de zanahoria de las líneas **AS23**, **AS37**, **AS48**, y plantas silvestres (**wt**) de tres meses de edad. Los experimentos fueron realizados por triplicado (en duplicado) y los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posterior análisis de Tukey ($p < 0,05$). Con * se indican los resultados con diferencia significativa respecto a la planta silvestre.

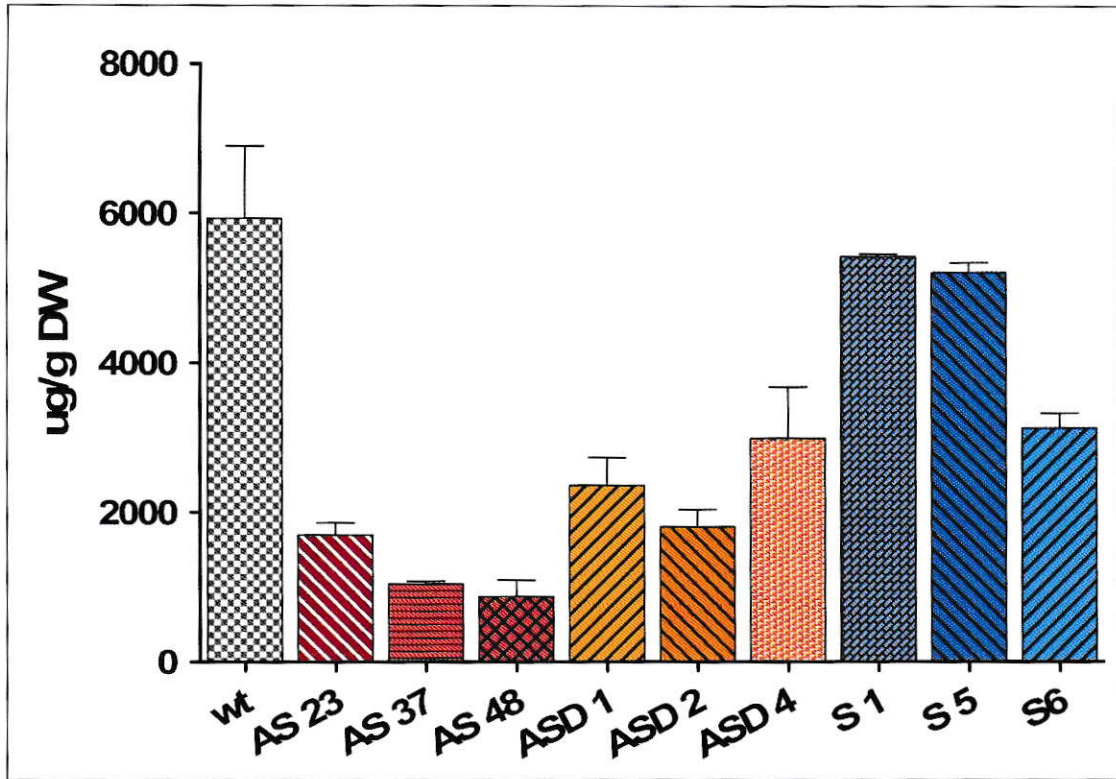


Figura 14: Efecto del silenciamiento del gen *lcyb* en la biosíntesis de fitoeno en la raíz modificada de *D. carota*.

Se muestran los niveles de fitoeno (µg/g de peso seco) en la raíz modificada de las líneas transformada **AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD4, S1, S5, S6** y plantas silvestres (**wt**). La cuantificación fue realizada por triplicado y los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y posterior análisis de Tukey ($p < 0,05$). Con * se indican los resultados con diferencia significativa respecto a la planta silvestre.

DISCUSIÓN

Transgénesis de las líneas transformadas.

Se ha descrito que la integración de la construcción en el genoma de la planta es un proceso limitante de la transformación cuya eficiencia depende del protocolo de transformación utilizado y de la especie a transformar (Gelvin, 2000). Nosotros alcanzamos eficiencias superiores a 24% con los tres vectores utilizados, lo que nos indica que el sistema de transformación de *D. carota* fue adecuado y muy exitoso. Eficiencias similares de transformación de *D. carota* fueron obtenidos por Jayaraj y col.,(2008) al generar zanahorias sobreproductoras de xantófilas.

Sin embargo, el proceso de inserción en el genoma sólo es uno de los puntos limitantes de la transformación de plantas, dado que la presencia de las construcciones no implica necesariamente que se encuentren funcionalmente activos, debido a que la expresión de las construcciones en organismos transformados es dependiente del lugar de inserción en el genoma (Gelvin, 2000; Gelvin y Kim, 2007). Mediante la transformación con *A. tumefaciens* la inserción de las construcciones en el genoma vegetal ocurre al azar aunque preferentemente en regiones de eucromatina del genoma nuclear. Por esto, aunque la probabilidad sea menor, es posible que la inserción ocurra en una región no activa del genoma, lo que implica que la construcción no fuese funcional ya que no se expresaría. Por lo tanto, es posible tener líneas

transformadas, pero que no expresen la construcción. Para evitar esto es importante contar con un adecuado sistema de selección de las plantas transformadas, de forma tal que solo se seleccionen las líneas transformadas cuyas construcciones se expresen. La obtención de falsos positivos puede deberse a que la planta se desarrolle donde la concentración del agente de selección está diluida por efecto de otras líneas resistentes o debido a la sensibilidad de la técnica usada para dicho análisis, o quizás por ambos factores. En nuestro caso, el sistema de selección durante la embriogénesis somática fue eficiente, ya que de 12 líneas que fueron efectivamente transformada y analizadas mediante RT-PCR solo en una no pudimos detectar la presencia del transcrito del gen *nptII* mediante RT-PCR (Figura 7).

Las construcciones utilizadas para transformar *D. carota* mediante *A. tumefaciens*, contaban con la construcción para el silenciamiento génico de *lcyb* que dirige la expresión del fragmento de interés del gen *lcyb* bajo el promotor 35Sd y terminador NOS y la construcción de selección que posee el gen *nptII* de resistencia al antibiótico kanamicina, bajo el promotor y terminador NOS (Figura 3). Entonces, debido a que la funcionalidad de las construcciones en las plantas transformadas depende del promotor utilizado y del lugar de inserción en el genoma expresión. Nosotros consideramos la funcionalidad la construcción de selección, es decir, la expresión del gen *nptII* como indicativo directo de la funcionalidad de la construcción para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb* de *D. carota*, ya que ambas construcciones están dirigidas por promotores constitutivos y que por efecto de la transformación con *A. tumefaciens* ambas construcciones se insertan en la misma posición del genoma vegetal. Es así como logramos determinar que las 11 líneas transformadas, AS23, AS37, AS48, ASD1, ASD2, ASD3, ASD4, S1, S3, S5, S6 (Figura

7), debían expresar el fragmento del gen *lcyb* y potencialmente podrían generar el silenciamiento del gen en estudio.

Silenciamiento de las líneas transformadas.

El silenciamiento de las líneas transformadas AS y ASD está determinado por el nivel de expresión del fragmento antisentido presente en las construcciones para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb* de *D. carota* (Figura 3). Es por ello, que una mayor expresión de estas construcciones induciría mayor silenciamiento del gen blanco dado por la mayor probabilidad de encuentro del fragmento de *lcyb* con el transcrito endógeno de *lcyb*. Los resultados obtenidos de las líneas AS y ASD son concordantes entre ellas respecto al grado del silenciamiento y la síntesis de carotenoides. Es por ello que no fue necesario analizar un número mayor de líneas transformadas.

De acuerdo a lo esperado, las líneas S1 y S6 que fueron transformadas con la construcción de silenciamiento sentido generaron grados de silenciamiento menor (inferior al 30%) y con mayor variación entre ellas, al obtenido con las construcciones antisentido, ya que esta estrategia necesita sobrepasar un nivel umbral para inducir el silenciamiento. A pesar del bajo porcentaje de silenciamiento, los niveles de β -caroteno y carotenoides totales, resultaron levemente alterados (entre 0-40%, Tabla 2) respecto a la planta silvestre (wt), lo cual muestra que al haber un menor cambio en los niveles de transcrito de *lcyb* se traduce en un menor cambio en los niveles de β -caroteno y carotenoides totales. Por otro lado, la línea S5 no presentó silenciamiento de *lcyb* ni cambios significativos de los niveles de carotenoides, por lo tanto, se comportó como control de la transformación y embriogénesis somática (Figura 3). La línea S5 fue un muy buen control de la transformación, ya que posee el mismo tamaño que el vector

pBIN19/L-AS y sobre-expresa bajo el mismo promotor el fragmento del gen *lcyb* en orientación sentido, por esto se consideró la línea S5 como control del sistema y no las líneas obtenidas de la transformación con el vector pBIN19. El control de transformación o de silenciamiento nos permitió validar los resultados obtenidos con las plantas transformadas AS y ASD y corroborar que el efecto observado en cuanto a disminución de carotenoides se debió a un efecto directo sobre el nivel de transcrito del gen *lcyb* de *D. carota* y no del proceso de transformación en si.

Es interesante destacar que el grupo de plantas transformadas S tienen un grado menor de silenciamiento que aquel obtenido con AS y ASD, lo cual concuerda con resultados de la literatura y los antecedentes teóricos que fundamentan el silenciamiento génico postranscripcional en plantas.

Respecto al grado de silenciamiento de las líneas transformadas AS y ASD, las primeras generaron niveles de silenciamiento mayor al de las líneas ASD, que poseen la construcción doble de silenciamiento aunque no de manera significativa (Figura 3). Nosotros esperabamos mayor silenciamiento en estas últimas dado que poseen dos construcciones antisentido, por lo tanto, la expresión del fragmento antisentido *lcyb* sería el doble, aumentando la probabilidad de encuentro con el mensajero endógeno. Sin embargo, la diferencia en los niveles de silenciamiento no es significativa, por lo tanto, puede ser sólo efecto del azar. Esto nos sugiere que es suficiente una construcción de silenciamiento antisentido bajo el promotor 35S doble, para silenciar el gen blanco.

Existe la posibilidad de que la transformación con la construcción de silenciamiento antisentido doble pudo inducir más silenciamiento en algunas líneas, pero que estas líneas no fueran viables y no completaran el proceso de embriogenesis debido a la función esencial que cumplen los carotenoides en las plantas. Sin embargo,

este mismo argumento es aplicable a la transformación con la construcción de silenciamiento antisentido. Por todo esto, las líneas transformadas AS y ASD fueron analizadas de acuerdo a su nivel de silenciamiento y no en relación a la construcción que poseen, ya que esto no fue determinante para el análisis de los resultados obtenidos.

Análisis de RT-PCR en tiempo real del tejido fotosintético de las líneas transformadas de *D. carota* indicaron que las líneas AS37, AS48, ASD1, ASD2 presentaban un porcentaje de silenciamiento superior al 80%, mientras que la línea AS23 y ASD4 presentaron un 74,9% y 79,2% de silenciamiento del gen *Icyb*, respectivamente. La línea AS23 presentó silenciado el gen *Icyb* en órganos fotosintéticos y no en la raíz modificada, mientras que la línea ASD4 presentó silenciado el gen *Icyb* en raíz y no en órganos fotosintéticos (Figura 8 y 9), a diferencia de las líneas AS37, AS48, ASD1, ASD2 que presentaron silenciado el gen *Icyb*, tanto en hojas como en la raíz modificada (Figura 8 y Figura 9), cuando fueron analizadas mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Este resultado sugiere que el 80% de silenciamiento en órganos fotosintéticos es un valor umbral para detectar el silenciamiento mediante un RT-PCR semi-cuantitativo y que valores de silenciamiento inferiores a éste son visualizadas por el gel de agarosa. En raíz, las líneas AS37, AS48 mostraron un grado de silenciamiento superior al 80% y en el análisis de RT-PCR semicuantitativo estas tres líneas estaban silenciadas, lo cual concuerda con el criterio de sensibilidad de detección de silenciamiento del gen *Icyb* en gel de agarosa. En la raíz modificada de las líneas ASD1, ASD2 y ASD4 se esperaba este mismo comportamiento. Sin embargo, esto no pudo ser determinado, dado que no se detectó el transcrito de *Icyb* mediante RT-PCR en tiempo real, sugiriendo un nivel de expresión bajo el límite de detección de esta técnica en las condiciones utilizadas.

Por lo tanto, consideramos que la ausencia del transcrito de *lcyb* mediante RT-PCR semi-cuantitativo y un grado de silenciamiento mayor al 80% mediante RT-PCR en tiempo real, indica que el gen *lcyb* se encuentra silenciado en esa línea transgénica. De manera tal, las líneas AS37, AS48, ASD1 y ASD2 reflejaron de mejor manera el efecto de disminución de función (knock-down) de *lcyb* en la biosíntesis de carotenoides y nos entregaron resultados más concluyentes sobre el estudio de la función del gen *lcyb* de *D. carota*.

Expresión génica de lcyb y efecto del silenciamiento del gen lcyb sobre la biosíntesis de carotenoides en D. carota.

Los análisis de expresión muestran que en plantas silvestres el gen *lcyb* presenta una expresión diferencial en la planta, siendo 2 veces mayor en órganos fotosintéticos que en la raíz modificada. En otros modelos vegetales como papaya (*Carica papaya*), y tomate también, se ha descrito expresión diferencial del gen *lcyb* entre hojas y frutos (Skelton y col, 2006), es decir entre tejido fotosintético y órganos con alto contenido de cromoplastos, así como la raíz modificada de zanahoria. La tasa de expresión del gen *lcyb* en órganos fotosintéticos y raíz modificada de *D. carota* no se correlaciona con los niveles de carotenoides, ya que la raíz modificada de zanahoria tiene 4 veces más carotenoides que en las hojas. Esta diferencia en la concentración puede ser efecto de la estabilidad de estos pigmentos en órganos fotosintéticos y en raíz modificada. En órganos fotosintéticos los carotenoides están sujetos a degradación o recambio por sus propiedades fotoprotectoras mientras que en raíz los carotenoides están almacenados en estructuras estables que hacen que la tasa de recambio o degradación de estos pigmentos sea menor (Vishnevetsy y col, 1999, ver más adelante).

La expresión diferencial del gen *lcyb* explica la diferencia de silenciamiento presente en hojas y raíz de las líneas S1 y S6 donde vemos que en órganos fotosintéticos la acumulación del transcrito de *lcyb* disminuye en un 40% y 34,5%, respectivamente, mientras que en raíz no se produjo silenciamiento de este gen. En órganos fotosintéticos la expresión del gen *lcyb* es mayor, permitiendo sobrepasar el nivel umbral que activa la maquinaria de silenciamiento génico post-transcripcional, lo cual no habría sucedido en la raíz modificada. De manera similar el silenciamiento de las líneas AS y ASD en hojas fue mayor al de la raíz modificada, aunque esta diferencia no es significativa.

De acuerdo al análisis de los niveles de carotenoides de las líneas silenciadas, determinamos que el gen *lcyb* de *D. carota* es necesario para la síntesis de carotenoides en órganos fotosintéticos y en la raíz modificada de zanahoria. Las líneas AS37, AS48, ASD1 y ASD2 que en órganos fotosintéticos tienen un grado de silenciamiento de 97,4%, 95,6%, 88,4% y 82,1%, respectivamente, presentan una disminución de los niveles de β -caroteno de 71,2%, 67,3%, 58,7% y 53,4%, respectivamente. En raíz modificada las líneas AS37 y AS48 presentaron un 96,7% y 82,8% de silenciamiento respectivamente mientras que en las líneas ASD1 y ASD2 la expresión de *lcyb* no fue detectada, presentaron una disminución en los niveles de β -caroteno en la raíz modificada de un 20%, 34,5%, 58,1% y 42,4%, respectivamente. Esto indica que el gen *lcyb* efectivamente es necesario para la síntesis de β -caroteno en órganos fotosintéticos y en la raíz modificada. Esta disminución de los niveles de β -caroteno está correlacionada con la disminución de los niveles de carotenoides totales (Figura 12 y tabla 2). Además, podemos sugerir que el gen *lcyb* de *D. carota* que fue silenciado en este trabajo, codifica para una enzima con actividad licopeno β ciclasa. Sin embargo, para comprobar directamente la función de *lcyb* (DQ192190), se

deberían realizar ensayos de complementación en mutantes de levaduras o bacterias sintetizadoras de carotenoides carentes del gen *lcyb*.

También, vemos en hojas que producto del silenciamiento disminuyen de manera moderada pero significativa los niveles de luteína producto del silenciamiento de *lcyb*, ya que LCYB es necesario para la síntesis de α -caroteno que es precursor directo de luteína. Sin embargo, no se observa una disminución significativa de α -caroteno, precursor de luteína (Figura 1). El menor impacto sobre los niveles de estos pigmentos se debe a que para la síntesis de estos es necesaria la ciclación del licopeno por acción de LCYB y de LCYE. Se ha descrito que esta última enzima no puede ciclar al licopeno cuando éste ya ha sido ciclado en un extremo (Cunningham y col, 1996). De esta forma, en un estado silvestre la cinética de estas reacciones desvía la ruta hacia la rama del β -caroteno. Pero al estar silenciado *lcyb* el licopeno está disponible para la acción de LCYE con menor competencia por parte de LCYB. Así, el licopeno es ciclado en un extremo por LCYE que luego es sustrato de LCYB formando α -caroteno y consecuentemente disminuye el licopeno que puede ser ciclado en ambos extremos por LCYB, por lo tanto pese a que *lcyb* es necesaria para la síntesis de ambos pigmentos el mayor efecto se observa sobre el β -caroteno. La disminución de luteína podría deberse, también, a que la expresión de los genes que codifican para las enzimas C β Hx o C ϵ Hx, aquellas responsables de la síntesis de luteína a partir de α -caroteno, se encuentren reprimidas en las plantas transgénicas, así como se observó para *ccs*, *psy1* y *psy2*. Este punto está aun por ser resuelto.

En las líneas transformadas observamos que cuando el silenciamiento de *lcyb* en órganos fotosintéticos es en promedio un 90%, la disminución de los niveles de β -caroteno es en promedio 63%. En la raíz modificada se observó que si el silenciamiento del gen *lcyb* es en promedio mayor a 90%, el β -caroteno disminuye sólo

alrededor de 38%. En ambos casos no existe una correlación directa entre el grado de reducción del transcrito del gen *lcyb* con la cantidad de β -caroteno acumulada en ambos órganos, observando siempre que la disminución de β -caroteno es menor que el nivel de silenciamiento del gen *lcyb* en la línea transformada, sobretodo en la raíz modificada. Esto probablemente se deba a la estabilidad que poseen los carotenoides en las membranas tilacoidales de los cloroplastos y en los complejos lipoproteicos de los cromoplastos de la raíz modificada como fue descrito anteriormente. Es posible que la diferencia entre el grado de silenciamiento del gen *lcyb* y el nivel de carotenoides se deba también a que otro gen este supliendo la función del gen *lcyb* en estos órganos. Just y col (2007) propusieron que el gen *ccs* sería el segundo gen *lcyb* en *D. carota*. Sin embargo, de acuerdo a los resultados del análisis de expresión mediante RT-PCR en tiempo real (Figura 13) podemos decir que el gen *ccs* no estaría supliendo esta función en la raíz modificada de zanahoria ya que el nivel de transcrito de este gen también disminuye en las líneas que tienen silenciado el gen *lcyb* (Figura 13). Nosotros proponemos que a causa del silenciamiento del gen *lcyb*, disminuye la expresión del gen *ccs* y no que el gen *ccs* sea silenciado en conjunto con *lcyb*, ya que ambos genes poseen una baja identidad nucleotídica. Sólo una región de 10 pb tiene una identidad nucleotídica significativa cercana a 70%, lo cual no es suficiente para activar el silenciamiento, requiriendo para ello un fragmento mínimo de 100 pb y sobre un 80% de identidad nucleotídica entre el fragmento utilizado y el gen endógeno (Burton y col, 2000, Ingelbrecht y col, 1999; Mueller y cols, 1995; Schweizer y col, 2000). Sin embargo, con los análisis realizados no podemos descartar que *ccs* codifique para una licopeno β ciclasa. La expresión de *ccs* en órganos fotosintéticos no fue determinada, pero esperamos que al igual que en raíz modificada no supla al gen *lcyb* y se encuentre disminuida su expresión producto del silenciamiento de *lcyb*, debido a que el

efecto en la disminución de transcrito de *lcyb* es mayor en órganos fotosintéticos que en raíz modificada.

Respecto, a la posibilidad de la existencia de otro gen que codifique para licopeno β ciclasa, es importante destacar que hasta la fecha solo se han descrito dos genes que codifican para una enzima con actividad licopeno β ciclasa, en algunas plantas como tomate y pimentón (Bouvier y col, 1994; Ronen y col, 2000), donde los asociados a cromoplastos son ortólogos entre sí y a su vez, los asociados a cloroplastos son ortólogos entre sí. Estudios filogenéticos indican que existen tres genes pertenecientes a la familia génica de las licopeno β ciclasa, estos son *lcyb*, *ccs* y *nxs* (Sandmann, 2002). Se ha descrito que *cycb* de tomate se produjo por una duplicación del gen *lcyb* y posterior divergencia, al igual que el gen *nxs* (Krubasik y Sandmann, 2000; Buovier y col, 2000; Sandmann, 2002). Sin embargo, hasta la fecha pese a que *nxs* pertenece a la misma familia génica que *lcyb* y *ccs*, no se ha descrito que *nxs* codifique para una enzima con actividad licopeno β ciclasa en ningún organismo. Adicionalmente, Just y col (2007) mediante análisis de mapeo cromosómico, análisis de rasgo cualitativo asociado a loci (QTL) y polimorfismos de nucleótido único (SNP) sólo propone a los genes *ccs* y *lcyb* de zanahoria como candidatos para codificar para licopeno β ciclada, aunque en sus estudios no encontró la secuencia de cDNA de *nxs*, pero no lo asocia a la actividad licopeno β ciclada. Por lo tanto, en base a estos antecedentes nosotros consideramos que solo *ccs* podría suplir la función de *lcyb* en *D. carota*. Para corroborar esta propuesta sería interesante estudiar la expresión del gen *ccs* y *nxs* de zanahoria, realizar ensayos de complementación funcional en mutantes de levadura o bacterias sintetizadoras de carotenoides carentes del gen *lcyb* y obtener mutantes knock out o knock down de dichos genes.

Nuestros resultados indican también que existe un mayor efecto del silenciamiento en hojas que en la raíz modificada, a pesar de tener grados de silenciamiento similares. Esto se debe posiblemente a que el nivel de carotenoides en los órganos está dado por el equilibrio entre la síntesis y la degradación constante ejercida por la luz mediante el proceso de fotooxidación (Simkin y col, 2003). En los cromoplastos de la raíz modificada los carotenoides están siendo acumulados en el tiempo en complejos lipoproteicos que les otorgan mayor estabilidad a los pigmentos, lo que se traduce en una baja tasa de degradación metabólica. .

Debido a que nuestros resultados indican que el gen *lcyb* es necesario para la síntesis de β -caroteno tanto en órganos fotosintéticos como en raíz modificada, debemos suponer que este gen tiene un sistema de regulación de expresión que permite que sea transcrito en hojas, en condiciones de luz y en la raíz modificada en condiciones de oscuridad. En órganos fotosintéticos los niveles de expresión son mayores que en raíz, por lo tanto, tendría una regulación positiva por efecto de la luz. Por lo tanto, nosotros suponemos que en la región promotora del gen deben estar presentes cajas reguladas por luz, como se ha descrito para *lcyb*, *psy* y otros genes carotenogénicos en otros modelos vegetales (Römer y col, 2005; Welsch y col, 2003; Welsch y col, 2000; Simkin y col, 2003; Woitsh y Römer, 2003), mientras que en raíz podría presentar un nivel basal de expresión. Estos son puntos que quedan por ser resueltos.

Los genes *psy1* y *psy2* también disminuyen su expresión en las plantas silenciadas, indicando que dada la disminución del β -caroteno se disminuye la expresión de otros genes carotenogénicos como *psy1*, *psy2* y *ccs* (Figura 12A). Esto indica que el β -caroteno o una molécula río abajo de ésta regula de manera positiva la expresión de estos genes carotenogénicos en una planta silvestre. Un buen candidato

para este efecto es la hormona vegetal ácido abscísico, ABA. Esta fitohormona regula la expresión de muchos genes en plantas, entre ellos genes relacionados con procesos de protección a estrés oxidativo (Leung y Giraudt, 1998), y como hemos mencionado, ésta es una de las funciones que cumplen los carotenoides. Actualmente, se ha descrito que en modelos como arroz y maíz uno de sus tres genes *psy* que codifican para fitoeno sintasa es regulado a nivel transcripcional por ABA, los que poseen en su región promotora los elementos ABRE de respuesta a ABA, mostrando una regulación positiva de la vía de síntesis de carotenoides (Welsch y col, 2008; Li y col, 2008). Por lo tanto, la disminución de la expresión de *lcyb* puede afectar el flujo hacia la síntesis de ABA, y esto disminuiría la expresión de genes carotenogénicos como *psy1*, *psy2* y *ccs* bajando el flujo de síntesis del precursor fitoeno y la ruta de síntesis de carotenoides (ver Figura 1). Esta propuesta está respaldada por el nivel de fitoeno encontrados en las líneas que tienen silenciado el gen *lcyb* (Figura 14), donde observamos que las líneas transformadas sintetizan en promedio 60% menos de este precursor en la raíz modificada de zanahoria. La disminución de la expresión de *psy*, muestra que en zanahoria este gen es clave en el control del flujo de la ruta carotenogénica. Cabe destacar que en zanahorias blancas se determinó que la síntesis de fitoeno es la etapa limitante en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Fernández y col, 2005). Sin embargo, queda por determinar la función específica de *psy1* y *psy2* en *D. carota*. Además, en semillas de *A. thaliana* que sobre-expresan este gen presentan un retardo en la germinación, dado que la sobre-expresión de fitoeno aumenta el flujo de la ruta biosintética hacia ABA, el cual retarda el proceso de germinación de la semilla (Lindgren y col, 2003). Todo esto sugiere que existiría una regulación positiva por efecto del ABA sobre la ruta de síntesis de carotenoides, a través de una regulación transcripcional concertada de los genes carotenogénicos, y que un importante punto de

esta regulación ocurre a nivel de los genes *psy* (Lindgren y col, 2003) y *lcyb* (esta tesis).

Es importante notar que el mayor grado de silenciamiento lo encontramos en la línea AS37 que tiene un 97,4% de silenciamiento del gen *lcyb*. Este porcentaje es bastante alto, considerando que no se han descrito mutantes con pérdida de función de LCYB en plantas. Entonces, una baja tasa de transcripción sería suficiente para mantener niveles de carotenoides que permiten la viabilidad de la planta. La ausencia de mutantes homocigotos knock out para *lcyb* se debe a que la pérdida completa de la actividad LCYB afecta el ciclo de las xantófilas que participa en la fotoprotección de las células vegetales mediante un proceso de disipación térmica de energía por acción de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) (Figura 1) (Revisado en Niyogi, 1999). Además, se altera la síntesis de la fitohormona ABA que participa en muchos procesos de la planta como en la germinación, senescencia, en la regulación de apertura estomática y en la respuesta a estrés abiótico y biótico (Mauch-Mani, 2005). Por esto, actualmente solo se encuentran mutantes de *A. thaliana* en el banco de semillas (www.arabidopsis.org), donde existen dos mutantes que tienen inserciones en la región promotora de este gen. Estos mutantes no han sido descritos en la literatura y dado el lugar de inserción de la mutación, probablemente no sean mutantes con pérdida completa de función. Recientemente, Fang y col (2008) analizaron dos mutantes heterocigotos de *lcyb* con deleciones de 25 pb y 1 pb en el marco de lectura abierto de este gen. Estas mutantes presentaron una reducción en la síntesis de carotenoides y ABA, además de la acumulación de especies reactivas del oxígeno y un fenotipo deficiente de ABA caracterizado por fotosensibilidad, germinación temprana de semillas (semillas vivíparas) y baja resistencia a estrés abióticos (Nambara y Marion-Poll, 2005). Los autores recalcan que las plantas homocigotos mueren a las 4 semanas

de vida (Fang y col, 2008). De esta forma queda descrito que una pérdida completa de la función de licopeno β ciclasa se traduce en una reducción en los precursores necesarios para la síntesis de la hormona vegetal ABA, implicada en importantes procesos vegetales, generando plantas inviables. Adicionalmente, y debido a que *D. carota* es una planta bianual, la generación de plantas homocigotas de zanahoria podrían generarse después del segundo año, cuando las plantas heterocigotas florecen y dan lugar a semillas. Estos antecedentes avalan la estrategia de silenciamiento para el estudio de los genes carotenogénicos, ya que al disminuir significativamente la expresión del transcrito de *lcyb* permite la sobrevivencia de las plantas y el análisis de la función de dicho gen en el metabolismo carotenogénico. Esto fue lo que obtuvimos en nuestras plantas, las cuales presentaron un fenotipo muy semejante a las plantas silvestre aun teniendo desde 80% a 97% de silenciamiento del gen *lcyb* (Tabla 2). Las plantas no presentan clorosis (decoloramiento) en sus hojas, debilitamiento o fotosensibilidad como signo de deficiencia severa de carotenoides. Por ello nosotros sugerimos que el bajo nivel de transcrito que se detecta en las plantas silenciadas sería suficiente para mantener una producción basal de carotenoides que permite la viabilidad de la planta, como vimos en esta tesis y además, permite observar un efecto asociado a la pérdida de función parcial de la actividad licopeno β ciclasa que permite el estudio de la función del gen *lcyb*.

CONCLUSIÓN

Los vectores binarios para el silenciamiento génico post-transcripcional del gen *lcyb* de *D. carota* pBIN19/L-AS y pBIN19/L-ASD utilizados en esta tesis, fueron capaces de transformar de manera estable *D. carota*, generando líneas transformadas que presentan reducido el nivel de transcrito del gen *lcyb*.

Las líneas transformadas con el vector pBIN19/L-AS que poseen insertada en su genoma la construcción para silenciamiento antisentido y las líneas transformadas con el vector pBIN19/L-ASD que poseen la construcción doble antisentido no presentaron diferencias significativas en la inducción del silenciamiento génico post-transcripcional, silenciando eficientemente el gen *lcyb* de *D. carota*.

El gen *lcyb* evaluado es necesario para la síntesis de β -caroteno en *D. carota*, ya que producto del silenciamiento determinamos que, disminuye la acumulación de β -caroteno y carotenoides totales en las plantas transgénicas

El gen *lcyb* tiene una función no-órgano específica, ya que las líneas transformadas que poseen *lcyb* silenciado presentan una reducción significativa de los niveles de β -caroteno tanto en órganos fotosintéticos (entre 53% y 71%) como en la raíz modificada (entre 35% y 45%). En base a los resultados obtenidos aceptamos la hipótesis alternativa: "La expresión del *lcyb* en *Daucus carota* es necesaria para la síntesis de β -caroteno en toda la planta, es decir, no es órgano-específico"

PROYECCIONES

Nuestros resultados también sugieren que el gen *lcyb* es necesario para la síntesis de β -caroteno, por lo tanto, indirectamente sugieren que *lcyb* codifica para una enzima con actividad LCYB. Ensayos de complementación de función utilizando levaduras mutantes en *lcyb* permitirían determinar directamente su actividad enzimática. Vimos que el gen *lcyb* de *D. carota* es necesario para la síntesis de β -caroteno en órganos fotosintéticos y en raíz modificada de zanahoria y que la expresión de *lcyb* es mayor en hojas que en raíz modificada. Estos resultados sugieren que el promotor de este gen permite su transcripción en la raíz modificada en condiciones de oscuridad y en órganos fotosintéticos en presencia de luz, donde la expresión es mayor. Estas características hacen muy interesante la obtención y caracterización del promotor de *lcyb* con la posibilidad de encontrar en su región promotora elementos de respuesta a luz como G1, G2 y las cajas-Z (Z-box) (Yadav y col, 2002) y evaluar su funcionalidad asociándolo a genes reporteros.

Además, nuestros resultados sugieren una regulación positiva a nivel transcripcional de la ruta de biosíntesis de carotenoides. En este punto el estudio del efecto de la hormona vegetal ABA sobre esta ruta nos indicaría si es efectivamente esta hormona el efector que regula de manera positiva la expresión de los genes carotenogénicos. En este ámbito se propone cuantificar los niveles de ABA endógeno producido en las plantas transformadas AS y ASD respecto a las plantas silvestres. Además, el estudio

de la expresión de otros genes carotenogénicos en presencia y ausencia de ABA exógeno arrojarían más información acerca de este punto. Adicionalmente, el análisis del promotor de los genes carotenogénicos, como *psy1* y *psy2*, determinaría la presencia de elementos de respuesta a ABA, como los motivos ABRE y CE (Leung y Giraudat, 1998).

Respecto al gen *ccs*, de acuerdo a nuestros análisis este gen no supe la función del gen *lcyb* en la raíz modificada. Por ello, los análisis de expresión de este gen en órganos fotosintéticos nos permitirían determinar si este gen supe a *lcyb* en hojas. De todas formas son necesarios estudios más profundos para determinar si el gen *ccs* codifica para una enzima con actividad LCYB. Una buena aproximación para ello sería silenciar este gen en plantas silvestres y en plantas L-AS de tal manera de obtener plantas doblemente silenciadas o a través de complementación en levaduras o bacterias sintetizadoras de carotenoides que posean mutado el gen que codifica para LCYB.

Este trabajo ha iniciado una línea de investigación que permitirá conocer la compleja regulación de la biosíntesis de carotenoides en *D. carota*, permitiendo realizar a futuro mejoramientos genéticos en esta planta que posee interesantes características fisiológicas, comerciales y nutricionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams-Phillips L, Barry C, Giovannoni J.** 2004. *Signal transduction systems regulating fruit ripening.* Trends in Plant Science. **9**: 331-338.
- Alba R, Cordonnier-Pratt M, Pratt L.** 2000. *Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato.* Plant Physiology. **123**: 363-370.
- Alquezar B, Rodrigo M, Zacarías L.** 2008. *Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara.* Phytochemistry. 69:1997-2007.
- Bartley G, Scolnik P.** 1995. *Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health.* Plant Cell **7**: 1027-1038.
- Bartley G, Scolnik P, Beyer P.** 1999. *Two Arabidopsis thaliana carotene desaturases, phytoene desaturase and ξ -carotene desaturase, expressed in Escherichia coli, catalyze a poli-cis pathway to yield pro-lycopene.* FEBS letters. **259**: 396-493.
- Bouvier F, Hugueney P, d'Harlingue A, Kuntz M, Camara B.** 1994. *Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6-epoxycarotenoid into ketocarotenoid.* Plant Journal. **6**: 45-54.
- Bouvier F, D'Harlingue A, Backhaus R, Kumagi M, Camara B.** 2000. *Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog.* FEBS **267**: 6346-6352
- Bramley P.** 2002. *Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development.* Journal of Experimental Botany **53**: 2107-2113

- Burton RA, Gibeaut DM, Bacic A, Findlay K, Roberts K, Hamilton A, Baulcombe DC, Fincher GB.** 2000. *Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene.* Plant Cell **12**: 691-706.
- Camara B, Huueney P, Bouvier F, Kuntz M, Monéger R.** 1995. *Biochemistry and molecular biology of chromoplast development.* International Review of Cytology. **163**: 175-247
- Chen W, Punja Z.** 2002. Transgenic herbicide and disease tolerant carrot (*Daucus carota L.*) plants obtained trough *Agrobacterium* –mediated transformation. Plant Cell Rep. **20**: 929-935.
- Chew B, Soon J.** 2004. *Carotenoid Action on the Immune Response.* American Society for Nutritional Sciences. 257S - 261S
- Cogdell R, Frank H.** 1987. *How carotenoids function in photosynthetic bacteria.* Biochimica et Biophysica acta. **895**: 63-79.
- Cookson P, Kiano J, Shipton C, Fraser P, Romer S, Schuch W, Bramley P, Pyke K.** 2003. *Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high pigment-1 mutant of tomato.* Planta. **217**: 896-903.
- Cooper D.** 2004. *Carotenoids in Health and Disease: Recent Scientific Evaluations, Research Recommendations and the Consumer.* American Society for Nutritional Sciences. 221S - 224S
- Conti A, Pancaldi S, Fambrini M, Michelotti V, Bonora A, Salvini M, Pugliesi C.** 2004. *A deficiency at the gene coding for ξ -carotene desaturase characterizes the sunflower non dormant-1 mutant.* Plant cell Physiology **45**: 445-455.
- Corona V, Aracci B, Kosturkova G, Bartley G, Pitto L, Giorgetti L, Scolnik P, Giuliano G.** 1996. *Regulation of carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development.* The Plant Journal. **9**: 505-512.
- Cunningham F, Gantt E.** 1998. *Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants.* Annual Review Plant Molecular Biology **49**: 557–83.

- Cunningham F, Pogson B, Sun Z, McDonald K, DellaPenna D.** 1996. *Functional analysis of the β and ϵ lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation.* The Plant Cell. **8**: 1613-1626.
- Demmig-Adams B, y Adams W.** 2002. *Antioxidants in photosynthesis and human nutrition.* Science **298**: 2149-2153
- Disch A, Hemmerlin A, Bach T, Rohmer M.** 1998. *Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells.* The Biochemical Journal. **331**: 615-621.
- Dong H, Deng Y, Mu J, Lu Q, Wang Y, Xu Y, Chu C, Chong K, Lu C, Zuo J.** 2007. *The Arabidopsis spontaneous cell death1 gene, encoding a ξ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling.* Cell Research **17**: 458-470
- Fang J, Chai C, Qian Q, Li C, Tang J, Sun L, Huang Z, Guo X, Sun C, Liu M, Zhang Y, Lu Q, Wang Y, Lu C, Han B, Chan F, Cahng Z, Chu C.** 2008. *Mutations of genes in synthesis of carotenoides precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation.* The Plant Journal. **54**: 177-189.
- Fernandes C, Senalik D, Simon P.** 2005. *Path analysis suggests phytoene accumulation is the key step limiting the carotenoid pathway in white carrot roots.* Genetics and Molecular Biology **28**: 287-293.
- Fraser P, Truesdale M, Bird C, Schuch W, Bramley P.** 1994. *Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development.* Plant Physiology. **105**: 405- 413.
- Fraser P, Kiano J, Truesdale M, Schuch W, Bramley P.** 1999. *Phytoene synthase-2 activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening.* Plant Molecular Biology. **40**: 687-698.
- Fraser P, Bramley P.** 2004. *The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids.* Progress in Lipid Research **43**: 228-265.
- Fray R, Grierson D.** 1993. *Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression.* Plant Molecular Biology. **22**: 589-602.

- Gachon C, Mingam A, Charrier B.** 2004. *Real-time PCR: What relevance to plant studies?*. Journal of Experimental Botany. **55**: 1445-1454.
- Galpaz N, Ronen G, Khalifa Z, Zamir D, Hirschberg.** 2006. *A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus.* The Plant Cell. **18**:1947-1960.
- Galpaz N, Qiang W, Menda N, Zamir D, Hirschberg J.** 2008. *Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content.* The Plant Journal **53**: 717-730
- Gelvin S.** 2000. *Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration.* Annual Review in Plant Physiology and Molecular Biology. **52**: 233-256.
- Gelvin S, Kim S.** 2007. *Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration.* Biochimica et Biophysica Acta. **1769**: 410-421.
- Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, Reich M, Buret M, Bourgaud F, Poëssel J, Caris-Veyrat C, Génard M.** 2008. *How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. **56**: 1241-1250.
- Giuliano G, Bartley G, Scolnik P.** 1993. *Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development.* The Plant Cell. **5**: 379-387
- Hamilton AJ, Brown S, Yuanhai H, Ishizuka M, Lowe A, Solis A, Grierson D.** 2002. *A transgene with repeat DNA causes high frequency, post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato.* Plant Journal **15**: 737-746.
- Hugueney P, Badillo A, Chen H, Klein A, Hirschberg J, Camara B, Kuntz M.** 1995. *Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of biosynthetic pathway in Capsicum annuum.* Plant Journal. **8**: 417-424.
- Hugueney P, Bouvier F, Badillo A, Quennemet J, d'Harlingue A, Camara B.** 1996. *Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits.* Plant Physiology. **111**: 619-626

- Ingelbrecht IL, Irvine JE, Mirkov TE.** 1999. *Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome.* Plant Physiology **119**: 1187-1198.
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J.** 2002. *Cloning of tangerine from Tomato reveal a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants.* The Plant Cell. **14**: 334-342.
- Isaacson T, Ohad I, Beyer P, Hirschberg J.** 2004. *Analysis in Vitro of the enzyme CTRISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants.* Plant Physiology. **136**: 4246-4255.
- Jayaraj J, Devlin R, Punja Z.** 2008 *Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants.* Transgenic Research **17**:489-501.
- Just BJ, Santos CAF, Fonseca MEN, Boitex LS, Olioza BB, Simon PW.** *Carotenoids biosynthesis structural genes in carrot (Daucus carota): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping.* Theory Applied Genetic **114**: 693-704.
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M.** 2004. *Accumulation of carotenoides and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit.* Plant Physiology. **134**: 824-837.
- Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J.** 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science. **5**: 1299-1302.
- Kita M, Kato M, Ban Y, Honda C, Yaegaki H, Ikoma Y, Moriguchi T.** 2007. *Carotenoid accumulation in japanese apricot (Punus mume Siebold & Zucc): Molecular análisis of carotenogenic gene expresión and ethylene regulation.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. **55**: 3414-3420.
- Krubasik P, Sandmann G.** 2000. *Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups.* Biochemical Society Transactions **28**: 9
- Laule O, Fürholz A, Chang H, Zhu T, Wang X, Heifetz P, Grisse W.** 2003. *Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in*

- Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Science of USA. **100**: 6866- 6871.
- Leung J, Giraudat J.** 1998. *Abscisic Acid Signal Transduction*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. **49**: 199-222.
- Lichtenthaler H, Schwender J, Disch A, Rohmer M.** 1997. *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway*. FEBS Letters. **400**: 271-274.
- Lindgren L, Stålberg K, Höglund A.** 2003. *Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene result in delayed germination and increased level of carotenoides, chlorophyll, and abscisic acid*. Plant Physiology. **132**: 779-785.
- Li F, Vallabhaneni R, Wurtzel L.** 2008. *PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis*. Plant Physiology. **146**: 1333-1345.
- Liu Q, Xu J, Liu Y, Zhao X, Deng X, Guo L, Gu J.** 2007. *A novel bud mutation that confers abnormal patterns of lycopene accumulation in sweet orange fruit (Citrus sinensis)*. Journal of Experimental Botany. **58**: 4161- 4171
- Lois L, Rodriguez C, Gallego F, Campos N, Boronat A.** 2000. *Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase*. The Plant Journal **22**: 503-513.
- Mauch-Mani B, Mauch F.** 2005. *The role of abscisic acid in plant-photogen interactions*. Current Opinion in Plant Biology **8**: 409-414.
- Mayne, S.** 1996. *β -carotene, carotenoids and disease prevention in humans*. FASEB Journal **10**: 690-701.
- Matthew L.** 2004. *RNAi for plant functional genomics*. Comparative and Functional Genomics. **5**: 240-244
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, Brignetti G, Baulcombe D.** 1995. *Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing*. Plant Journal **7**: 1001-1013.

- Mustilli A, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C.** 1999. *Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1.* The Plant Cell **11**: 145 -157
- Nambara E, Marion-Poll A.** 2005. *Absciscic acid biosynthesis and catabolismo.* Annual Review of Plant Biology. **56**: 165-185.
- Niyogy K.** 1999. *Photoprotection Revisted: Genetic and Molecular Approaches.* Annual Review in Plant Physiology **50**: 333-359
- Ohshima H, Iida Y, Matsuda A, Kuwabara M.** 1996. *Damage induced by hydroxyl radicals generated in the hydration layer of gamma-irradiated frozen aqueous solution of DNA.* Journal of Radiation Research. **37**: 199-207.
- Paulsen H.** 1999. *Carotenoids and the assembly of light-harvesting complexes.* Frank H, Young A, Britton G, Cogdell R (Eds). The Photochemistry of Carotenoids. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. Pp. 123-135.
- Pecker I, Gubbay R, Cunningham Jr FX, Hirshberg J.** 1996. *Cloning and characterization of the cDNA for lycopene β cyclase from tomato reveal a decrease in its expression during tomato ripening.* Plant Molecular Biology **30**: 806-819.
- Peters J, Széll M, Kendrick R.** 1998. *The expression of light-regulated genes in the High-Pigment-1 mutant of tomato.* Plant Physiology **117**:797-807.
- Pizarro L.** 2007. *Construcción de vectores para Silenciamiento Génico Post-Transcrpcional del gen de la licopeno β ciclase de D. carota.* Seminario de Titulo de Ingenieria en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Santiago. Chile.
- Punja Z.** 2001. *Transgenic carrots with enhanced tolerance to fungal pathogens.* Tissue Culture techniques in horticultural crops, Ed Torres, K. cap 35, pg503-521
- Que Q, Wang HY, English JJ, Jorgensen RA.** 1997. *The frequency and degree of co-suppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature non sense codons in the transgene coding sequence.* Plant Cell **9**: 1357-1368.
- Rascio N, Mariani O, Casadoro G.** 1984. *Etioplast-chloroplast transformation in maize leaves: Effect of tissue age and light intensity.* Protoplasma. **119**: 110-120.

- Rodrigo M, Marcos J, Alférez F, Mallent D, Zacarías L.** 2003. *Characterization of Pinelate, a novel Citrus sinensis mutante with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content.* Journal of Experimental Botany **54**: 727-738.
- Rodrigo M, Marcos J, Zacarías L.** 2004. *Biochemical and molecular analysis of carotenoid biosynthesis in flavedo of orange (Citrus sinensis L) during fruit development and maturation.* Journal of Agricultural and Food Chemistry. **52**: 6724-6731.
- Römer S, Fraser P.** 2005. *Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation.* Planta **221**: 305-308.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J.** 1999. *Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene lycopene epsilon cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant delta.* The Plant Journal. **17**: 341-351.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J.** 2000. *An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of Beta and old gold color mutations in tomato.* Proceedings of the National Academy of Science of USA. **97**: 11102-11107.
- Sambrook, J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring harbor Laboratory Press. Cap. 7 pp 7.8
- Sandmann G.** 2000. *Molecular evolution of carotenoid biosynthesis from bacteria to plants.* Physiologia Plantarum **116**: 431-440
- Scheffe J, Lehmann K, Buschmann I, Unger T.** 2006. *Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula.* Journal of molecular medicine. **84**:901-910.
- Schweizer P, Pokorny J, Schulze-Lefert P, Dudler R.** 2000. *Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals.* Plant Journal **24**: 895-903.

- Schwender J, Zeidler J, Gröner R, Müller C, Focke M, Braun S, Lichtenthaler F, Lichtenthaler H.** 1997. *Incorporation of 1- deoxy-D- xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae.* FEBS Letters. **414**:129-134.
- Simkin AJ, Zhu C, Kuntz M, Sandmann G.** 2003. *Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis in pepper (Capsicum annuum) leaves.* Journal of Plant Physiology **160**, 439-443.
- Skelton R, Yu Q, Srinivasan R, Manshardt R, Moore P, Ming R.** 2006. *Tissue differential expression of lycopene β cyclase gene in papaya.* Cell Research. 731-739
- Snodderly, D.** 1995. *Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins.* American Journal of Clinical Nutrition. **62**: 1448S-1461S.
- Susi P, Hohkuri M, Wahlroos T, Kilby N.** 2004. *Characteristics of RNA silencing in plants: similarities and differences across kingdoms.* Plant Molecular Biology. **54**: 157-174.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel D, Zamore PD.** 2003. *A biochemical framework for RNA silencing in plants.* Genes Development **17**: 49-63
- Tapiero H, Townsend D, Tew K.** 2004. *The role of carotenoids in the prevention of human pathologies.* Biomedicine & Pharmacotherapy. **58**: 100-110.
- Van Blockland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM.** 1994. *Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in Petunia hybrida results from an increase RNA turnover.* The Plant Journal **6**: 861-877
- Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC.** 1998. *Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA.* Cell **95**: 177-187.
- Vaucheret H, Béclin C, Fagard M.** 2001. *Post-transcriptional gene silencing in plants.* Journal of Cell Science. **114**: 3083-3091.
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A.** 1999. *Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid associated proteins.* Trends in Perspectives. **4**: 232-235.

- Von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleing H.** 1997. *Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of the phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in Sinapsis alba and Arabidopsis thaliana seedling.* Plant Journal. **12**: 625-635
- Wally O, Jayaraj J, Punja Z.** 2008. *Comparative expresión of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (Daucus carota L.) root and leaf tissues.* Plant Cell Reports **27**: 279-287
- Welsch R, Beyer P, Hugueney P, Kleinig H, von Lintig.** 2000. *Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis.* Planta. **211**: 1039-1057.
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, von Lintig.** 2003. *Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter for Arabidopsis thaliana.* Planta. **216**: 523-534
- Welsch R, Wüst F, Bär C, Al-Babili S, Beyer P.** 2008. *A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes.* Plant Physiology. **147**: 367-380
- Winslow R, Briggs J.** 1999. *Blue-light photoreceptors in higher plants.* Annual Review Cell Developmental Biology **15**: 33-62.
- Woitsch S, Römer S.** 2003. *Expression of xanthophylls biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation.* Plant Physiology. **132**: 1508-1517.
- Wozniak A.** 2008. *Influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes de carotenogenesis y la biosíntesis de pigmentos en Xanthophyllomyces dendrorhous.* Tesis doctoral. Universidad de Chile.
- Yadav V, Kundu S, Chattopadhyay D, Negi P, Wei N, Deng Xw, Chattopadhyay S.** 2002. *Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and downstream regulatory components, COP1 and HY5, in Arabidopsis.* The Plant Journal. **31**: 741-753.
- Young A.** 1993. *Carotenoids in Pigment-proteins Complex.* Young A, Britton G (Eds). Pp. 161-205. Carotenoids in Photosynthesis. Chapman and Hall, London.

Young A, Lowe G. 2001. *Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids.* Archives of Biochemistry and Biophysics. **385**: 20-27.

Zhang L, Yang Q, Luo X, Fang C, Zhang Q, Tang Y. 2007. *Knockout of crtB or crtI gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in Deinococcus radiodurans R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability.* Archives of Microbiology. **188**: 411- 419.