

UCHI-FC
MAG-BMCN
F632
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS GENES
z-caroteno desaturasa 1 (*zds1*) Y
z-caroteno desaturasa 2 (*zds2*) DE
Daucus carota (ZANAHORIA)**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

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

Facultad De Ciencias

Por

CARLOS ALBERTO FLORES ORTIZ

ENERO, 2010

**Director de Tesis:
Dra. CLAUDIA STANGE KLEIN**

**Co-Director de Tesis:
Dr. MICHAEL HANDFORD**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

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

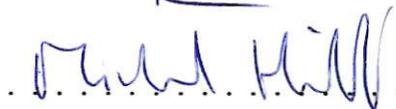
CARLOS ALBERTO FLORES ORTIZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 08 de Septiembre 2010.

Director de Tesis:
Dra. Claudia Stange K.



Co-Director de Tesis
Dr. Michael Handford



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. MADELEINE LAMBOROT C.



Dra. LILIANA CARDEMIL O







"El aumento del conocimiento depende por completo de la existencia del
desacuerdo"

Karl Popper

AGRADECIMIENTOS



Quisiera agradecer a todos aquellos que me han apoyado durante la realización de esta tesis; mi familia, amigos, compañeros y profesores del laboratorio. Su apoyo ha sido fundamental para lograr finalizar este ciclo, gracias por las palabras de consejo y la paciencia en los períodos difíciles y por compartir también los momentos de felicidad. Han hecho de mí la persona que soy tanto en lo personal como en lo profesional.

No obstante, junto con el término de este ciclo, nuevas metas y desafíos aparecen y estoy seguro de que puedo seguir contando con ustedes así como espero que ustedes cuenten conmigo.



ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de Tablas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Abreviaturas.....	vi
Resumen	vii
Abstract.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Carotenoides: función y biosíntesis.....	1
1.2 Regulación de la vía carotenogénica.....	7
1.3 <i>Daucus carota</i> como modelo de estudio.....	10
1.4 Importancia del gen <i>zds</i> en la biosíntesis de los carotenoides.....	12
1.5 Los genes <i>zds</i> en <i>D. carota</i>	14
1.6 Estrategia a utilizar.....	16
2. HIPÓTESIS.....	18
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Reactivos.....	20
4.2 Material Biológico.....	20
4.3 Cultivos.....	21
4.3.1 Cultivo de <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i>	21
4.3.2 Preparación de células quimiocompetentes.....	21
4.3.3 Transformación de células competentes.....	22
4.3.4 Cultivo, transformación y regeneración de <i>Daucus carota</i>	23
4.3.5 Cultivo, transformación y regeneración de <i>Nicotiana tabacum</i>	24
4.4 Métodos de Biología Molecular.....	26
4.4.1 Extracción de ADN de plantas.....	26
4.4.2 Purificación de ARN de plantas.....	27
4.4.3 Purificación de ADN plasmidial de <i>E. coli</i>	27



4.4.4 Digestiones enzimáticas.....	28
4.4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	28
4.4.6 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	29
4.4.7 PCR en Tiempo Real o RT-PCR cuantitativo.....	30
4.5 Determinación de la cantidad y composición de pigmentos.....	33
4.5.1 Extracción de pigmentos.....	33
4.5.2 Cuantificación de pigmentos totales mediante Espectrofotometría.....	34
4.5.3 Composición de pigmentos mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	34
4.6 Construcciones Genéticas.....	35
4.6.1 Metodología Gateway®.....	36
4.6.2 Diseño de partidores.....	39
4.6.3 Generación de la construcción pGW/z1A.....	40
4.7 Análisis de Secuencia.....	40
5. RESULTADOS.....	42
5.1 Construcciones Genéticas.....	42
5.2 Generación del vector pGW/z1A.....	44
5.3 Transformación y Obtención de Plantas Transgénicas.....	45
5.3.1 SGPT del gen <i>zds2</i> en plantas de zanahoria.....	45
5.3.2 SGPT del gen <i>zds1</i> en plantas de zanahoria.....	46
5.3.3 SGPT simultáneo de los genes <i>zds1</i> y <i>zds2</i> en plantas de zanahoria.....	48
5.3.4 Evaluación de medios de inducción suplementados con ABA.....	51
5.3.5 Sobre-expresión del gen <i>zds1</i> en plantas de tabaco.....	53
5.4 Análisis Molecular de las Plantas Transformadas.....	56
5.4.1 Zanahorias transformadas con pHG/z2.....	56
5.4.2 Zanahorias transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N.....	59
5.4.2 Tabacos transformados con pGW/z1A.....	61



5.5 Análisis de los Pigmentos de las Plantas Transgénicas.....	62
5.5.1 Zanahorias transformadas con pHG/z2.....	62
5.5.2 Tabacos transformados con pGW/z1A.....	65
5.6 Análisis de Secuencia.....	68
6. DISCUSIÓN.....	71
6.1 Secuenciación.....	71
6.2 Silenciamiento Génico de <i>zds1</i> y <i>zds2</i>	72
6.3 Sobre-expresión del gen <i>zds1</i> en <i>Nicotiana tabacum</i>	78
6.5 Función Órgano-específica de los genes y análisis de las secuencias.....	82
7. CONCLUSIONES.....	86
8. PROYECCIONES.....	88
9. BIBLIOGRAFÍA.....	89
10. AXEXO TRABAJO ADELANTADO.....	95
10.1 Construcciones Genéticas	95
10.2 Transformación de Plantas y Regeneración Estable.....	97
10.3 Análisis Molecular de las Plantas.....	98
10.4 Agradecimiento.....	99

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	Descripción de los partidores utilizados en esta tesis.....	39
TABLA 2	Resumen de las construcciones y sus características.....	43
TABLA 3	Niveles relativos de mensajero de las zanahorias transformadas con pHG/z2.....	58
TABLA 4	Niveles relativos de mensajero de zanahorias co-transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N.....	60
TABLA 5	Análisis de pigmentos de las zanahorias transformadas con pHG/z2.....	64
TABLA 6	Análisis de pigmentos de los tabacos transformados con pGW/z1A.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Esquema hipotético de la organización de las enzimas carotenogénicas.....	3
FIGURA 2	Ruta de la biosíntesis de los carotenoides en las plantas.....	6
FIGURA 3	RT-PCR en tiempo real para los genes <i>zds1</i> y <i>zds2</i> durante el desarrollo de <i>D. carota</i>	15
FIGURA 4	Esquema de la Tecnología Gateway®.....	38
FIGURA 5	Esquema de las construcciones utilizadas en este trabajo.....	43
FIGURA 6	Digestión enzimática con <i>SacI</i> de la construcción pGW/z1A.....	44
FIGURA 7	PCR colonia de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con pGW/z1A.....	45
FIGURA 8	Embriogénesis somática de <i>D. carota</i> transformada con pMD/z1N....	47
FIGURA 9	Embriogénesis somática de <i>D. carota</i> transgénicas portando pHG/z2 y transformadas con pMD/z1N.....	50
FIGURA 10	Plántulas transformadas simultáneamente con pHG/z2 y pMD/z1N...	51
FIGURA 11	Evaluación del suplemento de ABA en los distintos medios de inducción de embriogénesis.....	53
FIGURA 12	Organogénesis somática de <i>N. tabacum</i> transformado con pGW/z1A.....	55
FIGURA 13	Análisis de RT-PCR en Tiempo Real de las zanahorias transformadas con pHG/z2.....	58
FIGURA 14	Análisis de RT-PCR cuantitativo de zanahorias co-transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N.....	60
FIGURA 15	Análisis molecular de las líneas de tabaco transformados con pGW/z1A.....	61
FIGURA 16	Análisis de RT-PCR de los tabacos transformados con pGW/z1A.....	62
FIGURA 17	Análisis de HPLC de carotenoides en las zanahorias transformadas con pHG/z2.....	64
FIGURA 18	Análisis de HPLC de carotenoides en los tabacos transformados con pGW/z1A.....	67
FIGURA 19	Alineamiento múltiple de secuencias.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	: Ácido Abscísico
Bret	: Bromuro de Etidio
CaMV	: Virus del Mosaico de la Coliflor (<i>Cauliflower mosaic virus</i>)
DEPC	: DIETILPIROCARBONATO
HPLC	: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LB	: Luria-Bertani
MS	: Murashige y Skoog
<i>nptII</i>	: Neomicina Fosfotransferasa II
NTR	: Región No Traducible
pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	: Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa
SGPT	: Silenciamiento Génico Postranscripcional
wt	: Silvestre

RESUMEN

Los carotenoides son pigmentos sintetizados por plantas, algas y algunas levaduras y bacterias. En plantas, estas moléculas cumplen importantes funciones en la fisiología de la planta asociados a la fotosíntesis, y foto-protección. Además, sirven como precursores de importantes compuestos como la hormona ácido abscísico (ABA).

La ruta de biosíntesis de los carotenoides ha sido ampliamente estudiada, describiéndose los genes y enzimas involucrados en el proceso en plantas. Sin embargo, los aspectos regulatorios que subyacen a la vía, no han sido completamente dilucidados. La luz es uno de los agentes reguladores más estudiados, y se ha reportado que éste aumenta los niveles de transcrito de los genes carotenogénicos. Otro mecanismo regulador se ha reportado en casos donde más de un gen codifica para enzimas con igual actividad. En estos casos, la expresión de los genes carotenogénicos está asociada con un órgano específico (hojas o frutos).

Daucus carota, al igual que otras plantas, posee algunos genes carotenogénicos duplicados. No obstante, a diferencia de los otros modelos, es la única planta en la que se ha identificado dos genes z-caroteno desaturasa (*zds*), denominados *zds1* (DQ222430) y *zds2* (DQ192189).

Considerando este evento de duplicación, sumado a la síntesis de carotenoides en los contextos de luz (hojas) y oscuridad (raíz modificada) y

diferencias en la expresión de estos genes durante el desarrollo de la planta, se evaluó la hipótesis de que los genes *zds1* y *zds2* en *D. carota* poseen una función órgano-específica.

Nuestros resultados muestran que al silenciar el gen *zds2*, no se alteran los niveles de mensajero para *zds1* y fitoeno sintasa (*psy2*), mientras que los niveles de transcrito de *psy1* aumentan significativamente. Sin embargo, en las plantas con Silenciamiento Génico Post-transcripcional (SGPT) de *zds2* no se afectó la composición y cantidad de pigmentos en las hojas ni en las raíces. Por otra parte, obtener plantas con niveles reducidos de mensajeros de *zds1* fue prácticamente imposible. Sólo se obtuvo 2 plantas dobles silenciadas cuyo fenotipo anormal se correlacionó con la disminución en los niveles de mensajeros para *zds1*, *zds2* y *psy2*. Además, se comprobó la funcionalidad del gen *zds1* de *D. carota*, mediante su sobre-expresión en plantas de *Nicotiana tabacum*. En estas plantas transgénicas se midió un aumento en los niveles de carotenoides.

Estos resultados posicionan al gen *zds1* como el gen responsable de la función z-caroteno desaturasa en *D. carota* y su función estaría asociada a la síntesis de carotenoides en toda la planta, descartando la posibilidad de un sistema de expresión órgano-específico para estos genes. Además, dado que *zds2* no compensa la disminución en los niveles de *zds1*, sugerimos que *zds2* no sería funcional en *D. carota*.

ABSTRACT

Carotenoids are pigments synthesized by plants, algae and by some yeasts and bacteria. In plants, these molecules play important roles in plant physiology related with photosynthesis and photo-protection. Furthermore, carotenoids are precursors of important compounds, such as the hormone, abscisic acid (ABA).

The carotenogenic pathway has been widely studied and genes and enzymes involved in this process have been described and characterized in plants. However, the regulatory mechanisms that underlie this pathway have not been elucidated. Light is one of the most-studied regulatory factors, which leads to an up-regulation in transcript levels of carotenogenic genes. Also, more than one gene encoding for enzymes with the same activity has been described as a regulatory mechanism. In these cases, the carotenogenic gene expression is associated with a specific organ (leaves or fruits).

Daucus carota, like other plants, has some duplicated carotenogenic genes. However, unlike other models, it is the only plant in which two z-carotene desaturase genes (*zds*) have been described, termed *zds1* (DQ222430) and *zds2* (DQ192189). Considering this gene duplication event, the fact that carrot synthesizes carotenoids in light (leaves) and dark (modified root) conditions and

that differences in *zds* gene expression have been reported during plant development, the hypothesis of an organ-specific function of *zds1* and *zds2* in *D. carota* was evaluated.

Our results show that in *zds2*-silenced plants, *zds1* and phytoene synthase (*psy2*) mRNA levels do not change, while *psy1* mRNA levels increase significantly. Nevertheless, in *zds2*-silenced plants, the pigment quantity and composition was not affected in either leaves or roots. However, plants with silenced *zds1* gene expression levels were nearly impossible to obtain. Only two double-silenced seedlings were obtained and their aberrant phenotypes were correlated with the decrease in transcript levels of *zds1*, *zds2* and *psy2*. In addition, the *zds1* gene function was corroborated by means of overexpression in *Nicotiana tabacum* plants. An increase in carotenoid levels was measured in the transgenic plants.

These results suggest that *zds1* is the functional gene that performs the desaturation of z-carotene in *D. carota*, and this function could be associated with carotenoid biosynthesis in the whole plant, rejecting an organ-specific function of these genes. Since the *zds2* gene cannot compensate for decreased *zds1* transcript levels, we suggest that *zds2* is a non-functional gene in *D. carota*.

INTRODUCCIÓN

1.1 Carotenoides: función y biosíntesis

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides con un esqueleto de 40 carbonos altamente insaturado sintetizados por plantas y ciertas algas, hongos y bacterias (Hirschberg y col., 1997). Los carotenoides se dividen en dos grupos: los carotenos, con cadenas hidrocarbonadas sin sustituir y las xantofilas, que en sus anillos contienen átomos de oxígeno.

En los organismos fotosintéticos, los carotenoides poseen importantes funciones tales como:

i) Participar en la foto-protección, proceso que previene ya sea del daño oxidativo causado por especies reactivas del oxígeno o aquel generado por el triplete de la clorofila en el centro de reacción del fotosistema II.

ii) Disipar el exceso de energía térmica a través del ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 2002; Telfer, 2005; Niyogi, 1999).

iii) En cloroplastos funcionan como pigmentos accesorios de la fotosíntesis, ampliando las longitudes de onda captadas por la clorofila a y b en el centro de reacción del fotosistema II asociado a los complejos captadores de luz (Light harvesting complex, LHC; Britton, 1995; Demming-Adams y col., 1996).

iv) En el caso particular de las plantas, los carotenoides son también precursores para la síntesis del ácido abscísico (ABA), una relevante hormona vegetal involucrada con los procesos de dormancia de semillas, apertura y cierre de estomas y respuesta al estrés abiótico, entre otros (Milborrow, 2001).

v) Además, algunos apocarotenoides, carotenoides con un esqueleto de menos de 40 carbonos, están involucrados en la formación de micorrizas, las cuales favorecen la captación de nutrientes del suelo, lo que tiene un impacto positivo en el crecimiento de la planta (Walter y col., 2010).

vi) Dependiendo del grado de insaturaciones en el esqueleto del carotenoide, éste puede presentar diversas tonalidades entre el amarillo, rojo y anaranjado. Este colorido se traduce en funciones como la atracción de polinizadores o la selección preferencial por un compañero sexual y la acción de agentes encargados de la dispersión de semillas (Baron y col., 2008, Bramley, 2002; Bartley y Scolnik, 1995).

vii) En animales y por lo tanto en humanos, los carotenoides también cumplen importantes funciones, pero estos organismos deben obtenerlos directamente de la dieta ya que no los pueden sintetizar. Los carotenoides son precursores del retinol (vitamina A), el cual participa en el proceso de la visión (por ejemplo, evitando la degeneración de mácula) y cumple funciones de señalización durante el desarrollo. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, han sido vinculados a la protección frente a ciertos tipos de cáncer y el envejecimiento (von Lintig 2010; Tafti y Ghyselinck, 2007; Fraser y Bramley 2004; Handelman, 2001).

En cuanto a la organización de los genes que codifican para las enzimas carotenogénicas, se sabe que en las plantas, éstos se ubican en el núcleo de la célula, sin embargo, la biosíntesis de los carotenoides se realiza en los plastidios, tales como, cloroplastos, cromoplastos y amiloplastos. Por lo tanto, las proteínas sintetizadas son destinadas a los plastidios, generalmente agrupados en complejos multienzimáticos para ejercer su actividad. Se ha propuesto que las enzimas IPP isomerasa (IPI), geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPPS) y la fitoeno sintasa (PSY) se agrupan en un complejo enzimático en el estroma del cloroplasto (Figura 1). En cambio, las enzimas fitoeno desaturasa (PDS), caroteno isomerasa (CRTISO), z-caroteno desaturasa (ZDS), licopeno β -ciclasa (LCYB) y licopeno ϵ -ciclasa (LCYE) conforman un complejo multienzimático en la membrana del tilacoide (Figura 1) (Bonk y col., 1997; Cunningham y Grantt, 1998).

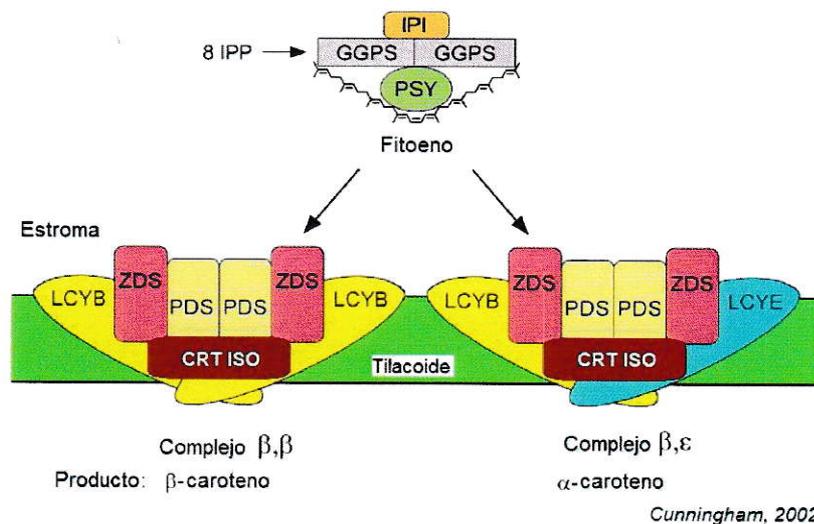


Figura 1. Esquema hipotético de la organización de las enzimas carotenogénicas. Las enzimas formarían complejos multienzimáticos tanto en el estroma como en las membranas del plastidio.

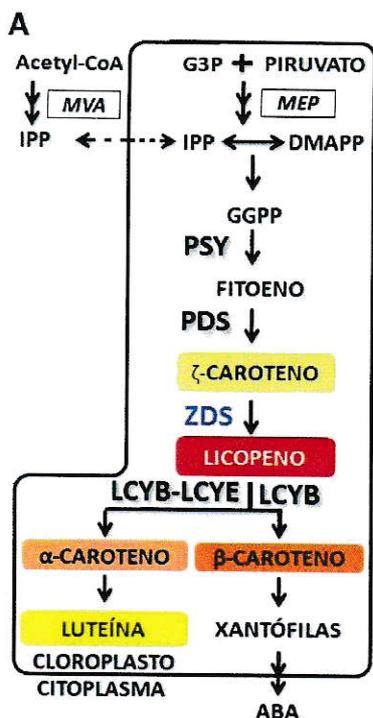
Todos los isoprenoides tienen como precursor la molécula de isopentenil pirofosfato (IPP). En plantas, éste puede ser sintetizado mediante dos vías, la vía del ácido mevalónico (MVA) y la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP), siendo esta última, la que se localiza en los plastidios (y por lo tanto, responsable de la producción de carotenoides en cloroplastos y cromoplastos). En la vía MEP, el IPP es sintetizado a partir de gliceraldehído 3-fosfato y piruvato (Figura 2A) (Rodríguez-Villalón y col., 2009) y aunque se sabe que existe en algún grado intercambio entre el IPP citosólico y el plastidial, no se conoce en detalle esta relación.

Una vez formado el IPP, éste es isomerizado a dimetilalil pirofosfato (DMAPP) mediante la enzima IPP isomerasa (IPI). Posteriormente, se condensan tres moléculas de IPP con una de DMAPP para generar una molécula de 20 carbonos (C₂₀) denominada geranilgeranil pirofosfato (GGPP) mediante la enzima GGPP sintasa (GGPPS) (Figura 2A). Luego, por una unión “cola-cola” de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato, se sintetiza un esqueleto de 40 carbonos, precursor de todos los carotenoides (Britton, 1995). Este compuesto incoloro de 40 carbonos es el fitoeno (Figura 2A), sintetizado por la enzima fitoeno sintasa (PSY) y corresponde a la primera reacción específica de la síntesis de carotenoides. Luego, el fitoeno sufre 4 desaturaciones y dos isomerizaciones antes de convertirse en licopeno. Las desaturaciones que se producen sobre el fitoeno generan compuestos coloreados que van del amarillo pálido en el z-caroteno, hasta el rojo en el

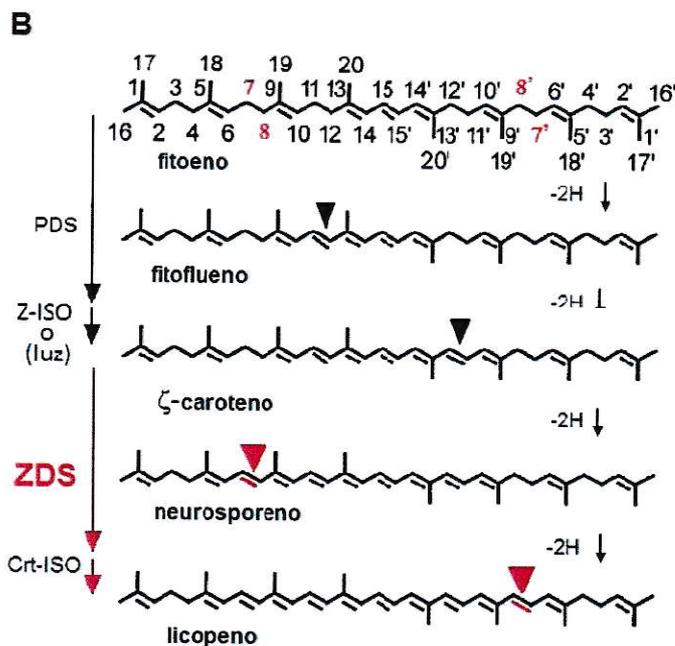
licopeno (Figura 2A y 2B). La primera desaturación la lleva a cabo la enzima fitoeno desaturasa (PDS), seguida de la primera isomerización realizada por la recientemente descrita z-caroteno isomerasa (Z-ISO), cuya actividad puede ser suplida por acción de la luz (Chen y col., 2010). Posteriormente, la enzima encargada de la segunda desaturación es la z-caroteno desaturasa (ZDS) (Figura 2B), seguida por la caroteno isomerasa CRTISO (Li y col., 2007).

Posteriormente, el licopeno es ciclado para formar α y β -caroteno. La enzima licopeno β -ciclasa (LCYB) participa en la formación del β -caroteno, mientras que para producir α -caroteno se requiere la licopeno β -ciclasa y la enzima licopeno ϵ -ciclasa (LCYE). Luego, el α -caroteno es hidroxilado en su anillo- β por la caroteno β -hidroxilasa y en su anillo- ϵ por la caroteno ϵ -hidroxilasa, para sintetizar luteína, el carotenoide más abundante en las flores amarillas. Por su parte el β -caroteno es hidroxilado para producir zeaxantina, la cual participa en el ciclo de las xantofilas, mencionado previamente (Figura 2A) (Cunningham y Grantt, 1998).

Las etapas sucesivas a la formación de zeaxantina, conducen a la síntesis del ácido abscísico (ABA). Primero se sintetiza un isómero de la zeaxantina denominado violaxantina. Luego, mediante una serie de reacciones, se sintetiza neoxantina, este compuesto es escindido para formar xantoxina, una molécula de 15 átomos de carbono, precursor del ABA, y que sería presumiblemente el compuesto que migra desde el plastidio al citosol mediante un mecanismo aún desconocido (Nambara y Marion-Poll, 2005).



Modificado de Rodríguez-Villalón y col, 2009



Modificado de Cunninham y Gantt, 1998

Figura 2. Ruta de la biosíntesis de los carotenoides en las plantas. A) Diagrama simplificado de la ruta de biosíntesis de carotenoides en las plantas. MVA, ácido mevalónico; MEP, metileritritol; G3P, gliceraldehído 3-fosfato; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, z-caroteno desaturasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; ABA, ácido abscísico. B) Desaturaciones consecutivas desde fitoeno hasta la síntesis de β-caroteno. Z-ISO, Z-Isomerasa; Crt-ISO, Caroteno Isomerasa. Las dos primeras desaturaciones las realiza la enzima fitoeno desaturasa y las dos segundas (7-8 y 7'-8') la enzima z-caroteno desaturasa. Las desaturaciones se indican por los triángulos invertidos. Además se muestra la convención para la numeración de los carbonos del fitoeno.

1.2 Regulación de la vía carotenogénica

Como se describió en el punto anterior, los genes y las enzimas que participan en la ruta se conocen con bastante detalle, no obstante, los aspectos de la regulación que subyacen a ésta son en su mayoría desconocidos. Determinar y conocer los aspectos regulatorios de la biosíntesis de carotenoides permitirán manipular exitosamente la ruta con fines biotecnológicos. Es por esto, que en los últimos años se han realizado contribuciones que aportan a esclarecer la regulación en diversos modelos vegetales como *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez-Villalón y col., 2009), zanahoria (Mass y col., 2009), naranja (Alquézar y col., 2009) y tomate (Bramley, 2002), entre otros.

Entre los reguladores de la vía carotenogénica más estudiados, se encuentra la luz. Así, la luz captada por los fotoreceptores fitocromos y criptocromos, ejerce una regulación positiva sobre la expresión de estos genes (von Lintig y col., 1997; Schofield y Paliyath, 2005; Pizarro y Stange, 2009; Rodríguez-Villalón A y col., 2009). Por ejemplo, en *A. thaliana* y la planta de mostaza *Sinapsis alba*, se demostró que los niveles de expresión del gen que codifica para *PSY* aumentan por efecto de la luz (von Lintig y col., 1997). En plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) expuestas a condiciones de luz, también se ha reportado un aumento de los transcritos de los genes carotenogénicos β -caroteno hidroxilasa (*bhy*), zeaxantina epoxidasa (*zep*) y violaxantina de-epoxidasa (*vde*) (Woitsch y Römer, 2003). Análisis más exhaustivos, basados en los estudios del promotor, han demostrado que el gen de fitoeno sintasa

(*psy*), posee elementos de respuesta a luz (Welsch y col., 2003). La misma activación se reporta por efecto de la luz en el caso de IPI de maíz (Albrecht y Sandmann, 1994) y en los niveles de transcrito de *lcy-β* en tomate (Hirschberg 2001).

Otro factor en el que se ha puesto énfasis, por su potencial rol en la regulación de la síntesis de carotenoides, es el desarrollo de la planta. Se ha reportado que la síntesis de carotenoides aumenta durante el desarrollo floral (Zhu y col., 2003), la maduración de los frutos (transición de cloroplastos a cromoplastos) (Bramley, 2002) y en el proceso de diferenciación de los cloroplastos en las hojas, proceso que también es inducido por luz (Woitsch y Römer, 2003).

Un tercer aspecto que se relaciona con la regulación de la vía, corresponde a los casos en donde se ha reportado que dos o más genes codifican para enzimas con la misma actividad. En *A. thaliana*, existe una sola copia de cada gen carotenogénico que codifica para las enzimas de la ruta, con la excepción de las enzimas GGPS, IPI y caroteno-β hidroxilasa para las cuales existen 11, 2 y 2 genes respectivamente (Cunningham, 2002).

En tomate (*Solanum lycopersicum*), también se ha reportado más de un gen carotenogénico que codifica para enzimas con la misma actividad. En este caso, el paso de licopeno a β-caroteno es llevado a cabo por dos enzimas LCYB dependiendo del órgano que sintetice el pigmento. Es así como existe una enzima específica de cloroplastos (hojas) llamada LCYB y otra específica de cromoplastos (frutos) denominada CYC-B (Ronen y col., 2000). Además, se

ha reportado dos genes que codifican para enzimas con actividad *PSY*, el gen *psy1*, que es inducido principalmente en pétalos y durante la maduración del fruto (Welsch y col., 2000; Giorio y col., 2008) y *psy2*, activo principalmente en las hojas maduras (tejido fotosintético) (Bartley y Scolnik, 1993; Giorio y col., 2008). En plantas de naranja (*Citrus sinensis*), también se han reportado dos enzimas licopeno β -ciclasas, *Cs β -LCY1* y *Cs β -LCY2*. Esta última, posee una expresión específica en cromoplastos y una marcada inducción en la pulpa y la piel del fruto (Alquezar y col., 2009).

De manera muy similar al caso anterior, en plantas de papaya (*Carica papaya L.*), recientemente se han reportado dos genes que codifican para enzimas licopeno β -ciclasas (*lcy- β 1* y *lcy- β 2*). Se detectó una mutación en el gen *lcy- β 2* que genera una enzima inactiva, lo que impide la conversión de licopeno en β -caroteno específicamente en el fruto. Esto se traduce en una variedad de papaya cuya pulpa es roja y, por otro lado una variedad con ambas enzimas activas, cuya pulpa es amarilla. Además, la expresión de *lcy- β 2*, a diferencia de *lcy- β 1*, está fuertemente inducida durante la maduración del fruto (Devitt y col., 2010).

Otro ejemplo se ha reportado en maíz (*Zea mays*) donde existen tres genes *psy* parálogos. Aunque aún se desconoce la regulación subyacente, se ha descrito que la acumulación de carotenoides en el endosperma de maíz se correlaciona con los niveles de mensajero de *psy1*, pero no de *psy2* o *psy3*. Además se encontró que *PSY1* es necesaria para la carotenogénesis en ausencia de luz en tejido fotosintético y para la tolerancia a estrés. Además, en

hojas, la expresión de *psy1* es un proceso no foto-regulado a diferencia de *psy2* que sí se encuentra regulado por la luz (Li y col., 2008).

Finalmente, otro aspecto que se ha descrito como relevante en la regulación de la biosíntesis de los carotenoides, es la vía mediante la cual se genera el precursor de isoprenoides IPP, por la vía MEP. Se ha descrito un mecanismo de retroalimentación positiva entre la enzima *PSY* y la enzima 1-deoxi-D-xilulosa-5 fosfato sintasa (*DXS* involucrada en la síntesis de IPP), asociado a condiciones de oscuridad (Rodríguez-Villalón y col., 2009).

1.3 *Daucus carota* como modelo de estudio

D. carota (zanahoria) es una planta que produce elevados niveles de carotenoides (aproximadamente 0,394 mg/g de peso fresco), en especial β -caroteno en la raíz de reserva (Jayaraj y col., 2008). Además, la zanahoria sintetiza carotenoides tanto en hojas, que están expuestas a la luz, como en su raíz de reserva, que se desarrolla en oscuridad. Considerando los antecedentes expuestos previamente, la luz tiene un rol activador de la expresión de genes carotenogénicos en hojas, flores y frutos. Sin embargo, se desconocen los mecanismos regulatorios de la síntesis de carotenoides en órganos como la raíz de reserva de la zanahoria. Es por esto que en nuestro grupo de trabajo se ha comenzado a realizar las primeras aproximaciones para responder estas preguntas (Stange y col., 2008).

Actualmente en la base de datos del NCBI están anotadas las secuencias de la mayoría de los genes que codificarían para las enzimas de la ruta de los carotenoides en *D. carota* como: isopentenil isomerasa (IPI), geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS) 1 y 2, fitoeno sintasa (PSY) 1 y 2, carotenoide isomerasa (CRTISO), fitoeno desaturasa (PDS), z-caroteno desaturasa (ZDS) 1 y 2, licopeno β -ciclasa (LCYB) 1 y 2, licopeno ϵ -ciclasa (LCYE), entre otras (Just y col., 2007). Estas secuencias de ADNc han permitido comenzar los estudios carotenogénicos en zanahoria.

En el grupo de laboratorio de la Dra. Stange, se evaluó el efecto que tienen el desarrollo y la luz, en los niveles de ARN mensajeros de algunos genes de la ruta carotenogénica, tanto en hojas como en la raíz modificada de plantas de zanahoria. Así, se determinó que el grado de desarrollo va acompañado de la acumulación de los mensajeros de la mayoría de los genes en la raíz de zanahoria crecida en condiciones normales (oscuridad). En hojas, crecidas en condiciones normales, expuestas a luz (foto-período 16h), la mayoría de los genes también aumentan su nivel de abundancia relativa durante etapas tardías del desarrollo (Fuentes 2009).

Otro grupo en Francia, ha reportado la expresión diferencial de algunos de estos genes durante el desarrollo entre las variedades de zanahorias blancas, amarillas, naranjas y rojas (Clotault y col., 2008). En este estudio se observó que en las variedades coloreadas, existe una correlación entre la expresión de los genes carotenogénicos y la cantidad de pigmento acumulado en la raíz. No obstante, en la variedad de zanahoria blanca, contrario a lo

esperado, los genes se están expresando pero no hay acumulación de pigmentos. Esto podría estar indicando la existencia de regulaciones post-transcripcionales o simplemente deficiencias en la traducción de las enzimas carotenogénicas.

1.4 Importancia del gen *zds* en la biosíntesis de los carotenoides

La enzima ZDS en plantas es requerida para la desaturación del z-caroteno a neurosporeno y licopeno (Figura 2B) y, mutaciones en dicho gen o defectos en la actividad ZDS, causan alteraciones fisiológicas graves. Entre las mutantes descritas que se atribuyen a defectos para este gen o para la enzima, se encuentran trabajos con naranjas (Rodrigo y col., 2003), girasol (*Helianthus annuus* L) (Conti y col., 2004), *A. thaliana* (Dong y col., 2007), maíz (Matthews y col., 2003) y cianobacterias (Bautista y col., 2005).

En naranjas, se describió un mutante denominada *Pinalate*, la cual presenta frutos de color amarillo, en vez del color anaranjado. Este fenotipo se debe a una acumulación de z-caroteno, que refleja la ausencia de actividad z-caroteno desaturasa. Esta mutación solo afecta a los frutos, ya que en hojas los niveles de carotenoides son normales. Además, dado que el ABA es uno de los productos finales de la ruta de biosíntesis de carotenoides, las naranjas *Pinalate* tuvieron reducidos niveles de ABA solo asociado a los frutos (Rodrigo y col., 2003).

La mutante *non dormant-1* (*nd-1*) en las plantas de girasol presenta una gran alteración en el locus del gen *zds*, lo que genera, plantas viables sólo en

condiciones de luz tenue. Además, posee una gran acumulación de z-caroteno, y un fenotipo vivíparo (semillas que germinan antes de tiempo) (Conti y col., 2004).

Las mutantes *spc1* de *A. thaliana* presentan un fenotipo de muerte celular espontánea con dos variaciones alélicas. La primera, denominada *spc1-1* es la variante débil que presenta un blanqueamiento de las hojas, acumulación de superóxido y un mosaico de muerte celular. La segunda, denominada *spc1-2* es una variante fuerte y causa una detención completa del desarrollo luego de la germinación, por lo que se trata de un fenotipo letal. Además, esta mutante genera un(a): desarrollo anormal de cloroplastos; baja fotoprotección; nivel reducido de actividad del fotosistema II; deficiencias de ABA e insuficiente señalización retrógrada (plastidio-núcleo) causada por la pérdida de función de la enzima ZDS (Dong y col., 2007).

Finalmente, Bautista y col. reportan una cianobacteria con el gen *zds* mutado que presenta gran fotosensibilidad, por lo que solo crece en condiciones de poca luz, lo que merma su crecimiento.

En base a todos estos antecedentes queda de manifiesto la importancia del gen *zds*, ya que las deficiencias en la biosíntesis de los carotenoides repercuten en los procesos fisiológicos y metabólicos como por ejemplo el desarrollo y la fotosensibilidad.

1.5 Los genes *zds* en *D. carota*.

Es interesante destacar que en zanahoria, al igual que en tomate se han descrito dos genes para *psy* (*psy1* y *psy2*) y para *lcyb* (*lcyb* y *lcyb2* o *ccs*), pero a diferencia de los otros modelos, *D. carota* es la única planta en la que se han identificado dos genes z-caroteno desaturasa (*zds*), *zds1* (DQ222430) y *zds2* (DQ192189) (Just y col., 2007). La secuencia anotada para *zds1* posee 2078 pb, de los cuales 1722 pb corresponden a la región codificante. Para *zds2*, la secuencia anotada es de 2038 pb y su región codificante consta de 1728 pb. Estos genes poseen en la región codificante un 88% de identidad nucleotídica y un 91% de identidad aminoacídica. En las regiones 5' NTR y 3' NTR la identidad nucleotídica es de 24 y 53% respectivamente.

Proponemos que la existencia de dos genes *zds*, respondería al hecho de que esta hortaliza sintetiza carotenoides en contextos completamente distintos. Por una parte en sus hojas, expuestas a la luz (foto-período 16h luz) y por otra parte, en su raíz de reserva, en condiciones de oscuridad. Bajo este punto de vista, se justificarían dos genes que codifiquen para enzimas con la misma actividad pero que permitan una regulación diferencial u órgano-específica (tejido fotosintético o raíz de reserva). En nuestro laboratorio se han realizado ensayos de expresión mediante RT-PCR en tiempo real, determinando que tanto *zds1* como *zds2* aumentan su expresión durante el desarrollo de hojas y raíz modificada, y que *zds2* tiene una expresión dos veces superior a *zds1* en la raíz de reserva (Figura 3) (Fuentes, 2009). Estos antecedentes apoyarían nuestra proposición.

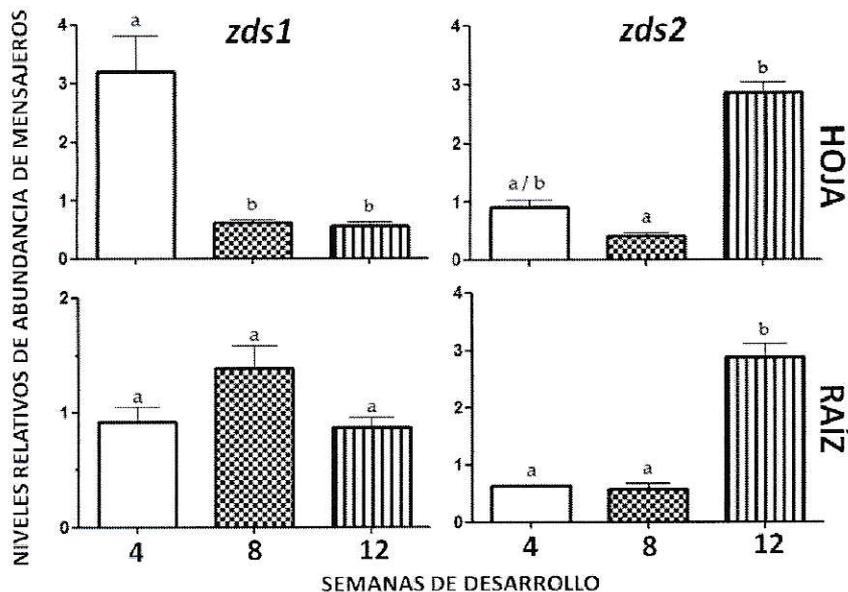


Figura 3. RT-PCR en tiempo real para los genes *zds1* y *zds2* durante el desarrollo de *D. carota*. Se utilizaron zanahorias crecidas en condiciones normales de raíz en oscuridad y hoja en condiciones de foto-período (16h luz). El calibrador utilizado en cada gráfico corresponde al promedio de las réplicas obtenidas en los tres estados de desarrollo. Se utilizó como calibrar el gen de ubiquitina y las distintas letras indican diferencias significativas entre las muestras (Fuentes, 2009).

Además, la luz produce un efecto sobre la expresión de ambos genes en zanahoria, observando que los niveles de mensajero de *zds1* aumentan en una raíz desarrollada en presencia de luz, mientras que los transcritos para *zds2* disminuyen respecto a una raíz de reserva crecida en oscuridad (Stange y col., 2008). Estos antecedentes indican que ambos genes se expresan diferencialmente pero no nos informan sobre la importancia de los mismos en la planta.

Es por ello, que en esta tesis se estudió la función *in vivo* de los genes *zds1* y *zds2* en la biosíntesis de β -caroteno en *D. carota*.

1.6 Estrategia a utilizar

Para estudiar la función de los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota*, se decidió gatillar el silenciamiento génico post-transcripcional (SGPT) de estos genes en plantas de *D. carota* transformadas establemente. En una primera instancia se optó por la estrategia del SGPT que se detalla en el seminario de título previo a este trabajo (Flores, 2009). Este es un mecanismo molecular de degradación de una población de ARN específicos que no afecta directamente la traducción, y cuya acción se correlaciona con una disminución en los niveles de las proteínas correspondientes (Baulcombe, 2004). Esto permite obtener fenotipos que de otra manera, por ejemplo estrategias de *knock out*, podrían ser letales.

La estrategia de SGPT también ha sido usada para estudios de genes carotenogénicos en diversas plantas. Por ejemplo, en tomate se determinó que la enzima PSY2 no contribuye a la síntesis de los carotenoides en la maduración del fruto (Fraser y col., 1999) y que la licopeno b-ciclasa 2 (CYCB), tiene función fruto específica (Ronen y col., 2000).

En zanahoria, esta estrategia ya fue aplicada para estudiar la función de los genes licopeno β -ciclasa 1 y 2 (*lcyb1* y *lcyb2*) (Pizarro L, 2008 y Ocarez N, 2010), determinando que *lcyb1* y *lcyb2* son relevantes para la síntesis de β -caroteno en toda la planta.

En base a estos antecedentes, se decidió utilizar esta estrategia para evaluar la importancia de *zds1* y *zds2* en *D. carota*.

Durante el transcurso del trabajo y en vista de los resultados obtenidos para el SGPT de *zds2*, sumado a las dificultades para gatillar el SGPT de *zds1*, se decidió además generar líneas de tabaco transformadas establemente con una construcción para sobre-expresar el gen *zds1* de *D. carota*. Esto, con el objetivo de comprobar la función z-caroteno desaturasa del gen *zds1*. Asimismo, la sobre-expresión de genes carotenogénicos en plantas de tabaco, ha sido reportada en varios trabajos (Gerjets y col., 2007; Zhu y col., 2007; Kumagai y col. 1998), lo que deja de manifiesto que esta estrategia es apropiada para cumplir con el objetivo anteriormente mencionado.

HIPÓTESIS

Dado los siguientes antecedentes concernientes a:

- Que, *Daucus carota* sintetiza elevados niveles de carotenoides en sus hojas, expuestas a la luz, y en su raíz de reserva crecida exclusivamente en oscuridad.

- Que en otras plantas, donde existe más de un gen que codifica para enzimas con una misma actividad enzimática, se ha descrito que esta función está asociada a un órgano en particular (hojas o frutos).

- El hecho de que *Daucus carota* es la única planta donde se han reportado dos genes *zds* (*zds1* y *zds2*) y, además estos genes se expresan de forma diferencial en las hojas y la raíz de reserva durante el desarrollo de la planta.

Proponemos como hipótesis:

“Los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota* son requeridos para la síntesis de carotenoides en la planta y la función génica de cada uno de ellos estaría asociada preferentemente a un órgano en particular (hojas o raíz de reserva).”

Hipótesis alternativa:

“Los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota* son requeridos para la síntesis de carotenoides en la planta sin que su función este asociada preferentemente a un órgano en particular.”

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Estudiar la función *in vivo* de los genes *zds1* y *zds2* de *Daucus carota*.

3.2 Objetivos específicos

- Generar una construcción para la sobre-expresión del gen *zds1*.
- Obtener plantas transgénicas de *D. carota* con SGPT para el gen *zds1* y para los genes *zds1* y *zds2* simultáneamente.
- Obtener plantas de *N. tabacum* transgénicas con la construcción para la sobre-expresión de *zds1*.
- Realizar los análisis moleculares de las líneas transgénicas obtenidas tanto en zanahoria (silenciadas) como en tabaco (sobre-expresados).
- Analizar la cantidad y composición de pigmentos, mediante espectrofotometría y HPLC, de las líneas transgénicas obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Se utilizaron reactivos de calidad apropiada para las técnicas de biología molecular empleadas como Merck, Invitrogen, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Sigma-Aldrich, Phyto Technology Laboratories y Omega Bio-tek.

4.2 Material Biológico

Se utilizó *Daucus carota* de la variedad *Nantes* y *Nicotiana tabacum* del cultivar *Xanthi NN*.

Genotipo de la cepa de *Escherichia coli* DH5 α : F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ -.

Genotipo de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101: C58, plásmido Ti curado, Gen^R, Rif^R.

4.3 Cultivos

4.3.1 Cultivo de *E. coli* y *A. tumefaciens*

Los cultivos de *E. coli* DH5 α se creció ya sea en medio líquido LB (1% (p/v) de triptona, 0.8%(p/v) de NaCl, 0,5%(p/v) de extracto de levadura), con una agitación de 200 rpm., o bien, en medio sólido LB (LB líquido más agar (p/v) 1.6%) en placa de Petri durante 16 horas a 37°C. Tanto para el cultivo líquido como para el sólido, se agregó una alícuota del antibiótico correspondiente a la resistencia del vector.

Para el crecimiento de *A. tumefaciens*, se utilizó el medio LB líquido y sólido con los antibióticos rifampicina 10mg/L para la selección cromosómica y gentamicina 50mg/L para la selección del plásmido Ti, además de otro antibiótico correspondiente para la selección del plásmido de interés. La bacteria en cultivo líquido se creció durante 18 horas, con una agitación de 200 rpm, mientras que el cultivo sólido se creció por 48 horas, ambos a una temperatura de 28°C. De todos los cultivos líquidos se guardó en glicerol al 35% y a -80°C.

4.3.2 Preparación de células quimiocompetentes

Un cultivo saturado de *E. coli* DH5 α se creció hasta una D.O.₆₀₀ = 0,4. Este cultivo se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 1600 X g, para luego resuspenderlo en 10 mL de CaCl₂ 0.1M. Posteriormente, se volvió a centrifugar, esta vez a 4°C por 5 minutos a 1100 X g y el precipitado se resuspendió en 10

mL de CaCl_2 0.1M. Finalmente, se incubaron las células a 4°C durante 30 minutos antes de guardar las alícuotas en glicerol 35% a -80°C.

Para el caso de *A. tumefaciens*, un cultivo saturado se creció hasta una $\text{D.O.}_{600} = 0,5$. Se mantuvo a las células en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 3000 X g, para posteriormente resuspenderlas en 1 mL de CaCl_2 20 mM. Finalmente, las alícuotas se congelaron con nitrógeno líquido para ser almacenadas a -80°C hasta su utilización.

4.3.3 Transformación de células competentes

Para la transformación tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens*, se utilizó la estrategia del “golpe térmico”.

Para el caso de *E. coli*, se mezcló una alícuota de 100 μl de bacterias competentes, con la reacción de ligación de interés y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se aplicó el golpe térmico (42°C durante 1,5 minutos y luego se depositó en hielo por 1 minuto). A continuación, se agregó 1 mL de LB líquido y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C. Luego, se centrifuga el cultivo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en el volumen remanente. Finalmente, la mezcla de transformación se cultivó en placas Petri con medio LB sólido con los antibióticos adecuados para la selección (Tabla 2) y la placa se incubó a 37°C toda la noche.

Para la transformación de *A. tumefaciens* se descongeló en hielo una alícuota de 100 μl de células de *A. tumefaciens* competentes y se mezcló con

300 a 500 ng de la construcción a transformar. Luego, se realizó el golpe térmico incubando la mezcla en nitrógeno líquido durante 5 minutos. Posteriormente, se descongeló a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se cultivó en agitación en medio LB líquido con agitación a 28°C durante toda la noche. Finalmente, las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la alícuota en el volumen remanente. La mezcla de transformación se cultivó en placas Petri en medio LB sólido con los antibióticos adecuados para la selección por toda la noche a 28°C.

4.3.4 Cultivo, transformación y regeneración de *Daucus carota*

En procedimiento de embriogénesis somática en la obtención de zanahorias es un procedimiento ya descrito (Chen y Punja, 2002) que se detalla en Flores, 2009. Brevemente, luego de la infección del tejido vegetal con *A. tumefaciens* los explantes se depositaron en medio MS sólido (Medio basal Murashige & Skoog 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20% y agar-agar 7%) a pH 5,8 con la hormona 2,4D 1mg/L que genera el proceso de embriogénesis somática y el o los antibióticos de selección apropiados, kanamicina para la construcción pHG/z2 e higromicina para la construcción pMD/z1N (tabla 2). Durante el proceso de embriogénesis, los explantes se sometieron a tres medios con concentraciones decrecientes de 2,4D (1, 0,5 y 0 mg/L) y concentraciones crecientes de antibiótico (kanamicina 25, 50 y 100 mg/L e higromicina 2, 4 y 6 mg/L). Los explantes fueron sometidos a cada medio durante 4 o 5 semanas, por lo que al cabo de 15 semanas aproximadamente se

obtuvieron embriones suficientemente maduros y elongados que se pasaron a frascos de MS-agar donde se desarrolló el proceso de elongación y enraizamiento.

4.3.5 Cultivo, transformación y regeneración de *Nicotiana tabacum*

Para la transformación de tabaco se debe contar con plantas cultivadas *in vitro*. Para ello, se esterilizaron las semillas con una solución de detergente y cloro (5%), se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril y finalmente, se sembraron en placas de Petri con medio basal MS a pH 5,8. Al cabo de 3 semanas, las hojas de las plantas tuvieron un tamaño apropiado para ser usadas en la transformación estable.

Otro aspecto importante previo a la transformación de plantas es realizar un cultivo de *A. tumefaciens* adecuado para favorecer la infección de los tejidos vegetales. Para ello, las células de *A. tumefaciens* portando la construcción de interés fueron crecidas en agitación toda la noche a 28°C. Luego, el cultivo se centrifugó durante 7 minutos a 8000 X g y se resuspendió en MS líquido con acetosiringona 25mM. Finalmente, se dejó creciendo a 28°C hasta una D.O.₆₀₀ = 0,5.

Para la transformación estable de tabaco, se co-incubaron por 10 min. fragmentos de hojas (llamados explantes) de plántulas de tabaco cultivadas *in vitro*, con el cultivo de *A. tumefaciens* portador de la construcción deseada. Posteriormente, los explantes se depositaron en una placa de MS sólido, sin antibiótico. La placa se mantuvo en condiciones de oscuridad durante 30 horas

para facilitar la infección de *A. tumefaciens* a las células vegetales. Luego se trasplantaron los explantes a los medios adecuados para inducir la organogénesis somática, la cual permitió generar brotes y finalmente plantas completas que portaron el gen *zds1* de *D. carota*.

En este caso, el proceso de organogénesis consta de tres medios de inducción. El medio 1 contiene kanamicina (Kan, 25mg/L), la hormona citoquinina Benzil Amino Purina (BAP, 5 mg/L), la hormona auxina Ácido Indolbutírico (IBA, 1mg/L) y cefotaxime (300 mg/L) para eliminar el *A. tumefaciens* remanente después de la infección. Las hormonas son necesarias para inducir la organogénesis somática. La kanamicina se utilizó para seleccionar las plantas que portan el vector pWB2 con el gen de interés.

Luego de tres semanas aproximadamente, los explantes se pasaron al medio 2, que contiene Kan (50mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Finalmente, luego de otras tres semanas, los explantes ya inducidos se pasaron al medio 3, que contiene Kan (100mg/L) y cefotaxime (150 mg/L).

Para el cultivo en el invernadero, las plántulas *in vitro* obtenidas producto de la organogénesis somática, se trasplantaron a maceteros de 1200 cm³ aprox., con una mezcla de tierra de hoja: tierra fina especial N°3 marca sunshine, tierra de hoja: vermiculita (1:1:1) en un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura constante de 24°C. La primera etapa es crucial y consiste en la aclimatación de las plantas, principalmente a su nuevo sustrato (tierra) y a las condiciones de humedad ambiental. Para favorecer esta etapa, inicialmente cada plántula se cubrió con un recipiente plástico de manera

de mantener la alta humedad en la que fueron desarrolladas durante su cultivo *in vitro*. A partir de los 10 días, las plantas se destaparon gradualmente, para terminar por destaparlas completamente en un periodo de aproximadamente 4 semanas.

4.4 Métodos de Biología Molecular

4.4.1 Extracción de ADN de plantas

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo descrito por Doyle y Doyle en 1987. Aproximadamente 200mg de tejido vegetal fue congelado en nitrógeno líquido y se homogeneizó con 0,7 ml de CTAB (cetil trimetilamonio bromuro) al 2%, adicionando 1,4 M de NaCl, EDTA 20mM y Tris pH 8 100 mM). El homogeneizado se mantuvo a 60°C por 30 min y luego se volvió a agregar 0,7 ml de CTAB y se incubó a 70°C por 15 min. Luego, se agregó 200 µl de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1, se centrifugó y separó la fase acuosa (superior) de la orgánica. La fase acuosa que contiene el ADN fue transferida a otro tubo Eppendorf para precipitar el ADN con isopropanol por 40 min a -20°C. Posteriormente, se centrifugó, se lavó el precipitado con etanol 70%, se vuelve a centrifugar y eliminar el sobrenadante; el precipitado se secó a temperatura ambiente por 10 minutos para finalmente resuspenderlo en agua nanopura.

4.4.2 Purificación de ADN plasmidial de *E. coli*

Se empleó el kit AxyprepTM de Axygen con el protocolo y los reactivos incluidos por el fabricante. Con este ADN se realizaron los análisis de digestión y las amplificaciones de PCR.

4.4.3 Purificación de ARN de plantas

Para la extracción del ARN de las hojas de las plantas de zanahoria y de tabaco, se utilizó el método de RNA-solv® (Omega Bio-tek), siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante y detalladas además en el seminario de título de Flores, 2009. Este método está basado en la extracción mediante fenol y tiocianato de guanidinio descrito por Chomczynski y Sacchi en 1987. El tejido se congeló, se molió en N₂ líquido y se homogeneizó con RNA-solv®. Luego se agregó cloroformo, que desnaturaliza las proteínas y además permite generar una fase orgánica y otra acuosa. En la fase orgánica permanecen los componentes celulares no deseados, mientras el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de la cual fue posteriormente precipitado con isopropanol. Luego de una centrifugación final, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en H₂O tratada con DEPC (Dietil piro carbonato).

4.4.4 Digestiones enzimáticas

La correcta recombinación entre los vectores pCR8/z1A y pGWB2, se confirmó por digestión con la enzima *SacI*. La reacción contenía 170 ng de ADN plasmidial, tampón *FastDigest*® 1X y 1 U de la enzima *FastDigest*® *SacI*. Se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Las digestiones para determinar la apropiada generación de las construcciones pMD/z1A y pGH/z2, se detallada en Flores, 2009.

Las reacciones de digestión enzimática fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa y las bandas visualizadas mediante tinción con Bromuro de Etidio.

4.4.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR estaban compuestas por: 1X del tampón de la enzima, 2 mM de MgCl₂, 0,2 µM de los partidores sentido y antisentido (Tabla 1), 0,2 mM de dNTPs y 1U de *Taq* polimerasa, además de ADN, ADNc o cultivo bacteriano como molde.

El programa estándar utilizado constó de un paso inicial de desnaturalización del ADN por 4 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de: 40 segundos de desnaturalización a 94°C, 35 segundos de hibridación a 52°C y 40 segundos para la extensión a 72°C. Finalmente, se realizó un paso de extensión a 72°C por 10 minutos.

Para visualizar los ácidos nucleicos (ADN o ARN), se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Éste fue preparado con tampón TAE 1X

(Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y bromuro de Etidio (Bret) 1 µg/mL. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xylene cyanol 0.25% y glicerol 80%) previo a ser cargadas en el gel.

Las reacciones de PCR sirvieron para confirmar la transformación tanto de *E.coli* como de *A. tumefaciens*, en el caso de PCR colonia y también para determinar la transgenia de los tabacos obtenidos producto de la organogénesis somática, amplificando el gen *nptII* a partir de ADN genómico.

4.4.6 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Primero se trataron 2 µg del ARN extraído, con DNasaI (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante y detalladas en Flores, 2009.

Para la síntesis de ADNc se utilizó la Transcriptasa Reversa Improm-II (Promega). En base a las instrucciones del fabricante, se mezcló 1µg de ARN tratado con DNasa I con 10 pmoles de partidor AP (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') durante 5 minutos a 70°C, luego los tubos se pusieron en hielo durante 5 minutos, tiempo durante el cual se agregó la mezcla para la transcripción reversa. El programa continuó con 5 minutos a 25°C para la hibridación, luego 60 minutos a 42°C para la extensión y finalizó con la inactivación de la enzima sometiendo la reacción a 70°C durante 15 minutos. Se hizo además un control negativo sin Transcriptasa Reversa, agregando ARN en vez de ADNc al medio de reacción, de manera de descartar remanentes de ADN en las posteriores amplificaciones.

4.4.7 PCR en Tiempo Real o RT-PCR cuantitativo

Para los experimentos de RT-PCR cuantitativo se empleó un termociclador Mx300P™ (Stratagene) y como sonda fluorescente se utilizó SYBER green, contenida en el *SensiMix™Plus SYBR kit* (Quantace).

Se utilizó el programa *AmplifX* para diseñar partidores que amplificaran la región 5' no traducible (5'NTR) de los genes *zds1* y *zds2*. Además, se utilizaron los partidores disponibles en el laboratorio (Fuentes, 2009) para medir los niveles de mensajeros de otros genes de interés en la ruta; *psy1* (nº acceso: DQ192186), *psy2* (nº acceso: DQ192187) y 18S (nº acceso AY552527). A todos los partidores se les realizó un análisis con la Herramienta de Búsqueda y Alineamiento Local Básica, BLAST (por sus siglas en inglés) para confirmar informáticamente la especificidad de los partidores.

La eficiencia de los partidores *zds1* y *zds2* (Tabla 1) se determinó reamplificando mediante PCR en Tiempo Real cinco diluciones (desde 1/100 hasta $1/1 \cdot 10^6$) procedentes de una amplificación por un PCR convencional de la región 5'NTR de los genes *zds1* y *zds2*. Luego, la eficiencia de cada partidor (E) se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde la pendiente se obtiene de la recta en un gráfico del ciclo umbral (Ct) v/s el número de la dilución.

Una vez obtenida las eficiencias de los partidores, se realizaron las reacciones de PCR en tiempo real siguiendo las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 20 μ L.

El programa de amplificación constó de una desnaturalización inicial de 4 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización, 33 segundos de hibridación a 59°C y 30 segundos para la extensión a 72°C. Finalmente, se realizó la curva de disociación compuesta por un paso inicial de 1 minuto a 95°C, seguido de 30 segundos a 60°C para terminar con una rampa de temperatura hasta los 95°C. En esta etapa, la fluorescencia indicó la temperatura de disociación del amplificado.

Como evaluación de una correcta amplificación primero se consideró que las curvas de amplificación tuvieran la forma sigmoidea característica a este tipo de experimentos y que la curva de disociación fuera óptima. En las curvas de disociación se grafica la primera derivada negativa de la fluorescencia vs la temperatura, lo que permite observar la presencia de un pico que indica la temperatura a la cual el fragmento amplificado se disocia y dado que si dos amplificados poseen tamaños distintos tendrán también dos temperaturas de disociación distintas. Por lo tanto, para cada amplificado se espera la presencia de un único pico en el gráfico.

En este caso se realizó una cuantificación relativa, es decir, se determinó la abundancia relativa de mensajeros respecto a otro gen. Para este tipo de metodología se debe determinar un gen normalizador y un gen calibrador.

El gen “normalizador” es aquel que se utiliza como control de carga, es decir, se ajusta la cantidad inicial de ADNc de cada muestra, de manera que el amplificado del gen Normalizador sobrepase el Ciclo Umbral (C_t , *Cycle threshold*) aproximadamente en el mismo ciclo para toda las muestras. De esta forma se normaliza la fluorescencia de cada muestra y se reduce el efecto debido a las diferencias en la cantidad inicial de ADNc en las muestras. En este caso se utilizó como gen normalizador al gen de “mantenimiento” (*housekeeping*) codificante de la sub unidad ribosomal 18S y se ajustó para que el C_t de este gen fueran aproximadamente 20 ciclos.

Por otra parte, la metodología utilizada requiere de una condición que sirve como “calibrador”. La condición de “calibrador” corresponde a las condiciones normales o sin tratamiento. En esta tesis el calibrador correspondió a una planta silvestre. Por este motivo, las diferencias en los niveles de mensajeros, se aprecian como razones de cambio de los niveles en una planta transgénica (portando la construcción para el SGPT) respecto a una silvestre, cuyos niveles de mensajero no han sido alterados.

La cuantificación se realizó utilizando los datos de Ciclo Umbral obtenidos mediante el programa *LightCycler Analysis Software*. Los datos se ingresaron a la Ecuación 2 (Pfaffl, 2001), junto a los valores de eficiencia de

cada

$$\text{Razón} = \frac{(1 + E_{\text{gen objetivo}}) \times e^{(C_t \text{ gen objetivo} - C_t \text{ calibrador objetivo})}}{(1 + E_{\text{gen normalizador}}) \times e^{(C_t \text{ gen normalizador} - C_t \text{ calibrador normalizador})}}$$

par de
partidores,

que fue determinado previamente.

(Ecuación 2)

Los datos obtenidos fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism. Además, se utilizó un test de ANOVA de una vía para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$) en los promedios de cada conjunto de datos, seguido de un post-test de Tukey de comparación múltiple, para evaluar si las diferencias entre el promedio de las réplicas era significativo ($p < 0,05$). Cada muestra se obtuvo de tres hojas diferentes y cada medición de éstas se realizó en triplicado.

4.5 Determinación de la Cantidad y Composición de Pigmentos

4.5.1 Extracción de Pigmentos.

La extracción de pigmentos se realizó a partir de las hojas y raíces de plantas adultas de zanahoria (3 meses) utilizando 100 y 150 mg de tejido, respectivamente. También se extrajeron pigmentos de plantas de *N. tabacum*, utilizando 100 mg de hojas de plantas adultas (6 meses). El tejido se molió en presencia de N_2 líquido en un mortero y se homogeneizó con 1 ml de una solución de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v). El macerado, se agitó durante 2 minutos en un *vortex* y luego se mantuvo en hielo y oscuridad por 2 minutos. Después de centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se colectó la fase orgánica. Finalmente, la fase orgánica se secó con N_2 gaseoso quedando preparada para la cuantificación de pigmentos. Todo el proceso de extracción se realizó en oscuridad y frío.

4.5.2 Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría.

La extracción de carotenoides secada en N₂ gaseoso se resuspendió en 1 ml de bencina de petróleo y se midió la absorbancia de esta solución a 474 nm para determinar la cantidad de pigmentos totales (carotenoides y clorofila) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CAROTENOIDES TOTALES} = \frac{\text{VOLUMEN DE* RESUSPENSIÓN (ml)} \times \text{ABSORBANCIA (474 nm)} \times 100}{21 \times \text{PESO SECO (g)**} \times \text{DILUCIÓN}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

*El volumen de resuspensión fueron 0,5 mL de una dilución 1:4 a partir de 1 mL de solución inicial.

**Para calcular el peso seco, se multiplicó el peso fresco por un factor de conversión calculado a partir del cociente entre el peso después y antes de la deshidratación de 3 muestras de tejido. Los valores son: 0.098, 0.11 y 0.285 para hoja de zanahoria, hoja de tabaco y raíz de zanahoria respectivamente.

Para determinar la cantidad de carotenoides, se realizó primero el análisis de HPLC, de esta manera se puede asignar qué porcentaje y por lo tanto qué cantidad de los pigmentos totales corresponden a clorofila y cuanto a carotenoides.

Una vez obtenido los valores de absorbancia, las muestras se volvieron a secar con N₂ gaseoso hasta su utilización para el HPLC.

4.5.3 Composición de pigmentos mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La extracción de carotenoides previamente secada en N₂ gaseoso, se resuspendió en 400 µL de acetona y 50 µL de esta solución se utilizó para el

análisis de HPLC. Este análisis se llevó a cabo en una columna Hipersy C18 de fase reversa y 15 cm de longitud (Merck). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo de 1 ml/min. Los picos del espectro fueron recuperados por un detector de arreglo de diodos.

Los cromatogramas generados se analizaron respecto al libro de referencia de Carotenoides (Briton G, 2004), teniendo en cuenta los espectros de absorción y los tiempos de retención de cada pico, lo que permitió asignar de manera confiable un pigmento a determinado pico.

Finalmente, para determinar la concentración de carotenoides, se correlacionó el área correspondiente a los picos de interés con la concentración de los carotenoides totales obtenida previamente, de esta manera se restó el contenido de clorofila y se calculó la concentración de los carotenoides detectados. La concentración de fitoeno se determinó de acuerdo a los datos generados en la Tesis Doctoral de Aniela Wozniak (Wozniak, 2008).

4.6 Construcciones Genéticas

En esta tesis se describe la tecnología *Gateway*® de manera general y solo se detalla el procedimiento para obtener la construcción pGW/z1A, diseñada para la sobre-expresión en tabaco del gen *zds1* de zanahoria. Las construcciones pMD/z1N y pHG/z2 se generaron en el Seminario de Título previo a esta tesis (Anexo Trabajo Adelantado, sección 10.1).

4.6.1 Metodología Gateway®

La generación tradicional de construcciones genéticas se basa en la digestión de las hebras de ADN con enzimas de restricción y la posterior unión de éstas mediante enzimas ligasas.

La metodología Gateway®, a diferencia de la tradicional, se basa en las propiedades de recombinación sitio-específicas del bacteriófago lambda (λ) para realizar las etapas de clonación y sub-clonación en la generación de las construcciones genéticas.

Para ingresar la secuencia de interés a esta plataforma de clonación Gateway®, existen determinados vectores denominados “vectores de entrada”. Estos vectores como pCR8/GW cuentan con una enzima del tipo topoisomerasa unida covalentemente a ellos. Esta enzima se denomina comercialmente TOPO® y es capaz de ligar las hebras de ADN de la secuencia de interés, en este caso un producto de PCR, con dicho vector de entrada (Figura 4).

Una vez clonado el fragmento de interés en el vector de entrada, dicho fragmento se debe clonar en un segundo vector, denominado vector de destinación y, que es usado para transformar las plantas y realizar el análisis del gen de interés. Existe una gran variedad de vectores de destinación, cada uno de ellos con diferentes características dependiendo del análisis que se desee realizar. Por ejemplo en este trabajo se utilizaron los vectores de destinación, pGWB2, pMDC32 y pHellsgate 12 (Figura 5, Tabla 2).

El gen de interés se transfiere desde el vector de entrada al vector de destinación mediante un proceso de recombinación en presencia de la enzima

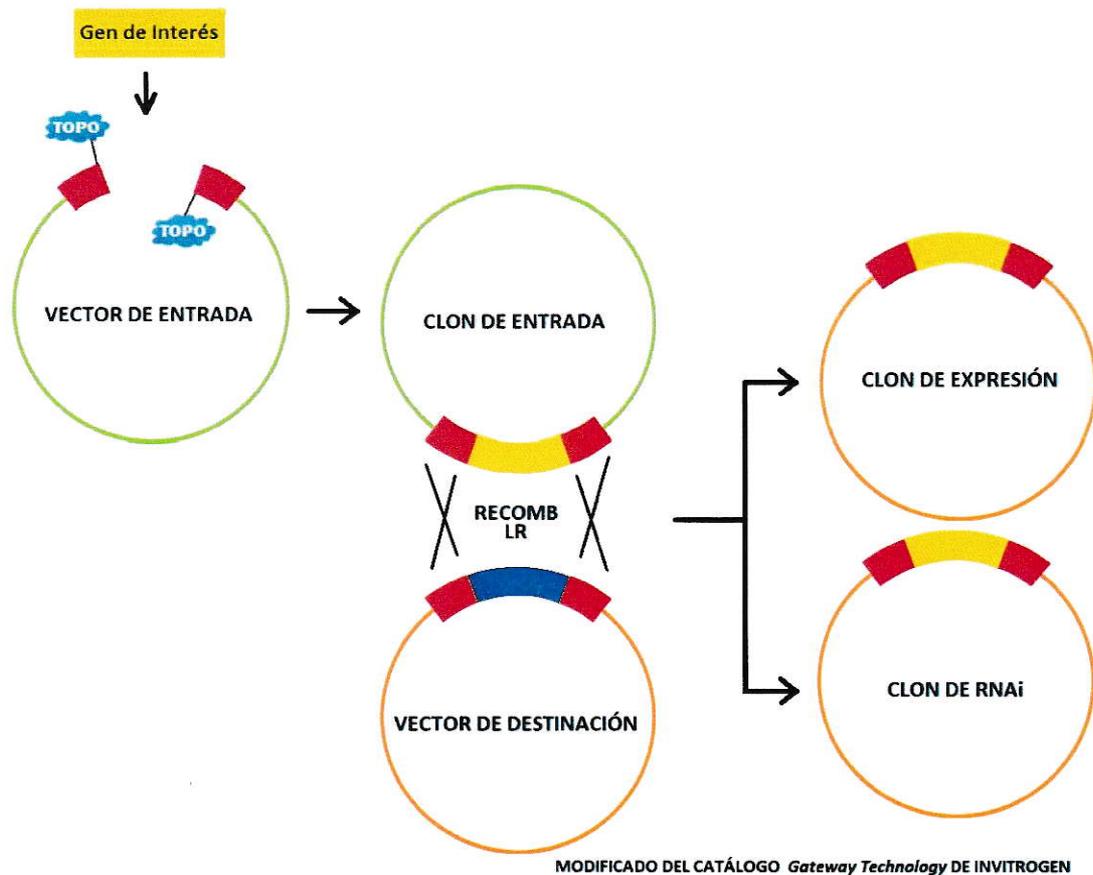


Figura 4. Esquema de la Tecnología Gateway®. En rojo se representan los sitios de recombinación. TOPO, representa la topoisomerasa que realiza la clonación. Clon de expresión: Vector para la expresión de un gen de interés. Clon RNAi: Vector para el silenciamiento génico de un gen de interés.

denominada LR Clonasa® que pertenece a la familia de las integrasas y tiene la capacidad de generar interacciones intra e inter-moleculares. Esta característica permite que la enzima sola pueda realizar la recombinación completa a través de un mecanismo de corte y ligación de las hebras (Figura 4).

La tecnología Gateway se ha reportado en la literatura como una forma eficiente para generar construcciones genéticas (Miki y Shimamoto, 2004; Fernandez y col., 2009). Además esta metodología posee la ventaja de que al ingresar una secuencia o gen de interés a la plataforma Gateway, éste queda disponible para destinarlo a una amplia gama de vectores de expresión en plantas para diversos objetivos (Figura 4).

4.6.2 Diseño de partidores

En la siguiente tabla se describen los partidores empleados en esta tesis

Tabla 1. Características de los partidores utilizados

PARTIDOR	SECUENCIA DEL PARTIDOR (5'→3')	DESCRIPCIÓN
18S-F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Se utilizaron para verificar la integridad tanto del ADN genómico como del ADNc. Amplifican un fragmento de 196 pb del gen para el ARN ribosomal 18S. ¥
3'18S-R	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	
nptII-F	CAAGATGGATTGCACGCA	Amplifican el gen <i>nptII</i> y se utilizaron para confirmar la inserción de la construcción pG/z1A. Amplifican un fragmento de 655 pb. ¥
nptII-R	CTATGTCCTGATAGCGGT	
z1 ATG-F	ATGGCCGCCGCTTCTTCGTCTTTG	Hibrida en el gen <i>zds1</i> a partir del sitio de inicio de la traducción.*
z1_3N-F	CACCTAACGACCTTGCGAAAAACA	El partidor 5' z1 GATE amplifica, junto con el partidor 3' un fragmento de 295 pb que incluye la región 3' NTR del gen <i>zds1</i> . ¥
z1_3N-R	GAATTCAACCAAGTAAACGTATCCC	
z1_5Nq-F	CTCCGCCTCCAACCCATTTA	Partidores para RTPCR en tiempo real de <i>zds1</i> . Amplifican un fragmento de 119 pb. Se determinó una eficiencia de 0,95.*
z1_5Nq-R	AAGAGGGAGAATCAGCGGTGAAAG	
z2_5Nq-F	GCTCAGCTCCTATAACAATTTGTT	Partidores para RTPCR en tiempo real de <i>zds2</i> . Amplifican un fragmento de 122 pb. Se determinó una eficiencia de 1,07.
*z2_5Nq-R	GGCACCGGGAGAGTGAAAT	
*psy1q-F	AGTCGATGGAGCATTACCATAATTC	Partidores para RTPCR en tiempo real de <i>psy1</i> . Amplifican un fragmento de 95 pb. Eficiencia de los partidores: 0,86. *
*psy1q-R	CTAATGGGTTACAGAGGGTTGTGTTA	
*psy2q-F	GCTAATAAACTTCCGTGGGTGTTT	Partidores para RTPCR en tiempo real de <i>psy2</i> . Amplifican un fragmento de 112 pb. Eficiencia de los partidores: 0,95. *
*psy2q-R	GCTGGAGTTAGTGCTACCC	
*Lcybq-F	TGAGTGCAGCTTACACCTACTTGATTA	Partidores para RTPCR en tiempo real de <i>lcyb</i> . Amplifican un fragmento de 161 pb. Eficiencia de los partidores: 0,82. *
*Lcybq-R	AACTGCAGAAGATATTGGAGA	

* Partidores diseñados por Paulina Fuentes (Seminario de Título)

¥ Partidores diseñados en este estudio con el programa *AmplifX* (versión 1.44; Nicolas Jullien; <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>).

4.6.3 Generación de la construcción pGW/z1A

Para obtener un vector que sobre-exprese el gen *zds1* de *D. carota* se recombinó el vector pCR8/z1ATG (Anexo Trabajo Adelantado, sección 10.4) con el vector de destinación pGWB2, el cual posee el promotor 35SCaMV. Para ello, se mezcló 195 ng de la construcción pCR8/z1ATG, 180 ng del vector pGWB2, 2 µL de LR ClonasaTM II Invitrogen y tampón TE pH8 para completar 10 µL.

La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente. Para detener la reacción se agregó 1 µL de Proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante 10 minutos a 37°C.

Finalmente, se transformaron las bacterias competentes de *E. coli* DH5α por golpe térmico (sección 4.3.3) y se seleccionaron los clones transformantes en placas de Petri con LB sólido con kanamicina (100 mg/L), resistencia otorgada por el vector pGWB2 (Tabla 2).

4.7 Análisis de Secuencia

Para el alineamiento de secuencias se utilizó la herramienta COBAL (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*) del sitio www.ncbi.com. Este alineamiento múltiple de secuencias combina un alineamiento múltiple progresivo, con una colección de apareamientos restringidos, derivados de la búsqueda en una base de datos. Esta búsqueda se basa en dominios o motivos proteicos e identidad de secuencia, usando los algoritmos de RPS-BLAST, BLASTP y PHI-BLAST.

Para la búsqueda de motivos conservados se utilizó la página <http://motif.genome.jp>, desarrollada por el Centro de Bioinformática de la Universidad de Kyoto y la base de datos Prodom.

RESULTADOS

5.1 Construcciones Genéticas

Para el estudio de la función de los genes de z-caroteno desaturasa 1 y 2 (*zds1* y *zds2*) de *D. carota* se silenciaron estos genes en zanahoria y se expresó el gen de *zds1* en tabaco. Para ello se utilizaron tres construcciones, las que se muestran en la Figura 5.

La construcción pGW/z1A fue diseñada para gatillar la expresión del gen *zds1* de *D. carota* en plantas de tabaco. Las construcciones pMD/z1N y pHG/z2 se diseñaron para gatillar específicamente en *D. carota* el silenciamiento génico (SGPT) de los genes *zds1* y *zds2* respectivamente.

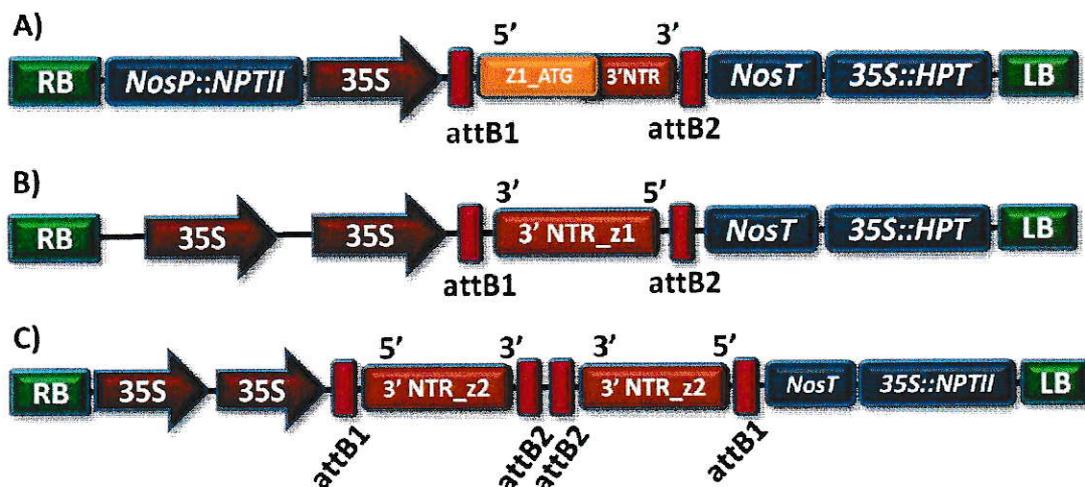


Figura 5. Esquema de las construcciones utilizadas en este trabajo. A) pGW/z1A, posee el promotor constitutivo y fuerte CaMV 35S, desde el ATG del gen *zds1* hasta el final de la región 3'NTR de *D. carota*. B) pMD/z1N, posee el promotor CaMV 35S doble y la región 3' NTR del gen *zds1* de *D. carota* en dirección antisentido respecto al promotor. C) pHG/z2, posee el promotor 35S doble y dos insertos invertidos repetidos de la región 3' NTR del gen *zds2* de *D. carota*, uno en orientación sentido y otro en antisentido respecto al promotor. Los vectores pertenecen a la familia de vectores Gateway®.

Tabla 2. Resumen de las construcciones y sus características. Se indica el tipo de vector de destinación Gateway, el inserto y su tamaño, como de los antibióticos utilizados para seleccionar las bacterias y plantas transformadas con estos vectores.

NOMBRE	VECTOR	INSERTO	RESISTENCIA CONFERIDA
pGW/z1A	pGWB2	<i>zds1</i> _ATG	Kanamicina (100 mg/L) en bacteria
	17,24 kb	1933 pb	Kanamicina (100 mg/L) en plantas
			Higromicina (100 mg/L) en plantas
pMD/z1N	pMDC32	<i>zds1</i> _3NTR	Kanamicina (50 mg/L) en bacteria
	11,75 kb	295 pb	Higromicina (100 mg/L) en plantas
pHG/z2	pHellsgate12	<i>zds2</i> _3NTR	Espectinomomicina (100 mg/L) en bacteria
	17,68 kb	271 pb	Kanamicina (100 mg/L) en plantas

5.2 Generación del Vector pGW/z1A.

El vector de entrada PCR8/z1A (Anexo Trabajo Adelantado, sección 10.4) se recombinó con el vector de destinación pGWB2, que posee el promotor constitutivo y fuerte 35S CaMV (sección 4.6.3.2). Una vez realizada la recombinación, se transformaron bacterias de *E. coli*, y se crecieron en medio selectivo. De los clones crecidos se realizó un PCR de colonia (sección 4.4.5) con partidores para amplificar una región interna del gen *zds1* y confirmar los clones positivos de pGW/z1A.

Se realizó una purificación del ADN plasmidial de los clones positivos y una digestión enzimática para confirmar la correcta orientación del inserto en el vector (sección 4.4.4). Se utilizó la enzima *SacI*, que posee un sitio de corte en el vector y otro en el inserto. En la Figura 6B se observa la banda de 1.6 kb en la orientación antisentido adecuada en los 4 clones analizados (1, 3, 4 y 5).

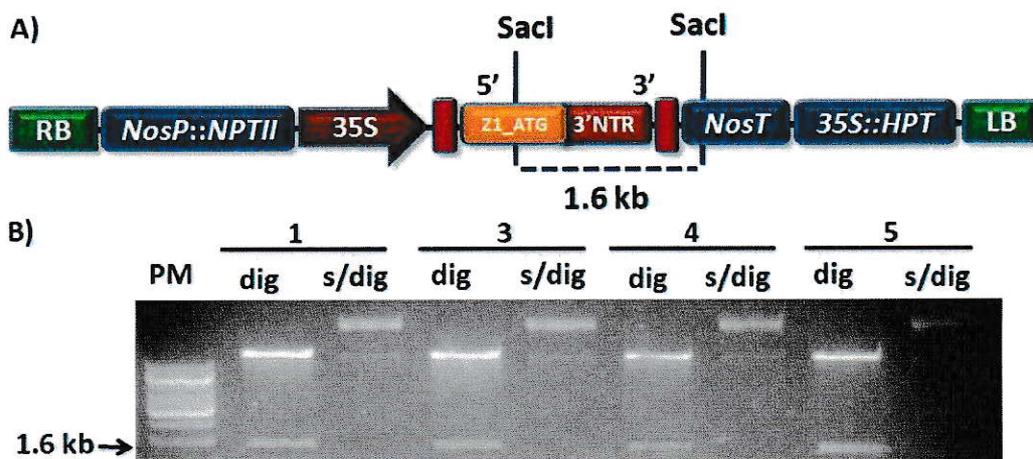


Figura 6. Digestión enzimática con *SacI* de la construcción pGW/z1A. A) Esquema de la digestión indicando los sitios de restricción de *SacI* y el tamaño del fragmento de 1.6 kb. B) Comparación entre ADN plasmidial de los clones 1, 3, 4 y 5 digerido (dig) con *SacI* y sin digerir (s/dig). Estándar de peso molecular de 1 kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bret.

Luego del análisis de la construcción pGW/z1A, se purificó ADN plasmidial, se transformaron células de *A. tumefaciens* competentes y se crecieron en medio de selección (sección 4.3.1). De los clones crecidos se realizó un PCR de colonia con los partidores para amplificar una región interna del gen *zds1* y confirmar los clones positivos de *A. tumefaciens* (sección 4.4.5). En la Figura 7 se muestra que los 4 clones analizados amplifican el fragmento esperado de 718 pb.

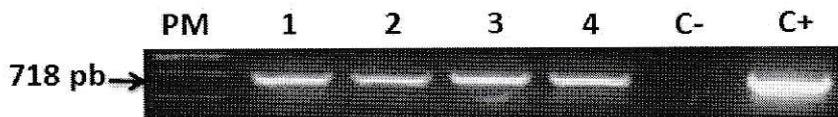


Figura 7. PCR colonia de *A. tumefaciens* transformadas con pGW/z1A. PCR de un fragmento de 718 pb del gen *zds1* de los clones 1 al 4. C-: control negativo, se utilizó agua en lugar de ADN como molde. C+: control positivo, se utilizó ADN plasmidial de pGW/z1A. PM: estándar de peso molecular de 1kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bret.

5.3 Transformación y Obtención de Plantas Transgénicas

5.3.1 SGPT del gen *zds2* en plantas de zanahoria.

Mediante el procedimiento de embriogénesis somática, se obtuvo plantas de zanahoria transformadas establemente con la construcción pHG/z2 (Anexo Trabajo Adelantado, sección 10.2). El proceso para obtener dichas plantas se comparó con el proceso de embriogénesis para obtener plantas silenciadas para el gen *zds1* (Figura 8 y Figura 9 paneles A, C y E).

5.3.2 SGPT del gen *zds1* en plantas de zanahoria.

La Figura 8 muestra algunos explantes representativos de zanahoria transformados con la construcción pMD/z1N y sometidos al proceso de embriogénesis somática (sección 4.3.4). No hubo diferencias entre estos explantes y los explantes de la transformación control en el Medio 1 (Figura 8A y 8B). Sin embargo, en el Medio 2, si bien se logró inducir tejido pre-embriogénico (Figura 8D) el aspecto nunca fue tan saludable como los explantes de referencia (Figura 8C). Finalmente, a pesar de que se realizaron alrededor de 15 transformaciones independientes con intervalos de 4 días y utilizando en cada una de ellas aproximadamente 30 explantes, nunca se logró inducir embriones como se espera para el Medio 3, pero sí para el SGPT del gen *zds2* (Figura 8E y 9E).

Esto representa el primer antecedente para considerar al gen *zds1* como el gen fundamental y necesario en la biosíntesis de carotenoides en *D. carota*.

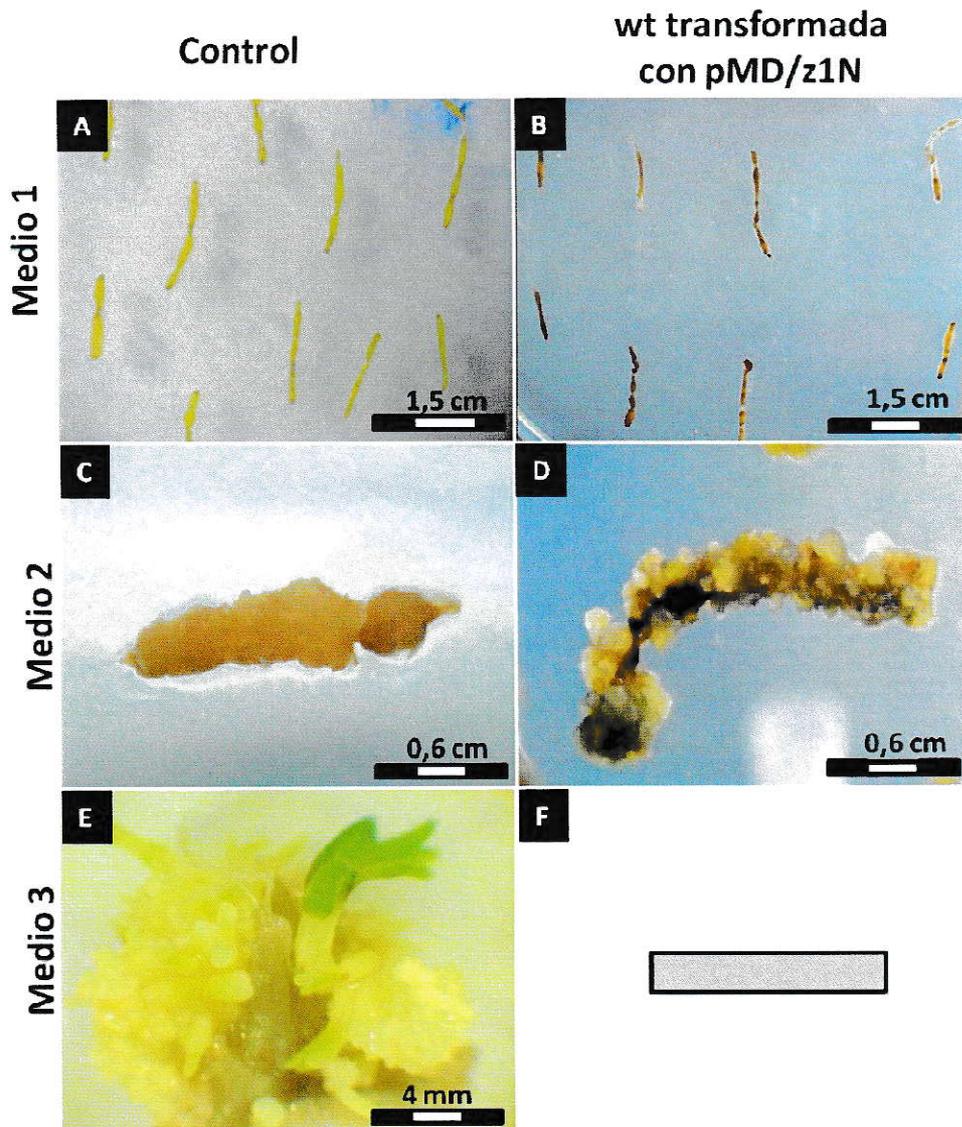


Figura 8: Embriogénesis somática de *D. carota* transformada con pMD/z1N. **A)** Control positivo: Epicotilos de zanahoria depositados en el medio 1 de inducción (2,4D 1mg/L; Kanamicina 25mg/L; cefotaxime 300mg/L) luego de ser transformados con *A. tumefaciens* portando el vector pHG/z2. **B)** Epicotilos de zanahoria depositados en el medio 1 de inducción (2,4D 1mg/L; Higromicina 4mg/L; cefotaxime 300mg/L) luego de ser transformados con *A. tumefaciens* portando el vector pMD/z1N. **C)** Explantes control positivo inducidos en el medio 2 (2,4D 0,5mg/L; Kanamicina 50mg/L; cefotaxime 150mg/L), luego de 12 semanas post-transformación. **D)** Explantes inducidos en el medio 2 (2,4D 0,5mg/L; Higromicina 6 mg/L; cefotaxime 150 mg/L), luego de 12 semanas post-transformación. **E)** Embriones maduros en medio 3 (Kanamicina 100mg/L; cefotaxime 150mg/L) luego de 15 semanas de cultivo *in vitro*, provenientes de la transformación control pHGz2. **F)** Los explantes necrosaron en el medio 3 por lo que no se obtuvieron embriones maduros en el medio 3.

Además de las numerosas transformaciones realizadas, también se intentaron estrategias alternativas, para favorecer el crecimiento de plantas con defectos en la biosíntesis de carotenoides y en particular defectos en la desaturación del z-caroteno como podría ser esperable en este caso (Dong y col., 2007). Entre las estrategias utilizadas están: suplementar el medio con ABA exógeno, crecer las plantas en luz tenue y evaluar distintos medios de inducción sin la presión de selección de los antibióticos. Estas distintas condiciones se evaluaron sistemáticamente y los resultados para el caso de aplicaciones exógenas de ABA se detallan más adelante.

5.3.3 SGPT simultáneo de los genes *zds1* y *zds2* en plantas de zanahoria.

Para obtener las plantas dobles silenciadas, se transformaron con la construcción pMD/z1N, explantes de zanahorias transgénicas de la Línea 2 obtenidas previamente con la construcción pHG/z2.

Al igual que el caso anterior, para favorecer la obtención de plántulas, a los explantes en el medio 2, se les retiró la presión de selección de los antibióticos y se crecieron en condiciones de luz tenue de $2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 9B, Figura 9D). Luego de aproximadamente 10 transformaciones independientes, cada una con alrededor de 30 explantes, se lograron obtener 4 plántulas (LI-LIV, Figura 10), a diferencia del caso anterior con la construcción pMD/z1N donde fue imposible obtener líneas transgénicas para el SGPT de *zds1*. De todas maneras, como se observa en la Figura 9, el proceso de

obtención de las dobles transformadas fue muy deficiente con respecto a la situación control, para las cuales se muestran fotos representativas de los diferentes estadios del proceso normal de embriogénesis somática de zanahoria, obtenido para el silenciamiento de *zds2* (Figura 9 A, C, E).

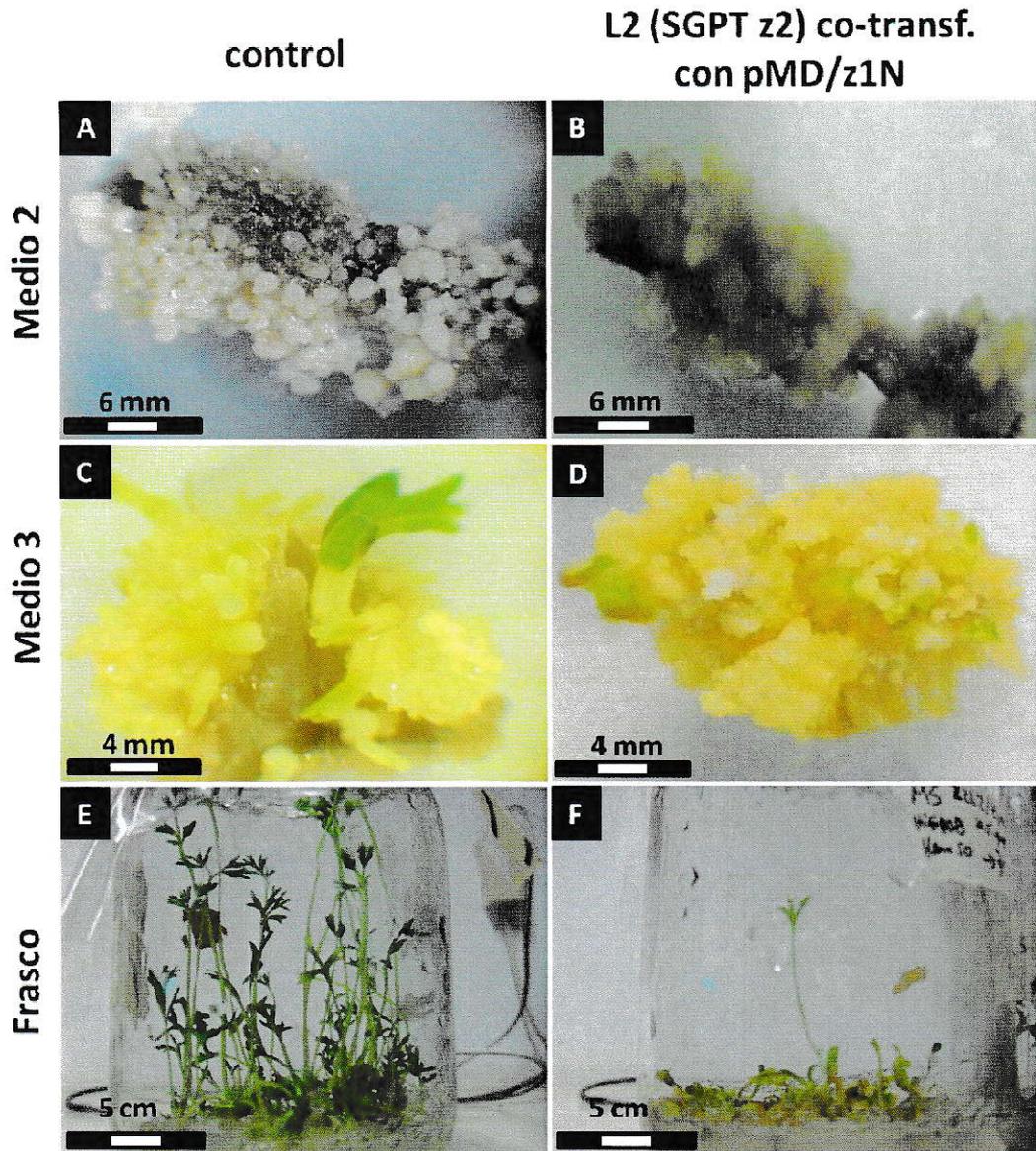


Figura 9: Embriogénesis somática de *D. carota* transgénicas portando pHG/z2, y transformadas con pMD/z1N. A) Embriones control (SGPT para *zds2*) de *D. carota* en etapa globular en medio 2 (2,4D 0,5mg/L; Kanamicina 50mg/L; cefotaxime 150mg/L). **B)** Explantes de epicotilos de zanahoria co-transformados (explantes de plantas silenciadas para *zds2* y transformadas con pMD/z1N) en medio 2 (2,4D 0,5mg/L; Kanamicina 50mg/L; Higromicina 4mg/L; cefotaxime 150mg/L). **C)** Embriones en etapa de maduración en medio 3 (Kanamicina 100mg/L; cefotaxime 150mg/L). **D)** Explantes co-transformados en medio 3, sin antibióticos. **E)** Plántulas transgénicas de *D. carota* para el SGPT de *zds2* en etapa de elongación en medio 4 cefotaxime 150 mg/L). **F)** Plántula de *D. carota* doble transformada en etapa de elongación en medio 4 (cefotaxime 150 mg/L).

De las 4 plántulas obtenidas, sólo la LI presenta un fenotipo relativamente normal, el resto de las líneas (LII, LIII, LIV) no presentan una apariencia comparable a la de una plántula obtenida de un proceso normal de embriogénesis somática (Figura 10). La línea II presenta un incipiente tejido foliar, no obstante, junto con las líneas LIII y LIV tienen un tamaño muy reducido y no muestran el desarrollo de una raíz principal clara.

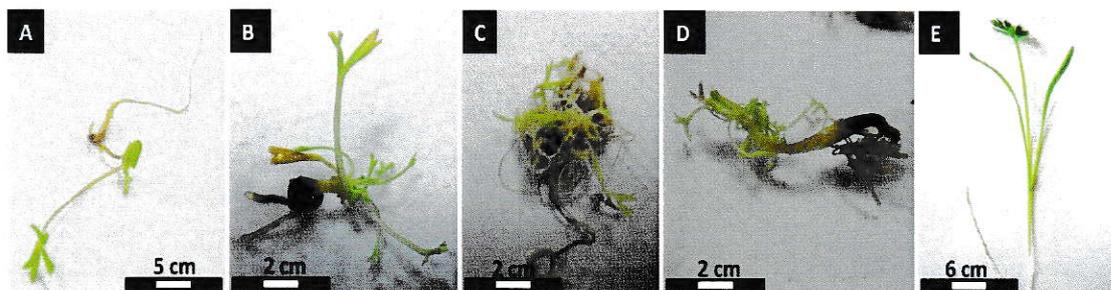


Figura 10: Plántulas transformadas simultáneamente con pHG/z2 y pMD/z1N. A) Línea 1 (LI) B) Línea 2 (LII) C) Línea 3 (LIII) D) Línea 4 (LIV) E) Plántula silvestre

5.3.4 Evaluación de medios de inducción suplementados con ABA.

Como ya se mencionó anteriormente, con el objetivo de optimizar el proceso de embriogénesis para las transformaciones con pMD/z1N y las dobles transformantes, se suplementó el medio habitual de embriogénesis con distintas concentraciones de la hormona vegetal ABA. Se ha reportado que esta hormona es fundamental tanto para la fisiología normal de las plantas en general (Schwartz y col., 2003) como para el proceso de embriogénesis somática de *D. carota* (Kikuchi y col., 2006). El ABA por ser un producto final en

la biosíntesis de carotenoides, al estar silenciando un gen de la ruta podría ser un punto crítico, responsable de la imposibilidad de obtener plantas viables. Por ello, se eligieron 4 concentraciones de ABA para suplementar por un mes el medio 2 de embriogénesis somática de explantes transformados con el vector pMD/z1N. Las concentraciones evaluadas fueron elegidas en base a Dong y col., 2007 y se mantuvieron un mes en cada condición. Determinamos que la presencia de ABA no indujo un cambio positivo en el desarrollo de los embriones de *D. carota* como se observa en la Figura 11. Asimismo, tampoco existen diferencias entre las distintas concentraciones de ABA evaluadas (Figura 11A, C, D, E y F). Por otro lado, la ausencia de antibióticos (Figura 11A y 11C) resultó ser un factor que favoreció la inducción de embriones, debido a la ausencia de la presión de selección en el medio.

Respecto a las condiciones de luz, se ha reportado que condiciones de luz normales para una planta son de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y condiciones de luz muy tenues de $0.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Dong y col., 2007). En este caso, distintas transformaciones se sometieron a tres condiciones lumínicas, 2, 15 y $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin obtener un impacto tangible en la sobrevivencia e inducción de los explantes (datos no mostrados).

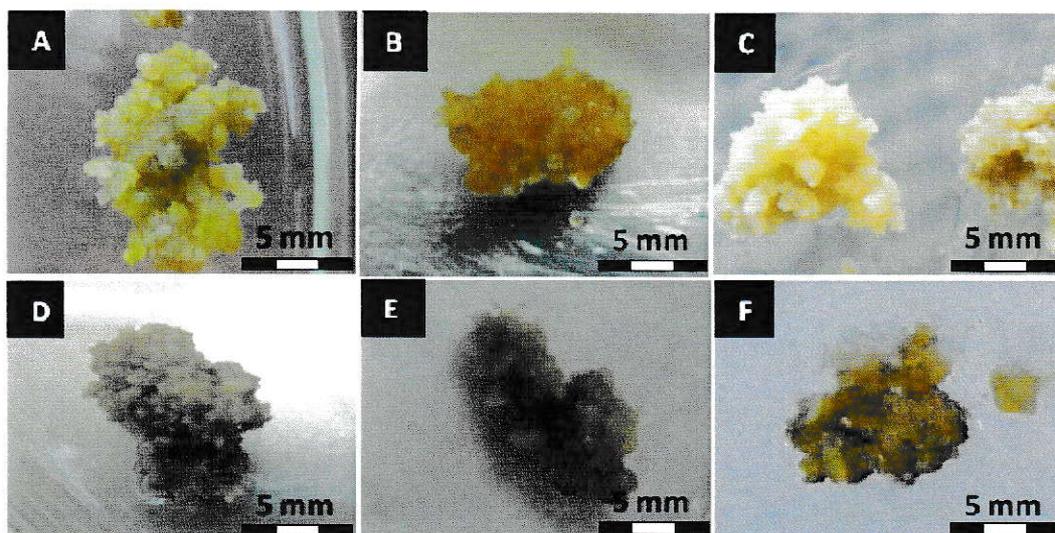


Figura 11: Evaluación del suplemento de ABA en los distintos medios de inducción de embriogénesis. En todo los casos se muestran explantes transformados con pMD/z1N en medio 2, desarrollados y mantenidos por un mes suplementados con o sin ABA y antibióticos según se indica. El tratamiento con antibiótico consiste en el suplemento del medio con higromicina 4 mg/L y kanamicina 50 mg/L. **A)** Ausencia de ABA y antibióticos. Los embriones comienzan la maduración. **B)** Ausencia de ABA en presencia de antibióticos. Explantes con baja viabilidad de embriones. **C):** 5×10^{-4} M de ABA y en ausencia de antibióticos. Embriones viables aun sin madurar. **D)** 1×10^{-3} M de ABA en presencia de antibióticos. Maduración detenida de los embriones. **E)** 1×10^{-6} M de ABA en presencia de antibióticos. Maduración detenida de los embriones. **F)** 1×10^{-9} M de ABA en presencia de antibióticos. Maduración detenida de los embriones.

5.3.5 Sobre-expresión del gen *zds1* en plantas de *Nicotiana tabacum*

Dada la imposibilidad de obtener plantas con SGPT del gen *zds1*, decidimos abordar el estudio de la función de este gen mediante la sobre-expresión de éste en plantas de tabaco. Se utilizaron plantas de tabaco como un sistema heterólogo de expresión del gen *zds1* de *D. carota* ya que al ser una planta modelo, la transformación de tabaco es un procedimiento estandarizado y previamente instaurado en el laboratorio.

Para esto, se transformaron hojas de tabaco con la construcción pGW/z1A y se sometieron a medios suplementados con hormonas citoquininas

y auxinas en una relación determinada para generar el proceso de organogénesis somática de tabaco (4.3.5). Como se observa en la Figura 12, los explantes sometidos a la transformación con *A. tumefaciens* que porta el vector pGW/z1A son depositados en el primer medio de inducción. Luego de 7 semanas estos explantes ya están completamente inducidos y poseen una gran cantidad de brotes, como se aprecia en la Figura 12B. Finalmente, las plántulas fueron crecidas y enraizadas en medio MS en ausencia de hormonas (Figura 12C) y después de 3 meses las plantas se aclimataron en invernadero traspasándolas a tierra (Figura 12D). A través de este proceso se pueden obtener plantas adecuadas para analizarlas luego de aproximadamente 3 meses.

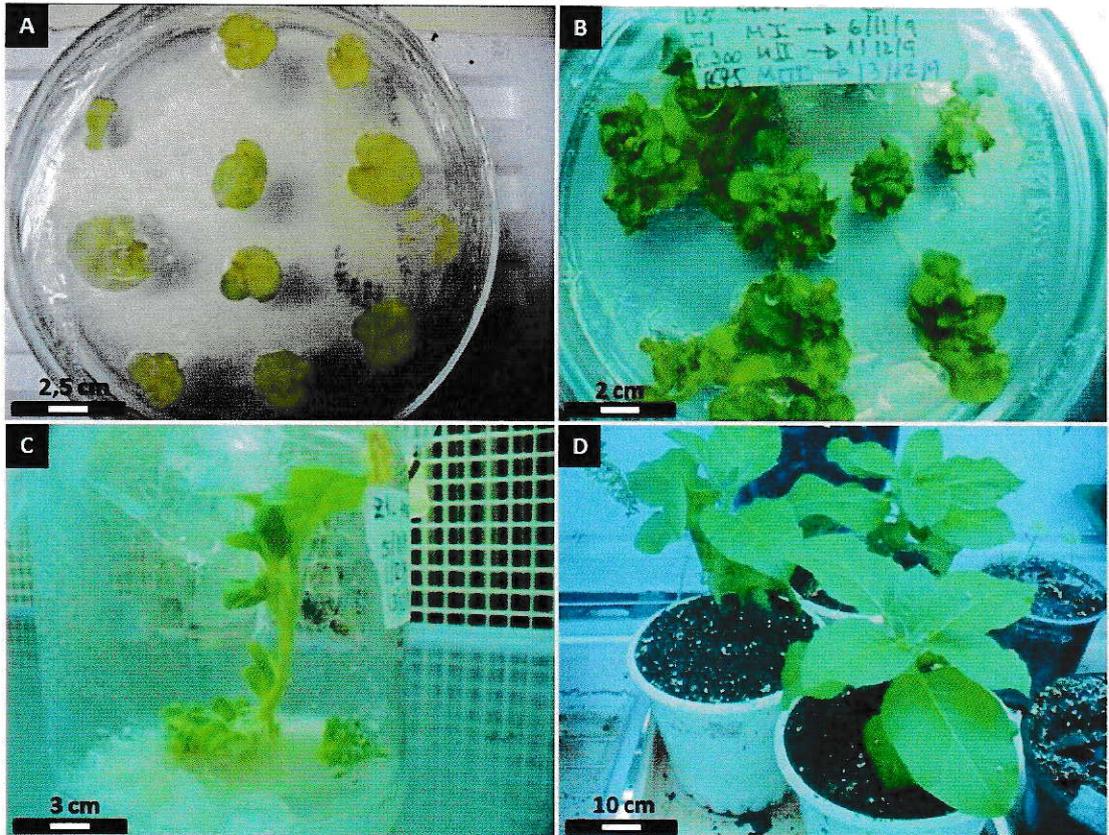


Figura 12: Organogénesis somática de *N. tabacum* transformado con pGW/z1A. A: Explantes de hojas de tabaco recién transformadas depositados en el medio I de inducción (BAP 5 mg/L e IBA 1mg/L) con antibiótico (kanamicina 25 mg/L). **B)** Explantes inducidos al inicio del medio III, luego de 7 semanas post-transformación. **C)** Plántulas de tabaco luego de 9 semanas cultivadas *in vitro* en ausencia de hormonas y en presencia de antibiótico **D)** Plantas de tabaco de 13 semanas, cultivadas en tierra y condiciones de invernadero.

5.4 Análisis Molecular de las Plantas Transformadas

5.4.1 *D. carota* transformadas con pHG/z2

Con las plantas de zanahoria que poseían en su genoma pGH/z2 (Anexo Trabajo Adelantado, sección 10.3), se realizó en esta tesis un RT-PCR cuantitativo para determinar, tanto los niveles de transcritos en dichas plantas, como la especificidad de dicho silenciamiento. En particular, se midieron los niveles de mensajero de los genes *zds1*, *zds2*, *psy1* y *psy2*.

Los datos obtenidos se grafican en la Figura 13 y se detallan en la Tabla 3. Lo primero que es importante destacar, es que efectivamente se logró gatillar un alto nivel de silenciamiento en las cuatro líneas analizadas. Tres de estas líneas poseen sobre un 95% de silenciamiento. Un segundo aspecto relevante, es que este silenciamiento es específico para el gen *zds2* ya que los niveles de mensajero para *zds1* no presentan diferencias significativas con respecto a la planta silvestre.

Un tercer punto interesante, tiene que ver con el gen *psy*. Este gen se ha descrito como un punto clave de la ruta carotenogénica en plantas en general y para el cual se han descrito dos en *D. carota*, *psy1* (DQ192186) y *psy2* (DQ192187). Los resultados muestran situaciones distintas para ambos genes. Para el caso del gen *psy1* los niveles de mensajero se ven sobre-expresados alrededor de 3 veces en las plantas transgénicas respecto a plantas silvestres. En cambio, los niveles de mensajeros de *psy2* no presentan diferencias significativas respecto a plantas silvestres.

Con estos resultados podemos decir que logramos gatillar un específico SGPT de *zds2* y si bien, la ruta está respondiendo a dicho silenciamiento, esta respuesta es diferencial y depende de cada gen. Por lo que hace falta realizar la medición de la expresión de otros genes para obtener una visión más global e integral de toda la ruta.

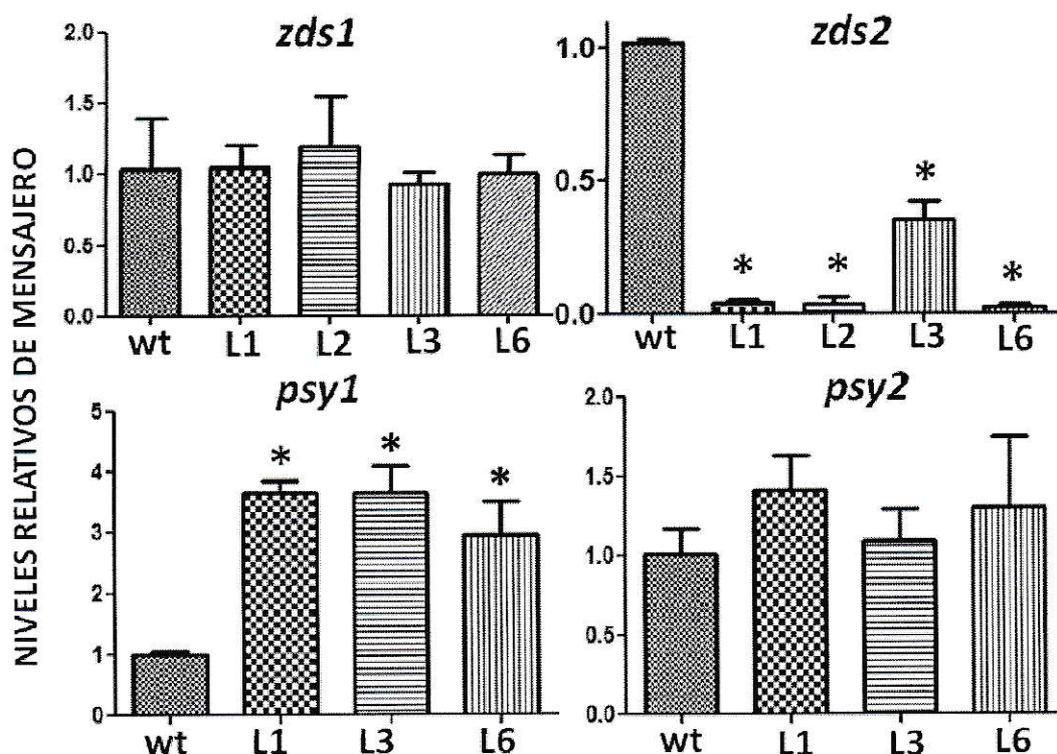


Figura 13: Análisis de RT-PCR en Tiempo Real de las zanahorias transformadas con pHG/z2. Se determinaron los niveles de abundancia relativa de los genes *zds1*, *zds2*, *psy1* y *psy2*, a partir de hojas de plantas silvestres y transgénicas. WT: zanahoria silvestre. L1, L2, L3, L6: líneas transgénicas obtenidas de la embriogénesis somática. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S de plantas de zanahoria silvestres. Los resultados de plantas silvestres se ajustaron a 1. Los resultados con diferencias significativas se indican con un asterisco (*).

Tabla 3. Niveles relativos de mensajero de las zanahorias transformadas con pHG/z2. Se detallan los valores obtenidos para cada gen y su correspondiente desviación estándar (\pm DE).

Planta	<i>zds1</i>	<i>zds2</i>	<i>psy1</i>	<i>psy2</i>	% SGPT <i>zds2</i>
wt	1.03 \pm 0.4	1.03 \pm 0.007	0.99 \pm 0.06	1.01 \pm 0.23	0%
L1	1.04 \pm 0.2	0.04 \pm 0.014	3.64 \pm 0.2	1.41 \pm 0.31	96%
L2	1.19 \pm 0.4	0.02 \pm 0	--	--	98%
L3	0.93 \pm 0.1	0.32 \pm 0.014	3.65 \pm 0.44	1.09 \pm 0.28	69%
L6	1.00 \pm 0.1	0.03 \pm 0.014	2.93 \pm 0.55	1.30 \pm 0.64	97%

5.4.2 Zanahorias transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N

Dada la exigua cantidad de tejido de las plántulas dobles transformantes, se utilizó la planta completa de cada línea para realizar la medición de los niveles relativos de mensajero de los genes *zds1*, *zds2* y *psy2* mediante RT-PCR cuantitativo.

Los datos obtenidos se grafican en la Figura 14 y se detallan en la Tabla 4. No se tienen resultados para las líneas LII y LIII porque no se logró extraer ARN de buena calidad para estas líneas. Como es esperable, el alto nivel de SGPT para *zds2* (sobre 95%) se mantiene en estas plántulas que fueron obtenidas a partir de la línea L2. Con respecto al gen *zds1*, efectivamente se aprecia una disminución significativa en los mensajeros respecto a la planta silvestre, lo que significa que se logró gatillar un SGPT de *zds1* de un 59 y 89% para las líneas LI y LIV, respectivamente. Cabe destacar que para este caso de SGPT de *zds1*, no se lograron niveles de silenciamiento tan elevados como para el caso de *zds2*. Además, existe una buena correlación entre el fenotipo de las líneas y los niveles de silenciamiento. La línea LI que posee un 59% de silenciamiento, tiene un fenotipo mucho más parecido al de una plántula silvestre que la línea IV que posee un 89% de silenciamiento y su fenotipo dista mucho del de una plántula normal. Finalmente, es interesante destacar que los niveles del gen *psy2* disminuyen considerablemente respecto a la planta silvestre. Esto podría interpretarse como una inhibición en toda la ruta de biosíntesis de carotenoides, que explicaría la dificultad para obtener plántulas.

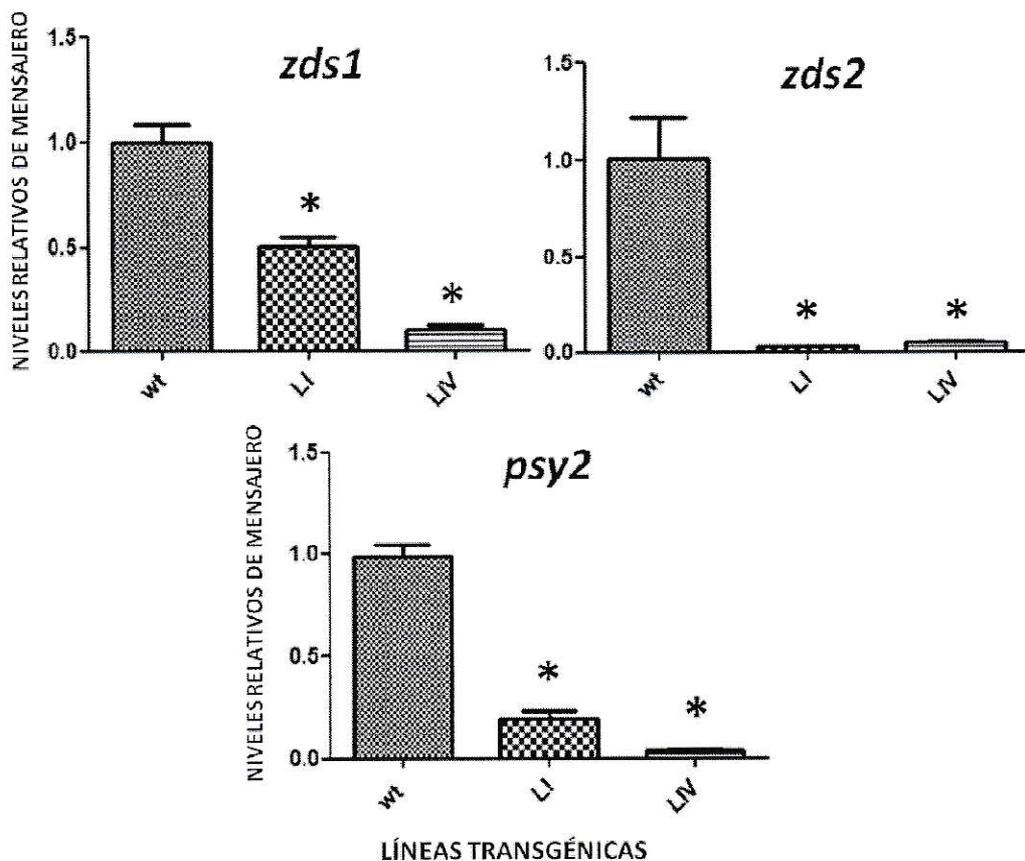


Figura 14. Análisis de RT-PCR cuantitativo de zanahorias co-transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N. Se determinaron los niveles de abundancia relativa de los genes *zds1*, *zds2* y *psy2*. **WT:** plántulas de zanahorias silvestres. **LI, LIV:** plántulas de líneas transgénicas obtenidas de la embriogénesis somática. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S y los niveles de mensajero de plantas de zanahoria silvestres se ajustaron a 1. Los resultados con diferencias significativas se indican con un asterisco (*).

Tabla 4. Niveles relativos de mensajero de zanahorias co-transformadas con pHG/z2 y pMD/z1N. Se detallan los valores obtenidos para cada gen y su correspondiente desviación estándar (\pm DE).

Planta	<i>zds1</i>	<i>zds2</i>	<i>psy2</i>	% SGPT <i>zds1</i>	%SGPT <i>zds2</i>
wt	1.0 \pm 0.08	1.01 \pm 0.21	0.99 \pm 0.06	0%	0%
LI	0.51 \pm 0.04	0.03 \pm 0	0.195 \pm 0.04	59%	97%
LIV	0.11 \pm 0.02	0.05 \pm 0.05	0.035 \pm 0.07	89%	95%

5.4.2 Tabacos transformados con pGW/z1A

De la transformación estable de hojas de tabaco con pGW/z1A, se obtuvieron 15 líneas de tabaco adultas, de éstas se analizaron 9 (T1 – T9) para confirmar la presencia de la construcción. Todas las plantas regeneradas, salvo la línea T2, amplificaron la banda del tamaño esperado para el gen *nptII*, gen de resistencia a kanamicina que forma parte de la construcción como marcador de selección. Como es esperable, este gen no se amplificó en ADN de hojas de tabaco silvestre (Twt), lo que indica que los partidores son específicos para el gen *nptII* (Figura 15).

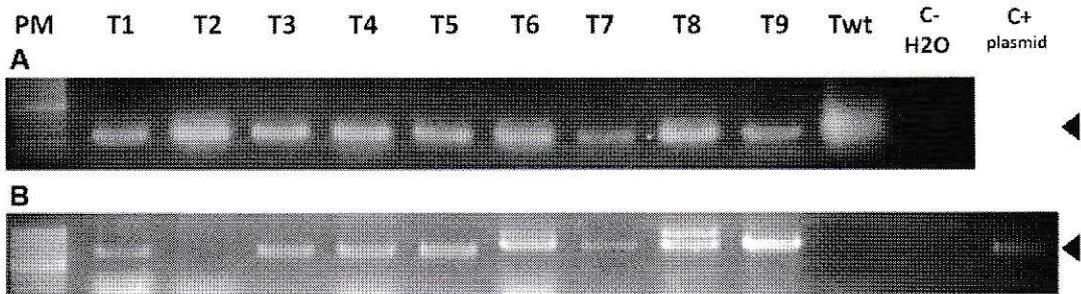


Figura 15. Análisis molecular de las líneas de tabaco obtenidas. A) Como control se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S a partir de DNA genómico. **B)** Fragmento de 655 pb del gen de resistencia a kanamicina *nptII*. Para el control negativo (C-) se utilizó agua en vez de ADN como molde. Para el control positivo (C+) del gen *nptII* se utilizó ADN plasmidial como molde. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bret.

Los análisis se continuaron con 9 líneas transgénicas (T1-T9 y T11), si bien se eliminó T2, se agregó T11 al grupo de estudio, que se había confirmado también poseía el gen *nptII* (datos no mostrados). A estas plantas se les realizó un RT-PCR para determinar la transcripción del transgen, el gen *zds1* de zanahoria. Como se observa en la Figura 16, todas las líneas transgénicas,

salvo la línea T5, presentan claramente la banda de 295 pb de la región 3'NTR del gen *zds1*, lo que indicaría que por lo menos ocho de las nueve plantas poseen el gen *zds1* de zanahoria transcripcionalmente activo.

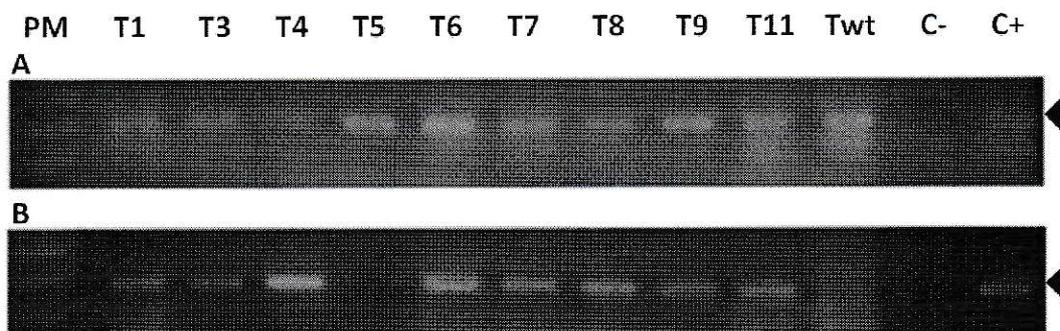


Figura 16. Análisis de RT-PCR de los tabacos transformados con pGW/z1A. A) Se amplificó la subunidad ribosomal 18S (198 pb) como control. B) Se amplificó la región 3'NTR (295 pb) del gen *zds1* de zanahoria. **Twt:** Tabaco silvestre no transformado. **T1, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T11:** Líneas de tabaco transgénicas analizadas. **C-:** control negativo usando agua como molde. **C+:** control positivo usando ADN plasmidial pGW/z1A como molde. **PM:** marcador de peso molecular de 1kb. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con Bret.

5.5 Análisis de los Pigmentos de las Plantas Transgénicas

5.5.1 Zanahorias transformadas con pHG/z2

Los resultados de los análisis de la cantidad y composición de pigmentos en hojas y raíz modificada de zanahorias silvestres y líneas silenciadas para el gen *zds2* se grafican en la Figura 17 y los valores exactos se detallan en la Tabla 5.

En las hojas de plantas silvestres y de las líneas transgénicas, los principales carotenoides son el α -caroteno, el β -caroteno y la luteína y no existe una diferencia significativa en los carotenoides totales ni en la cantidad de cada

pigmento entre las líneas transgénicas L1, L2, L3 y L6 respecto a las plantas silvestres de *D. carota* (Figura 17A). En la raíz de zanahoria se acumulan principalmente α -caroteno y β -caroteno. Se logra apreciar que sólo para el caso del α -caroteno en la raíz de la línea L2, existe un aumento estadísticamente significativo con respecto a la planta silvestre. Sin embargo en el resto de las líneas, no se observan diferencias significativas en los carotenoides totales ni en la composición ni la cantidad de los pigmentos (Figura 17B). Para el caso del tejido de hoja, si bien no existen réplicas y por lo tanto desviación estándar, al repetir el experimento, se volvió a obtener datos sin diferencias significativas (datos no mostrados), lo que respalda los resultados obtenidos. Estos resultados no pueden ser considerados en conjunto con los experimentos realizados previamente, ya que dada la alta sensibilidad del HPLC, entre un experimento y otro se pueden generar diferencias, principalmente asociadas a cambios en la fase móvil, que podrían traducirse en variaciones que no reflejen un fenómeno biológico sino un artefacto. Por lo tanto, lo más apropiado es analizar cada experimento de forma independiente.

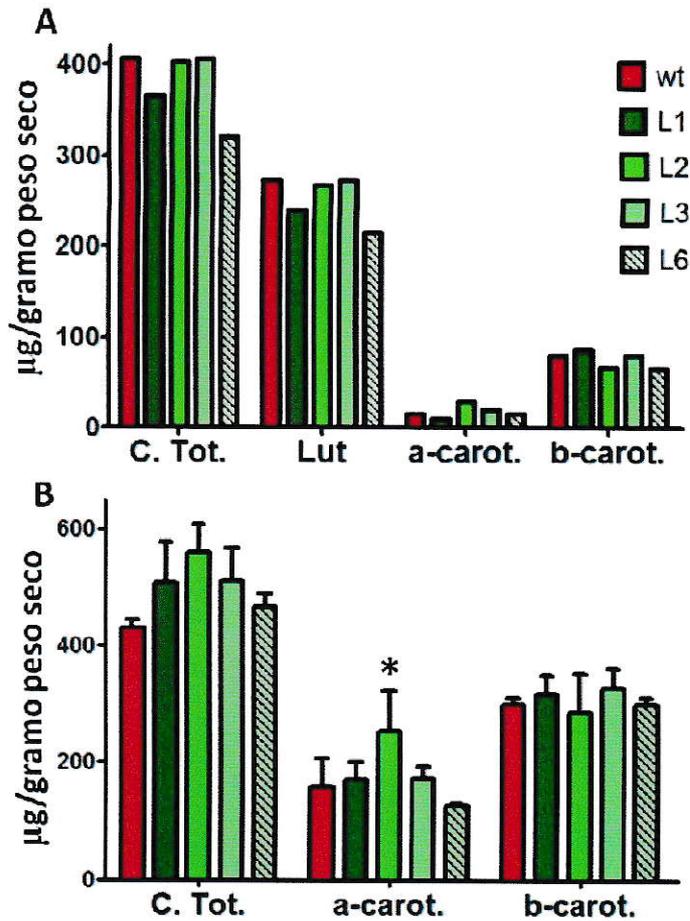


Figura 17: Análisis de HPLC de carotenoides en las zanahorias transformadas con pHG/z2. Se determinó la composición de los carotenoides totales (Total), α -caroteno (a-carot.) y b-caroteno (β -carot.) tanto para las hojas (A) como para la raíz (B). En el caso de las hojas, además se determinó el nivel de luteína (Lut). El análisis se realizó para 4 líneas transgénicas (L1, L2, L3, L6) y zanahorias silvestres (wt). Los resultados con diferencias significativas se indican con un asterisco (*).

Tabla 5. Análisis de pigmentos de las zanahorias transformadas con pHG/z2. Se detallan los valores obtenidos para pigmento y su correspondiente desviación estándar (\pm DE).

Planta	Carotenoides Totales ($\mu\text{g/gPS}$)		α -caroteno ($\mu\text{g/gPS}$)		β -caroteno ($\mu\text{g/gPS}$)		Luteína ($\mu\text{g/gPS}$)
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja
Wt	407	431.2 \pm 14	15	157.8 \pm 34	80	299.4 \pm 12	272.8
L1	367	506.9 \pm 72	9	171.0 \pm 21	86	317.6 \pm 33	239.4
L2	403	558.8 \pm 50	28	253.6 \pm 49	66	285.3 \pm 70	266.6
L3	407	510.9 \pm 56	20	172.7 \pm 14	80	328.2 \pm 34	272.9
L6	322	467.0 \pm 23	15	126.5 \pm 3	65	299.4 \pm 12	214.2

5.5.2 Tabacos transformados con pGW/z1A

De las ocho líneas de tabaco obtenidas que expresan el transgen de *zds1* de *D. carota*, se analizaron los pigmentos en hojas de tres de ellas (T1, T4 y T11) y se compararon con los de tabaco silvestres. Los resultados de la cantidad y composición de pigmentos de los tabacos analizados se grafican en la Figura 18 y los valores obtenidos se detallan en la Tabla 6.

Tanto en plantas silvestres como en las líneas transgénicas, se lograron identificar los picos para el β -caroteno, la luteína y la clorofila mediante una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se detectó además otro pico, que posee un espectro de absorción de carotenoide y un tiempo de retención corto (alrededor de 3 minutos) lo que indicaría que se trata de un carotenoide polar. A pesar de los esfuerzos por identificar el tipo de carotenoide al que corresponde este pico, no pudimos atribuirle la identidad, dado que el espectro de este compuesto coincide con muchos. Por ello, nos centramos en nuestro objetivo de analizar las diferencias en cuanto a composición y cantidad de carotenoides entre las plantas transgénicas respecto a plantas silvestres, lo cual reflejaría el efecto de la expresión del gen *zds1* en tabaco. Lo que primero observamos de los resultados es que existe un aumento significativo en los niveles de carotenoides totales de la línea 1 (T1) y la línea 11 (T11) respecto a las plantas silvestres y no así en la línea 4 (T4) que presenta niveles muy similares a los de la planta silvestre (Twt). Este aumento es especialmente alto para T11 que cuadruplica los niveles de carotenoides totales, mientras que T1, los duplica respecto a las plantas silvestres.

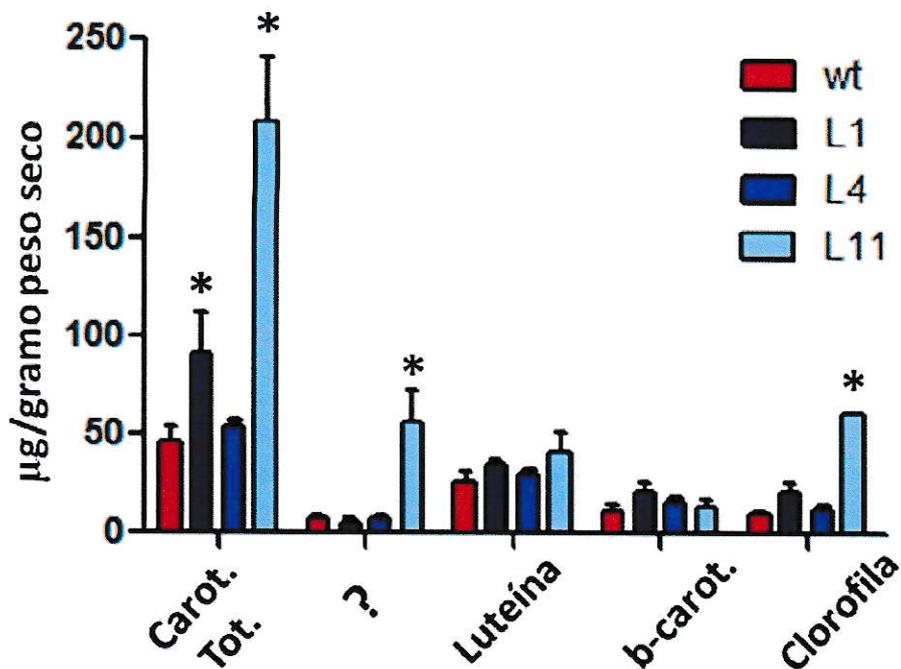


Figura 18: Análisis de HPLC de carotenoides en los tabacos transformados con pGW/z1A. Se determinaron los niveles de pigmentos a partir de hojas para 3 líneas transgénicas (T1, T4 y T11) y un tabaco silvestre (wt). Carot. Tot: carotenoides totales; b-carot: β -caroteno; ?: carotenoide indeterminado. Los resultados con diferencias significativas se indican con un asterisco. Los análisis se realizaron en duplicado y en dos ocasiones de manera independiente.

Tabla 6. Análisis de pigmentos de los tabacos transformados con pGW/z1A. Se detallan los valores obtenidos para pigmento y su correspondiente desviación estándar (\pm DE).

Planta	Carotenoides Totales ($\mu\text{g/gPS}$)	? ($\mu\text{g/gPS}$)	luteína ($\mu\text{g/gPS}$)	β -caroteno ($\mu\text{g/gPS}$)	clorofila ($\mu\text{g/gPS}$)
wt	47 \pm 10	7.8 \pm 0.8	26.6 \pm 6.09	11.9 \pm 5.1	9.9 \pm 1.8
L1	92 \pm 30	5.5 \pm 3.1	35.6 \pm 2.57	21.6 \pm 7.5	21.7 \pm 6.9
L4	54 \pm 6	7.9 \pm 1.7	33.3 \pm 0.66	16.7 \pm 2.9	13.2 \pm 3.2
L11	209 \pm 45	56.1 \pm 24.4	41.3 \pm 14.9	14.21 \pm 4.2	61.3 \pm 0.9

Resulta interesante observar que este aumento en los niveles de carotenoides totales no se correlaciona con un aumento de los pigmentos como el β -caroteno y la luteína que permanecen sin diferencias significativas respecto a las plantas silvestres en las tres líneas transgénicas analizadas.

Sólo para la línea T11, se evidencia un aumento significativo en el carotenoide polar "indeterminado" que podría corresponder a una xantofila dada la polaridad del compuesto, el cual podría estar acumulando producto del aumento en el flujo de la ruta.

Con el objetivo de explorar posibilidades que pudieran explicar el aumento de carotenoides totales pero no de los pigmentos principales, luteína o β -caroteno, también se determinaron los niveles de clorofila para estas plantas. Como se observa en la Figura 18 y la Tabla 6, existe un aumento en los niveles de clorofila de dos veces para T1 y de seis veces para T11, no obstante, este aumento resultó ser estadísticamente significativo sólo para T11.

5.6 Análisis de Secuencia

Para explorar nuevas posibilidades que expliquen que a pesar de la gran identidad aminoacídica entre ZDS1 y ZDS2 (91%), este último, según nuestros resultados, no sea esencial o carezca de una función biológica, se realizó un alineamiento (clustalw) entre las secuencias ZDS1 y ZDS2 de *D. carota* y la secuencia ZDS de *A. thaliana* (nº de acceso AT3G04870) que ya se ha demostrado que posee actividad z-caroteno desaturasa (Bartley y col., 1999; Dong y col., 2007)

El alineamiento de las tres secuencias muestran una alta identidad aminoacídica; las mayores diferencias se encuentran respecto a la secuencia de *A. thaliana* y están concentradas en los primeros 50 aminoácidos (Figura 19).

Para abordar el análisis a partir del alineamiento, primero se buscaron los dominios y motivos conservados en la secuencia de ZDS de *A. thaliana*. Esto permite optimizar la comparación entre las secuencias, poniendo especial énfasis en aquellas zonas conservadas y por lo tanto potencialmente más importantes.

Para la enzima ZDS de *A. thaliana*, en el sitio NCBI se informa que esta proteína posee un dominio de unión a NAD(P)H/NAD(P)+, denominado NADB_Rossmann. Este dominio es compartido por una gran familia típicamente deshidrogenasas con un motivo aminoacídico GXGXXG. Las tres secuencias *zds* analizadas presentan este dominio (desde el aminoácido 55 al 548) y el motivo GXGXXG conservado (en amarillo Figura 19). Para profundizar en el

análisis, esta vez se buscaron los motivos desaturasa conservados en la ZDS de *A. thaliana* (<http://motif.genome.jp>). La búsqueda entregó 4 motivos conservados, dos de ellos motivos fitoeno desaturasa y los otros dos z-caroteno desaturasa. Estos últimos se destacan con una línea horizontal sobre la secuencia correspondiente (Figura 19).

```

ZDS1 D.c MAAASSSLYFPATFTADSPSFSFSARRPFKPKR--MMLLVRSDDLQNVSDMSSNAPKGLF 58
ZDS2 D.c MAAATSSIIYFPATSRPDSAGISLSRCRPLAQLRTHRVMVVRSDLEKNVSDMSTNAPKGLF 60
ZDS A.t MA---SSVFAATGSLVSP-----PLKSRR----FYVNSSLDSDVSDMSVNAKGLF 45
      **  ** : * . ** . . * : * : * . * . : : ***** *****

ZDS1 D.c PPEPQLYRGPVKLVKVAII GAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYESRPFIGGKVGVSFTDKRGNH 118
ZDS2 D.c PPEPEHYRGPVKLVKVAII GAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYESRPFIGGKVGVSFVDKRNH 120
ZDS A.t PPEPVYPYKGPVKLVKVAII GAGLAGMSTAVELLDQGHEVDIYDSRTFIGGKVGVSFVDRRGNH 105
      **** * : ***** ***** : * . ***** . : ****

ZDS1 D.c IEMGLHVFFGCYNNLFRLLKVKVADKNLLVKEHTHTFVNKGGEIGELDRFRFPVGPAPLHGI 178
ZDS2 D.c IEMGLHVFFGCYNNLFRLLKVKVGAEKNNLVKDHHTFVNKGGEIGELDRFRFPVGPAPLHGI 180
ZDS A.t IEMGLHVFFGCYNNLFRLLMKKVGAEKNNLVKDHHTFINKDGTIGELDRFRFPVGPAPLHGI 165
      ***** : ***** : ***** : ***** : * . * ***** : ***

      zds
ZDS1 D.c NAFLTTNQLKTYDKARNAVALALSPVVRALVDPDGAMKDIRNLDNISFSEWFLSKGGTRK 238
ZDS2 D.c NAFLTTNQLKTYDKARNALALALSPVVRALVDPDGAMRDIRNLDNISFSEWFLSKGGTRK 240
ZDS A.t RAFLVTNQLKPYDKLRNSLALALSPVVKALVDPDGAMRDIRNLDSISFSDWFLSKGGTRA 225
      . *** . ***** . ** * : : ***** : ***** : ***** . ***** : *****

ZDS1 D.c SIQRMWDPVAYALGFIDCDNMSARCMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIRDY 298
ZDS2 D.c SIQRMWDPVAYALGFIDCDNMSARCMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIRDY 300
ZDS A.t SIQRMWDPVAYALGFIDCDNMSARCMLTIFSLFATKTEASLLRMLKGS PDVYLSGPIKQY 285
      ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *

zds1 D.c ITQKGGRFHLRWGCREILYEKSDGQTYISGIAMSKATQKKIVKADAYVAACDVPGIKRL 358
zds2 D.c ITQKGGRFHLRWGCREILYEKSDGQTYISGIAMSKATQKKIVKADAYVAACDVPGIKRL 360
zds A.t ITDRGGRIHLRWGCREILYDKSADGETYVTGLAISKATNKKIVKADVVAACDVPGIKRL 345
      ** : : *** : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

      zds
ZDS1 D.c LPSQWREWEFFDNIYKLVGVPVVTVQLRYNGWVTEMQDLEKSRQLRQAAGLDNLLYTPDA 418
ZDS2 D.c LPSQWREWEFFDNIYKLVGVPVVTVQLRYNGWVTEMQDLERSQLRHAAGLDNLLYTPDA 420
ZDS A.t LPKEWRESRFFNDIYELEGVPVVTVQLRYNGWVTELODIELARQLKRAVGLDNLLYTPDA 405
      ** : : *** . ** : : ** : * ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ZDS1 D.c DFSCFADLALASPEDYYLEGQGSLLQCVLTPGDPYMPPLPNDQIIERVTKQVLTLPSSQG 478
ZDS2 D.c DFSCFADLALASPEDYYLEGQGSLLQCVLTPGDPYMPPLPNGEIIERVTKQVLTLPSSQG 480
ZDS A.t DFSCFADLALASPADYYIEGQGTLLQCVLTPGDPYMRMPNDKIIKAVMQVTELPSSRG 465
      ***** ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

ZDS1 D.c LEVTWSSVVKIAQSILYREGPGKDPFRPDQKTPVGNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQ 538
ZDS2 D.c LEVTWSSVVKIGQSILYREGPGKDPFRPDQRTPVENFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQ 540
ZDS A.t LEVTWSSVVKIAQSILYREAPGKDPFRPDQKTPIKNFFLAGSYTKQDYIDSMEGATLSGRQ 525
      ***** . ***** . ***** : * : *****

ZDS1 D.c ASAYICDAGEELTLRKTIASIDSNTPTAEELTLV 573
ZDS2 D.c ASAYICDAGEDLVALQKKIGVIESNTPTGAELSLV 575
ZDS A.t ASSYICDAGEELAE LNKKLSSSATAVP--DELSLV 558
      ** : ***** : * . * . : . : * ** : **

```

Figura 19. Alineamiento múltiple de secuencias. Se alinearon las secuencias traducidas *in silico* de las proteínas ZDS1 y ZDS2 de *D. carota* (*D.c*) y la proteína ZDS de *A. thaliana* (*A.t*). El asterisco (*) representa la conservación del mismo aminoácido. Los dos puntos (:) indican cambios conservados. El punto (.) indica cambios semi-conservados. En amarillo se destaca el dominio típico del dominio NADB_Rossman y en verde se destacan aminoácidos iguales entre ZDS1 de *D. carota* y ZDS de *A. thaliana* y diferentes respecto a ZDS2 de *D. carota* en el dominio NADB_Rossman y motivos desaturasa, estos últimos destacados una línea horizontal.

DISCUSIÓN

6.1 Secuenciación

Las construcciones diseñadas para gatillar el SGPT, no se diferenciaron mayormente de las secuencias depositadas en la base de datos (*zds1* n°DQ222430 y *zds2* DQ192189), presentando más del 80% de identidad nucleotídica, cantidad necesaria para inducir el silenciamiento de un gen endógeno.

Por otro lado, para asegurar la ausencia de mutaciones en la construcción para la sobre-expresión de *zds1*, se secuenciaron y compararon 3 clones pCR8/*zds1*ATG. La ausencia de mutaciones en la secuencia nucleotídica asegura una correcta traducción y por lo tanto permite cumplir con el objetivo de la sobre-expresión.

A partir de la secuencia consenso, se detectaron 2 diferencias nucleotídicas respecto a la secuencia anotada en la base de datos. La primera de éstas es una mutación silenciosa, es decir, el nuevo codón codifica para el mismo aminoácido, por lo que la proteína no se vería afectada. La segunda, implica el cambio de una Arginina por una Cisteína y si bien el primer aminoácido tiene carga positiva y el segundo no, ambos son aminoácidos polares por lo que sus propiedades fisicoquímicas podrían mantenerse (datos no mostrados). Además, dado que las mutaciones están presentes en los tres

clones, existe la posibilidad que sea un polimorfismo de nucleótido único (SNP) para el gen *zds1*, variedad *Nantes*, en tanto que la variedad anotada en la base de datos corresponde a la variedad *Sativus*.

6.2 Silenciamiento Génico de *zds1* Y *zds2*

Los niveles y la composición de pigmentos de las plantas silenciadas para *zds2* no presentaron diferencias significativas respecto a las plantas silvestres (Figura 17). Este hecho indicaría que: i) el gen *zds2* puede ser compensado por el gen *zds1* (cuyos niveles de expresión no resultaron ser distintos comparados con plantas silvestres (Figura 13) o que ii) el gen *zds2* no tiene una función en la biosíntesis de carotenoides.

Ya que del SGPT del gen *zds1* no se pudo obtener plantas, a pesar de los intentos realizados. Este hecho podría reflejar, tanto la importancia de *zds1* en la biosíntesis de carotenoides en *D. carota*, como la incapacidad de *zds2* para compensar la disminución en los niveles de mensajeros de *zds1*.

Si comparamos nuestros resultados con los análisis de expresión de los genes *zd1* y *zds2* durante el desarrollo de *D. carota* (Figura 3), podríamos sugerir que ZDS1 es requerida para las etapas tempranas del desarrollo de las zanahorias. Si este gen no se expresa, difícilmente se podrían obtener plántulas viables aludiendo a que el gen *zds2* no es capaz de reemplazar la función de *zds1*.

En la literatura, se han reportado casos en que plantas mutantes para genes desaturasa y en particular para el z-caroteno, presentan dificultades de crecimiento (Conti y col., 2004; Bautista y col., 2005; Dong y col., 2007), lo cual es consecuente con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, la estrategia de realizar el SGPT usando las regiones no traducibles para darle especificidad al silenciamiento, resultó ser una estrategia altamente efectiva, debido a que en las plantas silenciadas para *zds2* no disminuyeron los niveles de *zds1* (Figura 13).

La primera estrategia utilizada para obtener embriones y plántulas de zanahoria silenciadas para *zds1* (transformadas con pMD/z1N), fue realizar la embriogénesis somática en condiciones de luz tenue, descrita en algunas publicaciones (Conti y col., 2004; Bautista y col., 2005; Dong y col., 2007). Esta medida no se tradujo en una mayor sobrevida de los explantes, y al igual que en el caso donde los explantes se sometieron a condiciones normales de luz, el proceso de inducción se detuvo y los explantes necrosaron en el segundo medio de inducción (Medio 2). Por ello, además del cultivo en condiciones de luz tenue, se decidió eliminar la presión de selección de los antibióticos a partir del Medio 2 en adelante, a pesar de aumentar la posibilidad de obtener falsos positivos.

Esta medida efectivamente favoreció la sobrevida de los explantes inducidos y permitió obtener las plántulas dobles silenciadas (LI – LIV). Sin embargo, dada la escasa cantidad de tejido de estas plántulas, sólo se pudo

determinar el nivel de transcritos para los genes *zds1*, *zds2* y *psy1*, sin alcanzar a determinar la cantidad y composición de los pigmentos de estas plantas.

Los explantes sometidos a medios de inducción suplementados con ABA, no mostraron diferencias respecto a los explantes sometidos a medios no suplementados. En contraposición a Dong y col., 2007 en donde reportaron que con medios suplementados exógenamente con ABA lograban revertir en parte el fenotipo anormal de plantas de *A. thaliana* mutantes para el gen *zds*. Esto nos indica, que no se trata de un problema respecto a la ausencia de un producto final de la ruta, como en este caso ABA, sino que, como se ha reportado también en la literatura, el problema estaría asociado a las otras funciones reportadas para los carotenoides en las plantas, como lo son, la foto-protección, la disipación del exceso de calor y la foto-morfogénesis, entre otros (Demmig-Adams y Adams, 2002; Rodríguez-Villalón y col., 2010). Estos procesos fisiológicos son fundamentales para la supervivencia de la planta y en el caso de un funcionamiento defectuoso, explicarían la dificultad y prácticamente inviabilidad de obtener las plantas con niveles silenciados para *zds1*.

Además, como se ha reportado en la literatura, la estrategia empleada para gatillar el SGPT permite alcanzar niveles de silenciamiento extremadamente altos (Wesley y col. 2001, Pizarro, 2009). Para el caso de las plantas silenciadas para *zds2*, tres de las cuatro líneas analizadas presentaron sobre un 95% de SGPT (Tabla 3). En el caso de las plantas dobles silenciadas, si consideramos que se utilizó una construcción con un promotor doble CaMV

35S (pMC/z1N) y que además, los niveles de mensajeros de *zds1* en las escasas plántulas obtenidas no fueron demasiado elevados, resulta razonable pensar que la imposibilidad de obtener plantas podría atribuirse a niveles eventualmente altos de silenciamiento para *zds1*. Además, los niveles de silenciamiento de estas plántulas se correlacionaron bien con el fenotipo de éstas. Es decir, la plántula con un 59 % de SGPT (LI) para *zds1* tiene un aspecto relativamente similar al de una planta silvestre, muy distinto a la plántula con un 89% de silenciamiento (LIV) que presenta un fenotipo ciertamente aberrante (Figura 10), al igual que las plantas LII y LIII para las cuales no fue posible realizar los análisis moleculares debido a que la calidad y cantidad del ARN extraído fue deficiente. Esta correlación entre el fenotipo y el porcentaje de silenciamiento, estaría nuevamente evidenciando que el gen *zds1* sería el fundamental y responsable de la actividad z-desaturasa en *D. carota*, y que mayores niveles de silenciamiento podrían ser letales.

Otro aspecto interesante de las plantas dobles silenciadas, es que comprobamos que la señal de silenciamiento para *zds2* se “heredó”. Es decir, la inserción en el genoma de la construcción para gatillar el SGPT *zds2* se mantuvo de forma estable durante todo el proceso de embriogénesis para la obtención de las plantas silenciadas para ambos genes. Cabe recordar que las plantas dobles silenciadas se obtuvieron a partir de plantas ya silenciadas para *zds2*, y pudimos comprobar que los niveles de mensajero de este gen se mantuvieron tan bajos como en las plantas silenciadas solo para *zds2* (Tabla 3 y Tabla 4).

Por otro lado, como se ha reportado en otros trabajos, las rutas metabólicas y en este caso de biosíntesis de carotenoides, responde de forma global ante alteraciones generadas artificialmente, como el silenciamiento (Diretto y col., 2006; Diretto y col. 2007; Pizarro, 2009), o la sobre-expresión de un gen (Morris y col., 2006).

En el caso de las plantas silenciadas para *zds2*, los resultados muestran que la respuesta de los genes al silenciamiento es diferente. Por un lado se observa la sobre-expresión del gen *psy1* de alrededor de tres veces, y por otro lado *psy2* no altera sus niveles en estas plantas silenciadas (Figura 13). El hecho de que genes parálogos se afecten de forma distinta frente a silenciamiento de otro gen de la vía ha sido previamente reportado (Diretto y col., 2006; Diretto y col., 2007) y podría estar reflejando la alta especificidad de regulación descrita para la ruta.

La sobre-expresión de *psy1* indica que la expresión de este gen es sensible al silenciamiento de *zds2*, sin embargo, el hecho de que no exista una variación en los niveles de carotenoides de estas plantas dificulta la interpretación de este resultado. Una posibilidad sería que dado el alto nivel de regulación de la ruta, la sobre-expresión de *psy2* sea atenuada por regulaciones posteriores tanto a nivel transcripcional como traduccional o incluso postraduccional, que diluyan el efecto de sobre-expresión. Un caso similar se describe al silenciar el gen licopeno *ε*-ciclase (*lcyε*), en donde se esperaba la disminución de los niveles de luteína, ya que LCY-E es la primera enzima que dirige la vía hacia la síntesis de luteína (Figura 2), sin embargo, los niveles de

este pigmento permanecieron relativamente inalterados respecto a las plantas silvestres (Diretto y col. 2006).

Por el contrario, para las plantas dobles silenciadas los niveles de *psy2*, un gen que en las plantas con SGPT para *zds2* permanecen constantes, en estas plantas disminuyen considerablemente (Figura 14), lo que reflejaría que la expresión de la vía completa esta disminuida y se convierte en un antecedente más para explicar la dificultad de obtener estas plantas y de la importancia del gen *zds1* en la biosíntesis de carotenoides en *D. carota*.

Si bien se decidió medir los niveles de *psy*, porque es un gen que se ha planteado como clave en la ruta de biosíntesis de carotenoides (Welsch y col., 2000; Welsch y col., 2003; Mass y col., 2009), para aventurar alguna explicación integral respecto al comportamiento completo de la vía, hace falta medir los niveles de expresión de otros genes carotenogénicos.

La ausencia de diferencias entre los pigmentos de las plantas con reducidos niveles de expresión del gen *zds2*, respecto a plantas silvestres (Figura 17), tiene dos explicaciones posibles. La primera tiene que ver con que la disminución en los niveles de mensajero de *zds2* y por lo tanto la resultante merma en la actividad de esta enzima, podría estar siendo compensada por la actividad de ZDS1. La otra posibilidad es que, a pesar de que el gen *zds2* es transcripcionalmente activo e incluso sus niveles varían significativamente durante el desarrollo (Fuentes, 2009), este gen no sea esencial o que directamente que carezca de una función en la ruta carotenogénica. Esto puede deberse a que los mensajeros no se traduzcan, o a que una vez traducidos, la

enzima sea inactiva tanto por una regulación post-traducciona l o simplemente por diferencias aminoacídicas respecto a ZDS, situación que se discutirá más adelante.

Para dirimir respecto a esta dicotomía, serían fundamentales los análisis de los pigmentos de las plantas silenciadas para el gen *zds1* y también de las plantas con silenciamiento simultáneo de ambos genes. Sin embargo, como ya se mencionó, no se pudo obtener plantas silenciadas sólo con el gen *zds1* y, de las plántulas silenciadas simultáneamente para *zds1* y *zds2*, el escaso tejido obtenido impidió realizar el análisis de los pigmentos para estas plantas. El fenotipo que presentaron estas plantas, de un reducido tamaño, desarrollo mínimo de raíz y tejido foliar y, sobretodo que se obtuvieron en condiciones de luz tenue, coincide con el fenotipo descrito para mutantes con niveles reducidos de pigmentos. Además estos resultados sugieren fuertemente que *zds2* no podría suplir la disminución de los niveles de *zds1* y aunque no tenemos evidencia directa, los resultados sugieren que el gen *zds2* no tiene función carotenogénica.

6.3 Sobre-expresión del gen *zds1* en *Nicotiana tabacum*

Debido a que el silenciamiento génico del gen *zds1* resultó prácticamente inviable, para poder estudiar su función, decidimos sobre-expresarlo en las plantas de tabaco.

Se transformaron plantas de tabaco porque además de ser una planta modelo donde se han realizado trabajos con carotenoides (Ralley y col., 2004;

Zhu y col., 2007; Gerjets y col., 2007) y ser un procedimiento instaurado en el laboratorio, los tiempos para obtener tabacos transgénicos (3 meses aprox.) son considerablemente menores a los tiempos para obtener zanahorias transgénicas (6 meses). Además, como se contaba con el gen *zds1* de zanahoria, la estrategia de sobre-expresarlo en plantas de zanahoria tiene altas posibilidades de gatillar el SGPT y volver a la situación de no poder obtener plantas viables.

Con respecto a la organogénesis de tabaco, fue un procedimiento altamente eficiente. A partir de 4 transformaciones, cada una con 20 explantes, se obtuvieron hasta las etapas finales de organogénesis alrededor de 10 explantes, cada uno de ellos con 5 plántulas en promedio. De estas plántulas, 25 se crecieron para ser pasadas a tierra y finalmente se obtuvieron 20 plantas aclimatadas creciendo en tierra, lo que representa un 5% de eficiencia. Si además consideramos que de 10 plantas analizadas 9 son transgénicas, obtenemos una eficiencia de transformación de un 4.5%. Este porcentaje es muy superior al 2.5% obtenido para la transformación de zanahorias (Flores, 2009) que ya es un porcentaje de transformación alto.

La sobre-expresión de *zds1* de *D. carota* en plantas de tabaco fue verificada mediante RT-PCR convencional con partidores específicos de la región 3'NTR para *zds1* de zanahoria, los cuales no hibridan en ningún gen en tabaco. De este modo se comprobó que 8 de 9 plantas analizadas expresaron el gen *zds1* de *D. carota* (Figura 16), lo cual también reafirma lo ventajoso de la transformación de plantas de tabaco. Las plantas regeneradas fueron

traspasadas a tierra y mantenidas en invernadero, mientras se realizaron los análisis moleculares y bioquímicos. Actualmente, se espera la floración de las plantas para la obtención de la generación T1.

Como se observa en la Figura 18, dos de las tres líneas analizadas poseen un aumento significativo de los carotenoides totales respecto a las plantas silvestres. Este aumento estaría indicando que el gen *zds1* efectivamente codifica para una proteína activa, que participaría en la biosíntesis de carotenoides. Es importante tener en cuenta para el análisis de las plantas transgénicas, que si bien todas las plantas se transformaron con la misma construcción, la inserción de ésta es azarosa en el genoma para cada planta. Esto implica que el contexto genético donde se inserta la construcción, en algunos casos determina el nivel de expresión del transgen. Otra explicación para justificar las diferencias de expresión en una planta transgénica, es la variación somaclonal. Este es un fenómeno que se ha descrito principalmente en plantas que se obtienen a partir de cultivos de tejidos (como la organogénesis somática en el caso de los tabacos) y que consiste en cambios genéticos que pueden ir desde un re-arreglo cromosómico hasta una mutación en un nucleótido puntual y ocurre solo en algún(os) clon(es) obtenido a partir de un mismo tejido.

Una alternativa para evaluar este tipo de diferencias, sería realizar ensayos de RT-PCR cuantitativo de estas plantas para el transgen y analizar si esas diferencias se correlacionan con las diferencias en los pigmentos de estas

plantas. Otra alternativa, sería analizar un número mayor de plantas, así aumentando el número de muestras, la tendencia se haría más robusta.

Comenzando el análisis de los pigmentos propiamente tal, resulta interesante notar que, no obstante, existe un importante aumento en los carotenoides totales en L1 (1.9 veces) y L11 (4.4 veces). No obstante, este aumento no se explica con los pigmentos que se detectaron mediante el HPLC, como son luteína, β -caroteno y clorofila. Una de las posibilidades es que este gran aumento se deba a la acumulación de un pigmento no detectado, por lo que se podría ajustar las mediciones de HPLC de manera de buscar posibles intermediarios apolares que podrían salir a tiempos posteriores a los 40 minutos estandarizados para el HPLC.

Según el análisis estadístico realizado, la línea L11 también tiene aumentos significativos para la clorofila de 6.2 veces y para el carotenoide desconocido de 7.2 veces y aunque no es significativo, también aumenta la luteína 1.6 veces. Para la L1, si bien su único aumento estadísticamente significativo son los carotenoides totales con 1.9 veces, también aumenta su contenido de clorofila 2.1 veces, la luteína 1.4 veces y el β -caroteno en 1.8 veces.

Estos datos podrían llevarnos a plantear que existe un nivel de expresión mínimo necesario, que genere una variación importante en toda la vía y por lo tanto se traduzca en un aumento y variación considerable en los carotenoides. Este nivel estaría sobrepasado en el caso de la L11 en donde si se aprecian diferencias significativas en los carotenoides totales y algunos otros pigmentos.

En el caso de la L1, la expresión estaría bajo este posible nivel mínimo, lo que se refleja en un menor aumento de carotenoides totales y además, no se observan variaciones significativas en los otros pigmentos detectados.

Con respecto al carotenoide desconocido, podemos decir que el carotenoide más similar del que se tenía un estándar y es la astaxantina. El tiempo de retención de nuestro carotenoide es aproximadamente 2.5 minutos, que representa aproximadamente 0.5 minutos menos que el tiempo de elusión de la astaxantina, por lo que la polaridad de este carotenoide desconocido debe ser mayor al de astaxantina.

6.5 Función Órgano-específica de los Genes y Análisis de las Secuencias

Con respecto a la órgano-especificidad entre los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota*, hasta ahora la única planta donde se han reportado dos potenciales genes *zds*, podemos decir que: el hecho de que al silenciar *zds2* los niveles de pigmentos no varíen y que, al silenciar o tratar de silenciar *zds1*, se obtenga un fenotipo con características de inviabilidad para la planta, no se condice con lo esperado y reportado en la literatura para genes con una función órgano-específica. En términos generales se ha visto que uno de los genes se expresa ubicuamente en la planta o en un órgano preferentemente y los niveles de expresión del otro gen aumentan en determinado estado de desarrollo y/o para ciertos órganos (Ronen 2000; Galpaz y col., 2006; Giorio y col., 2008; Alquézar y col., 2009; Devitt y col., 2010). Por este motivo, si bien se podría esperar que al silenciar uno de ellos las plantas no sean viables, al silenciar el otro se

deberían obtener diferencias en la composición de pigmentos de algún órgano en particular respecto a plantas silvestres.

Por ello, nuestros resultados descartaron la órgano-especificidad de estos genes y posicionaron a *zds1* como el gen fundamental. Para determinar si el gen *zds1* posee una función en la ruta de biosíntesis de *D. carota*, utilizamos la estrategia de sobre-expresión, estrategia que ya ha sido ampliamente utilizada para estudios de carotenoides en plantas (Giuliano y col., 2008; Kim y col., 2009).

Adicionalmente, se proyecta realizar a corto plazo estudios proteicos (con anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio para ZDS), tanto de las plantas con los niveles silenciados de *zds2* como sobre-expresados para *zds1*. Se espera que de la comparación de los diferentes tejidos, se observe una correlación entre la disminución de los mensajeros de *zds2* o aumento de *zds1* y su correspondiente correlación a nivel proteico.

Además, de la comparación entre zanahorias silvestres y zanahorias silenciadas para *zds2* se podrá definir si *zds2* efectivamente se traduce en las plantas silvestres. En tal caso, la explicación de su falta de función sería una regulación post-traducciona l o la pérdida de actividad debido a alguna mutación.

En el caso que el gen *zds2* sea traducido pero que no presente una función biológica, podría deberse a las diferencias aminoacídicas entre ZDS1 y ZDS2, causado por algún cambio por ejemplo en un aminoácido del sitio activo o algún aminoácido que impida que la proteína se ensamble en el complejo

multienzimático en la membrana del tilacoide, tal como fue propuesto por Cunningham, 2002.

Del alineamiento de secuencias, destacamos tres diferencias entre *zds1* y *zds2* y por lo tanto, posibles mutaciones (destacadas en verde en la Figura 19), a las que potencialmente se les podría atribuir la ausencia de función de la enzima ZDS2. Estos aminoácidos se encuentran presentes en la enzima ZDS de *A. thaliana*, cuya funcionalidad ya se ha demostrado (Dong y col., 2007) y en la ZDS1 de *D. carota*, que nosotros proponemos como funcional, y se encuentran modificados en la ZDS2 de *D. carota*. Asimismo, estas tres diferencias se encuentran dentro del dominio NADB_Rossmann, las dos primeras están además dentro un motivo predicho como z-caroteno desaturasa y la tercera representa el cambio más radical de una Serina por una Valina. Estas regiones podrían ser importantes y por lo tanto estas diferencias podrían ser buenos candidatos para explicar la ausencia de la disminución de carotenoides en plantas silenciadas para *zds2*.

Es importante destacar que ambos genes poseen una alta identidad de secuencia nucleotídica que también se traduce en una elevada identidad a nivel aminoacídico, sugiriendo que nos encontramos frente a un caso de duplicación génica, sin embargo una duplicación génica sin función aparente. En la literatura se han reportado varios casos de duplicación génica cuya función estaría asociada a estrategias genéticas de mejorar la regulación de alguna vía (Li y col., 2008), otorgar órgano-especificidad (Devitt y col., 2010) o favorecer la diversificación (Fucile y col., 2008; Romanel y col., 2009). Dado que nuestra

hipótesis plantea que este caso de duplicación génica posee alguna de estas características, en base a nuestros resultados, debemos rechazar nuestra hipótesis.

En suma, nuestros datos apuntan a que el gen *zds1* sería el responsable de la función z-caroteno desaturasa en *D. carota*. Además, no existiría una órgano-especificidad entre los genes *zds1* y *zds2* y, a pesar del 91% de identidad aminoacídica entre ellos, *zds2* no puede suplir la función de *zds1*.

Finalmente, podemos decir que este trabajo ha contribuido al estudio y la comprensión del metabolismo y la fisiología de la ruta de biosíntesis de carotenoides, en particular, en aportar a la determinación de la función de los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota*.

7. CONCLUSIONES

- Los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota* no poseen un función órgano específica. Esto se debe a que al silenciar el gen *zds2*, no se alteran los niveles ni la composición de pigmentos en hojas y en raíces modificadas en las plantas transgénicas. Si a este resultado, le sumamos la gran dificultad para obtener plántulas e imposibilidad de obtener plantas adultas con el gen *zds1* silenciado, nos estaría indicando que el gen *zds1* es el responsable de llevar a cabo la función z-caroteno desaturasa en la planta completa de zanahoria y el gen *zds2* se trataría de una duplicación y/o redundancia génica que si bien es transcripcionalmente activo, no sería esencial y eventualmente podría ser suplido por ZDS1 pero no viceversa.
- El gen *zds1* de *D. carota* es funcional, ya que al sobre-expresarlo en las plantas de tabaco, se altera la cantidad de carotenoides. No obstante, aunque se logró determinar este gran aumento en la cantidad de carotenoides totales, no se logró correlacionar con el aumento de uno o varios pigmentos en particular, por lo que se requieren mayores análisis para poder definir la respuesta de la ruta ante esta sobre-expresión.

- Los resultados obtenidos, permiten validar las estrategias de SGPT y sobre-expresión como herramientas útiles para estudiar la función de los genes. En el caso del silenciamiento génico, se logró la especificidad esperada y niveles muy altos en el porcentaje de silenciamiento de los genes en estudio. En el caso de la sobre-expresión, se observó una correlación entre la expresión del transgen (*zds1* de *D. carota*) y los niveles de carotenoides totales.

8. PROYECCIONES

- Para poder dirimir respecto a algunas situaciones y confirmar nuestros resultados, se espera realizar experimentos con anticuerpos desarrollados en el laboratorio para ZDS. Es decir, se podrá determinar de una manera directa la relación entre la transcripción, los niveles de pigmentos y de proteínas en los diferentes tejidos de plantas silenciadas para *zds2*, plantas que sobre-expresan *zds1* y plantas silvestres.
- Además, se analizarán un mayor número de líneas de tabaco que sobre-expresan *zds1* con la finalidad de aumentar la robustez de los resultados y para optimizar las mediciones de HPLC de modo de detectar la presencia de posibles pigmentos responsables de la sobre expresión del gen *zds1* que no se identificaron en esta oportunidad.
- Dado que los altos niveles de silenciamiento para el gen *zds1* podrían haber impedido la obtención de plantas, una alternativa sería generar una nueva construcción con un promotor inducible, de esta manera, se podrían obtener plantas y confirmar si la causa del problema son los bajos niveles de mensajeros de este gen.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht M, Sandmann G** (1994) Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increases activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiol* 105: 529-534.
- Alquézar B, Zacarías L, Rodrigo MJ** (2009) Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene beta-cyclase from Citrus and its relation to lycopene accumulation. *J Exp Bot* 60: 1783-1797.
- Armstrong GA, Hearst JE** (1996) Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J* 10: 228-237.
- Bartley GE, Scolnik PA, Beyer P** (1999) Two *Arabidopsis thaliana* carotene desaturases, phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase, expressed in *Escherichia coli*, catalyze a poly-cis pathway to yield pro-lycopene. *Eur J Biochem*. 259:396-403
- Bartley GE, Scolnik PA** (1995) Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *Plant Cell* 7:1027-1038.
- Bartley GE, Scolnik PA** (1993) cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J Biol Chem* 268:25718-25721.
- Baron M, Davies S, Alexander L, Snellgrove D, Sloman A** (2008) The effect of dietary pigments on the coloration and behavior of flame-red dwarf gourami, *Colisa lalia*. *Anim Behav* 75:1041-1051.
- Baulcombe D** (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
- Bautista JA, Rappaport F, Guergova-Kuras M, Cohen RO, Golbeck JH, Wang JY, Béal D, Diner BA** (2005) Biochemical and biophysical characterization of photosystem I from phytoene desaturase and z-carotene desaturase deletion mutants of *Synechocystis* Sp. PCC 6803: evidence for PsaA- and PsaB-side electron transport in cyanobacteria. *J Biol Chem* 280:20030-41.
- Bonk M, Hoffmann B, von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P** (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes *in vitro* reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem* 247:942-950.
- Bramley PM** (2002) Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53:2107-2113.
- Britton, G; Liaaen-Jensen, S; Pfander, H.** 2004. Carotenoids Handbook Britton, G; Liaaen-Jensen, S; Pfander, H (Eds). Mercadante A.Z.; Egeland E.S. (compilers) Birkhäuser Verlag, Basel-Boston-Berlin.

- Fraser PD, Bramley PM** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res* 43:228-265.
- Fernandez AI, Viron N, Alhaghdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-Chamley M, Rothan C, Hilson P** (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. *Plant Physiol* 151:1729-1740.
- Flores C** (2009) Desarrollo de herramientas moleculares para el estudio de la función de los genes *zds1* y *zds2* en *Daucus carota* (zanahoria). Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fucile G, Falconer S, Christendat D** (2008) Evolutionary diversification of plant shikimate kinase gene duplicates *PLoS Genet* 4:e1000292.
- Fuentes P** (2009) Efecto del desarrollo y la luz en los niveles de RNA mensajero de seis genes de la ruta carotenogénica en *Daucus carota* L. zanahoria. Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J** (2006) A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell* 18:1947-1960.
- Gerjets T, Sandmann M, Zhu C, Sandmann G** (2007) Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in leaves and flowers of tobacco species. *Biotechnol J* 2:1263-1269.
- Giorio G, Stigliani AL, D'Ambrosio C** (2008) Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) – new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* 275: 527–535
- Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, Beyer P, Taylor MA** (2008) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* 26:139-145.
- Handelman GJ** (2001) The evolving role of carotenoids in human biochemistry. *Nutrition*. 17:818-822.
- Hirschberg J, Cohen M, Harker M, Lotan T, Mann V, Pecker I** (1997) Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure & Appl Chem*. 69: 2151-2158.
- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4: 210-218.
- Jayaraj J, Devlin R, Punja Z** (2008) Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Res* 17:489-501
- Just BJ, Santos CA, Fonseca ME, Boiteux LS, Oloizia BB, Simon PW** (2007) Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet* 114:693-704.
- Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, Koshiha T, Kamada H** (2006) Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223:637-645.

- Kim JE, Cheng KM, Craft NE, Hamberger B, Douglas CJ** (2010) Over-expression of *Arabidopsis thaliana* carotenoid hydroxylases individually and in combination with a β -carotene ketolase provides insight into in vivo functions. *Phytochem* 71:168-78.
- Kumagai MH, Keller Y, Bouvier F, Clary D, Camara B** (1998) Functional integration of non-native carotenoids into chloroplasts by viral-derived expression of capsanthin-capsorubin synthase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 14:305-315.
- Li F, Murillo C, Wurtzel ET** (2007) Maize Y9 encodes a product essential for 15-cis-zeta-carotene isomerization. *Plant Physiol* 144:1181-9
- Li F, Vallabhaneni R, Yu J, Rocheford T, Wurtzel ET** (2008) The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol* 147: 1334-1346.
- Maass D, Arango J, Wüst F, Beyer P, Welsch R** (2009) Carotenoid crystal formation in *Arabidopsis* and carrot roots caused by increased phytoene synthase protein levels *PLoS One* 4:e6373.
- Matthews PD, Luo R, Wurtzel ET** (2003) Maize phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *J Exp Botany* 54(391):2215-30.
- Miki D, Shimamoto K** (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol* 45:490-495.
- Milborrow BV** (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J Exp Bot* 52(359):1145-1164.
- Morris WL, Ducreux LJ, Hedden P, Millam S, Taylor MA** (2006) Overexpression of a bacterial 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase gene in potato tubers perturbs the isoprenoid metabolic network: implications for the control of the tuber life cycle. *J Exp Bot* 57:3007-3018.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol.* 56:165-185.
- Niyogi KK** (1999) PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50:333-359.
- Ocares N** (2010) Desarrollo de Estrategias Moleculares para el Estudio de la Función del gen licopeno β -ciclase 2 (*lcyb2*) en *Daucus carota* (zanahoria). Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Pizarro L** (2007) Construcción de vectores para Silenciamiento Génico Post-Transcripcional de la familia de genes que codifican para la enzima licopeno β ciclase de *Daucus carota*.

Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Pizarro L** (2008) Estudio de la función del gen licopeno β -ciclase (*lcyb*) en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota*. Tesis de Magíster en Ciencias, mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Pizarro L Stange C** (2009) Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Invest Agr* 36: 143-162.
- Ralley L, Enfissi EM, Misawa N, Schuch W, Bramley PM, Fraser PD** (2004) Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J* 39:477-486
- Rodrigo MJ, Marcos JF, Alférez F, Mallent MD, Zacarías L** (2003) Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J Exp Bot* 54:727-738.
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Rodríguez-Concepción M** (2010) Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11626-11631.
- Rodríguez-Villalón A, Gas E, Rodríguez-Concepción M** (2009) Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown Arabidopsis seedlings. *Plant J* 60:424-435.
- Romanel EA, Schrago CG, Couñago RM, Russo CA, Alves-Ferreira M** (2009) Evolution of the B3 DNA binding superfamily: new insights into REM family gene diversification. *PLoS One* 4:e5791
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J** (2000) An alternative pathway to β -carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of beta and old gold color mutation in tomato. *Proc Natl Acad Sci* 97:11102-11107.
- Schuch W, Bird CR, Ray J, Smith CJ, Watson CF, Morris PC, Gray JE, Arnold C, Seymour GB, Tucker GA, Grierson D** (1989) Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening. *Plant Mol Biol* 13: 303-311.
- Schofield A, Paliyath G** (2005) Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol Biochem* 43:1052-1060.
- Stange C, Fuentes P, Handford M and Pizarro L** (2008) *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol Res* 41:289-301.
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JA** (2003) Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol* 131:1591-1601.
- Tafti M, Ghyselinck NB** (2007) Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol* 64:1706-1711.
- Telfer A** (2005) Too much light? How β -carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochem Photobiol Sci* 4: 950 – 956.

- von Lintig J** (2010) Colors With Functions: Elucidating the Biochemical and Molecular Basis of Carotenoid Metabolism. *Annu Rev Nutr* 30: 5.1 – 5.22
- von Lintig J, Welsch R, Bonk M, Giuliano G, Batschauer A, Kleinig H** (1997) Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapsis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* 12: 625-634.
- Walter MH, Floss DS, Strack D** (2010) Apocarotenoids: hormones, mycorrhizal metabolites and aroma volatiles. *Planta* 232:1-17.
- Welsch R, Medina J, Giuliano G, Beyer P, Von Lintig J** (2003) Structural and functional characterization of the phytoene synthase promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216:523-534.
- Welsch R, Beyer P, Hugueney P, Kleinig H, von Lintig J** (2000) Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* 211: 846-854.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27:581-590.
- Woitsch S, Römer S** (2003) Expression of xanthophyll biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiol* 132:1508-1517.
- Wozniak A** (2008) Influencia del metabolismo aerobio en la expresión de los genes de carotenogénesis y la biosíntesis de pigmentos en *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Zhu C, Yamamura S, Nishihara M, Koiwa H, Sandmann G** (2003) cDNAs for the synthesis of cyclic carotenoids in petals of *Gentiana lutea* and their regulation during flower development. *Biochim Biophys Acta* 1625:305-308.
- Zhu C, Gerjets T, Sandmann G** (2007) *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial *crtO* ketolase gene. *Transgenic Res* 16:813-821

ANEXO DE TRABAJO ADELANTADO

La presente tesis corresponde a la continuación del trabajo desarrollado en el marco del Seminario de Título para optar el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular (Flores, 2009).

Algunos procedimientos y resultados de dicho trabajo se mencionan a continuación, con el fin de contextualizar y entregar información relevante para facilitar la lectura, comprensión y análisis de esta tesis.

10.1) CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

Generación de la construcción pMD/z1

La construcción pMD/z1 se generó con el objetivo de gatillar el SGPT del gen *zds1*. Para esto, se amplificó la región 3'NTR (295pb) del gen *zds1* desde ADNc de *D. carota*. Este fragmento se clonó en orientación sentido respecto al promotor en el vector Gateway® pTOPO y posteriormente en antisentido en el vector Gateway® pCR8. La identidad del fragmento se corroboró secuenciándolo (*Macrogen Corp., USA*) desde la construcción pTOPO/z1N y la construcción pCR8/z1N se usó para recombinar con el vector de pMDC32 originando pMD/z1N. De esta manera, se espera que cuando la construcción pM/z1N se exprese, el fragmento en antisentido hibride con el ARNm endógeno en orientación sentido formando el ARN doble hebra para gatillar el SGPT.

Generación de la construcción pHG/z2

La construcción pHG/z2 se generó con el objetivo de gatillar el SGPT del gen *zds2*. Para esto, se amplificó la región 3'NTR (271 pb) del gen *zds2* desde ADNc de *D. carota* y este fragmento se clonó en orientación sentido respecto al promotor en el vector Gateway® pTOPO. La construcción pTOPO/z2 se utilizó para recombinar con el vector de pHellsgate dando origen a pHG/z2. Tanto la identidad del fragmento clonado como su orientación se comprobaron mediante la secuenciación de pHG/z2 (*Macrogen Corp., USA*). De esta manera se espera que la horquilla de ARN que gatille el SGPT se obtenga directamente de la transcripción de esta construcción.

Funcionalidad de las construcciones pMD/z1N y pHG/z2

Para comprobar la funcionalidad de las construcciones pMD/z1N y pHG/z2N, se agroinfiltraron hojas de tabaco con cultivos de *A. tumefaciens* portando cada una de estas construcciones. Luego, se realizó un RT-PCR desde el tejido de tabaco agroinfiltrado para detectar la expresión de las regiones NTR de los genes *zds1* y *zds2* de *D. carota* en tabaco.

10.2) TRANSFORMACIÓN ESTABLE Y REGENERACIÓN DE PLANTAS

Para la transformación estable de zanahorias, se siguió un protocolo previamente estandarizado (Chen y Punja, 2002) e implementado en el laboratorio, en el que se utilizan explantes (epicotilos) de plántulas de zanahoria de dos semanas cultivadas *in vitro*. Para obtener zanahorias *in vitro*, se siembran semillas estériles en frascos de medio MS (Murashige & Skoog) y se cultivan en condiciones de fotoperíodo (16h luz y 8h oscuridad).

Los explantes de zanahoria se co-incubaron con el cultivo de *A. tumefaciens* portando cada una de las construcciones (pMD/z1N y pHG/z2) durante 10 minutos. Luego, los explantes se depositaron en una placa de MS sin antibiótico y condiciones de oscuridad durante 1,5 días aproximadamente. Posteriormente, se traspasaron los explantes a las placas respectivas para seleccionar el tejido transformante e inducir el proceso de embriogénesis somática.

Este proceso de embriogénesis consta de tres etapas y a continuación se detallan los medios para el caso de la transformación con la construcción pHG/z2. El primer medio (medio I) contenía kanamicina (25 mg/L), la auxina 2,4D (1 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Después de 5 semanas, los explantes se pasaron al segundo medio (medio II), que estaba conformado por kanamicina (50 mg/L), 2,4D (0,5 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Después de permanecer 4 semanas en el segundo medio, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, los explantes desarrollaron embriones en estado

inmaduro. Al finalizar las 4 semanas, se pasaron al tercer medio (medio III). En éste se aumentó la concentración de kanamicina a 100 mg/L, se eliminó la hormona 2,4D para favorecer la maduración de los embriones y el cefotaxime se redujo a 150mg/L. Finalmente, luego de 4 semanas, las plántulas regeneradas se pasaron a frascos de MS donde éstas elongaron y enraizaron. De esta forma, al cabo de 5 meses, se obtuvieron plántulas con raíces apropiadas para su aclimatación a tierra.

10.3) ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS PLANTAS

Para confirmar la inserción de la construcción pHG/z2 en el genoma de las zanahorias obtenidas producto de la embriogénesis, se extrajo el ADN de las hojas y se realizó un PCR con partidores para el promotor CaMV 35S. Este promotor dirige la expresión de la construcción pHG/z2 en la planta y no es parte del genoma de las zanahorias silvestres. Como resultado, se obtuvo una banda del tamaño esperado de 400pb en las 9 líneas analizadas. De este modo concluimos que estas plantas regeneradas son transgénicas ya portan la construcción para gatillar el silenciamiento génico de *zds2* y el protocolo de transformación y regeneración de plantas se logró con éxito.

10.4) AGRADECIMIENTO

Generación de la construcción pCR8/z1A

La amplificación de la región codificante del gen *zds1*, su clonación y secuenciación en el vector de entrada pCR8, fue realizado por Guillermo Wegener como parte de su Seminario de Título. Esta construcción fue amablemente facilitada y permitió obtener la construcción pGW/z1A para sobre-expresar el gen *zds1* de *D. carota* en *N. tabacum*.