

UCH-FC
MSB-BMCM
M 843
C.1



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

**“Caracterización funcional del gen licopeno β -ciclase1
(*lcyb1*) de *Daucus carota* (zanahoria) mediante un
aumento en sus niveles de expresión en modelos
vegetales”**

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 Celular,
Molecular y Neurociencias**

Facultad de Ciencias

Por

Juan Camilo Moreno Beltrán

Marzo, 2012

Directora de Tesis: Dra. Claudia Stange K.
Co-Director de Tesis: Dr. Michael Handford

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

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

JUAN CAMILO MORENO BELTRÁN

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada rendido el día 07 de Marzo de 2012.

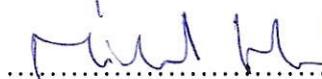
Director de Tesis:

Dra. Claudia Stange



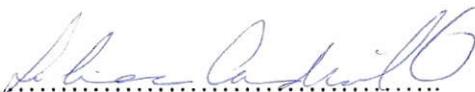
Co.Director de Tesis

Dr. Michael Handford

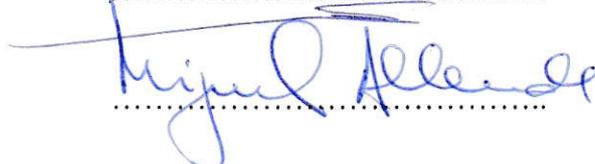


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Liliana Cardemil



Dr. Miguel Allende





“Esta tesis fue financiada por el programa de Formación de Capital Humano Avanzado de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) del gobierno de Chile mediante la beca de Magister Nacional folio N°22110124”



A mi familia que siempre estuvo ahí y me apoyo incondicionalmente. A mi gran amor, y a todos los que estuvieron presentes durante este largo proceso.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a todo el Team CSK por tantos momentos compartidos en el lugar de trabajo. Muchas gracias también por todas las experiencias y convivencias disfrutadas al máximo en estos últimos años. También me gustaría agradecer a mi tutora la Dra. Claudia Stange por depositar su confianza en mí y apoyarme con todas mis ideas. Gracias a mi cotutor el Dr. Michael Handford por su excelente disposición para responder siempre a cualquier tipo de duda u ofrecer su ayuda para resolver algún problema.

Quiero agradecer a la profe Lore y a la profe Liliana por siempre estar dispuestas a preguntar y criticar de forma constructiva en los seminarios y ensayos de tesis presentados por mí.

Por otra parte, quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio Lore P., Pauli F., Carlos F., Ariel, Clio, Panchi, Sofí, Carlitos R., Joel, Dani Utz, Dani U., Koke, Orlando, Fernando y en especial a Diego y la Fran con los que compartí muchísimos momentos alegres.

Muchísimas gracias al Seba U. y a Ange que a lo largo de los años se han encargado de mantener el orden y la “calma” en el laboratorio.

Gracias a mis amigos Marito, Isma, Herny, JuanMa con los cuales se ha podido ir desarrollando una bonita amistad. Gracias al Lucho, nuestro entrenador, pero más que entrenador, un verdadero amigo.

Gracias a mis tres amigos y compañeros de colegio, Shago, Nacho y Pato, con los cuales compartí miles de experiencias, viajes y anécdotas graciosas.

Acercándonos al final, quisiera que en las siguientes líneas mi mejor amiga y actual polola pudiera darse cuenta de al menos una pequeña parte de la gratitud que tengo hacia ella, no sólo por ser la mejor polola del mundo, por ser tierna, cariñosa, comprensiva, sino porque además de ser como es y tener miles de cualidades y virtudes maravillosas, me ayudó siempre que lo necesité a través de esta etapa de mi vida no sólo dándome ánimo y apoyándome sino también aportándome ideas y críticas sobre mi trabajo. Gracias por ser tan linda.

Por último quiero agradecer a mi familia, abuelos, tíos, primos que a pesar de que no se encuentran en Chile yo se que van a estar muy orgullosos de mí. Y por supuesto gracias a mis papas y hermanos que siempre han estado ahí para mí, apoyándome y dándome ánimo en los momentos no tan buenos. Gracias por la confianza que me han depositado y por creer en mí, gracias por estos once años en otro país del cual ya somos parte. Pero sobre todo muchas gracias por darme lo más importante y valioso que tengo para enfrentar al mundo, gracias por hacerme y formarme así como soy, con lo mejor de ustedes dos, todo lo que yo soy y he logrado hasta ahora se lo debo a ustedes dos, y por eso no me queda nada más que decir. Gracias y los quiero mucho.

INDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	vi
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Biosíntesis, estructura y función de los carotenoides</i>	1
1.2 <i>Regulación de la ruta carotenogénica en las plantas</i>	7
1.3 <i>Importancia del gen lcyb en la ruta de biosíntesis de los carotenoides</i>	9
1.4 <i>Sobre-expresión del gen lcyb1 en modelos vegetales</i>	14
1.5 <i>Daucus carota como modelo de estudio</i>	15
1.6 <i>Estrategia a utilizar</i>	17
1.7 <i>Hipótesis</i>	19
1.8 <i>Objetivos</i>	20
1.8.1 <i>Objetivo General</i>	20
1.8.2 <i>Objetivos Específicos</i>	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1 <i>Reactivos</i>	21
2.2 <i>Material Biológico</i>	21
2.3 <i>Cultivos Bacterianos</i>	22
2.3.1 <i>Cultivo de Escherichia coli y Agrobacterium tumefaciens</i>	22
2.3.2 <i>Cultivo de A. tumefaciens para la transformación de tejidos vegetales</i>	22
2.4 <i>Quimiocompetencia de células de E. coli Mach1 y A. tumefaciens</i>	23
2.4.1 <i>Transformación de células quimio-competentes</i>	23
2.5 <i>Métodos de Biología Molecular</i>	24
2.5.1 <i>Purificación del RNA vegetal</i>	24
2.5.1.1 <i>Pureza y calidad del RNA vegetal</i>	25
2.5.2 <i>Extracción del DNA genómico de las plantas</i>	25
2.5.3 <i>Extracción del DNA plasmidial de E. coli</i>	26
2.5.4 <i>Digestiones enzimáticas</i>	26
2.6 <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	27

2.6.1	<i>Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)</i>	28
2.6.2	<i>PCR en Tiempo Real o qRT-PCR cuantitativo</i>	28
2.7	<i>Construcciones genéticas</i>	31
2.7.1	<i>Vectores usados en este trabajo</i>	34
2.7.2	<i>Generación de las construcciones pGWB2/lcyb1, pMDC32/lcyb1, pMDC85/lcyb1 y pGWB8/lcyb1</i>	35
2.7.2.1	<i>Diseño de partidores</i>	35
2.7.2.2	<i>Clonación del gen lcyb1 c/t y lcyb1 s/t en el vector de entrada pCR8®</i>	37
2.7.2.3	<i>Recombinación Gateway® entre los vectores de entrada y destinación</i>	37
2.8	<i>Secuenciación de los clones pCR8/lcyb1</i>	38
2.9	<i>Obtención de plantas transgénicas de tabaco y zanahoria que expresan el gen lcyb1 de D. carota</i>	39
2.9.1	<i>Transformación transitoria de hojas de tabaco con A. tumefaciens que porta el vector pMDC85/lcyb1</i>	39
2.9.2	<i>Cultivo y transformación estable de tabaco</i>	39
2.9.3	<i>Cultivo y transformación estable de D. carota</i>	41
2.1	<i>Análisis bioquímicos y bioinformáticos</i>	43
2.10.1	<i>Localización Subcelular del gen lcyb1 de D. carota mediante Microscopía de fluorescencia</i>	43
2.10.2	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE)</i>	44
2.10.2.1	<i>Inmunodetección mediante Western-Blot</i>	44
2.10.3	<i>Determinación de la cantidad y la composición de los carotenoides</i>	45
2.10.3.1	<i>Extracción de los Carotenoides</i>	45

2.10.3.2	Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría.....	46
2.10.3.3	Composición de los pigmentos mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	46
2.10.4	Análisis "In silico" de la localización subcelular de la proteína LCYB1 de <i>D. carota</i>	47
RESULTADOS		49
3.1	Clonación del gen <i>lcyb1-c/t</i> y <i>lcyb1-s/t</i> en el vector de entrada pCR®8.....	49
3.1.1	Amplificación del gen <i>lcyb1</i> con y sin terminador mediante PCR.....	50
3.1.2	Análisis de la construcción pCR8/ <i>lcyb1 s/t</i> y <i>c/t</i>	50
3.2	Construcción de los vectores binarios pGWB2/ <i>lcyb1</i> , pMDC32/ <i>lcyb1</i> , pMDC85/ <i>lcyb1</i> y pGWB8/ <i>lcyb1</i> para el estudio del gen <i>lcyb1</i>	51
3.2.1	PCR de colonia de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformado con los vectores pMDC32/ <i>lcyb1</i> , pGWB2/ <i>lcyb1</i> , pMDC85/ <i>lcyb1</i> y pGWB8/ <i>lcyb1</i>	54
3.3	Determinación de la localización subcelular de la proteína DcLCYB1.....	56
3.3.1	Determinación "In silico" de la localización subcelular de la proteína DcLCYB1.....	56
3.3.2	Determinación de la localización subcelular de la proteína DcLCYB1 por medio de agro-infiltración de hojas de tabaco con el vector pMDC85/ <i>lcyb1</i>	57
3.4	Transformación y obtención de las plantas de tabaco y zanahoria transformadas establemente.....	59
3.4.1	Transformación estable de plantas de tabaco con los vectores pGWB2/ <i>lcyb1</i> , pMDC32/ <i>lcyb1</i> y pGWB8/ <i>lcyb1</i>	59

3.4.2	<i>Transformación estable y obtención de plantas de zanahoria con los vectores pGWB2/lcyb1 y pMDC32/lcyb1</i>	60
3.5	<i>Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de tabaco y zanahoria mediante la amplificación del gen hptII</i>	62
3.5.1	<i>Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de tabaco obtenidas</i>	62
3.5.2	<i>Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de zanahoria obtenidas</i>	63
3.6	<i>Análisis moleculares y bioquímicos de las líneas transgénicas de tabaco y zanahoria</i>	65
3.6.1	<i>Análisis de expresión de la proteína recombinante DcLCYB1</i>	65
3.6.2	<i>Análisis de los niveles de expresión del gen Dclcyb1 y de los pigmentos en las líneas transgénicas de tabaco</i>	67
3.6.2.1	<i>Análisis de expresión de genes aledaños claves en la ruta carotenogénica del tabaco mediante qRT-PCR</i>	74
3.6.3	<i>Análisis de los niveles de expresión del gen Dclcyb1 y de los pigmentos en hojas y raíces de las zanahorias transgénicas</i>	78
3.6.3.1	<i>Análisis de expresión de genes aledaños claves en la ruta carotenogénica de la zanahoria mediante qRT-PCR</i>	90
	DISCUSIÓN	95
4.1	<i>El tabaco y la zanahoria son modelos vegetales adecuados para la transformación genética y fácil obtención de plantas transgénicas</i>	95
4.2	<i>La proteína LCYB1 se localiza en los cloroplastos de las células vegetales</i>	98
4.3	<i>La proteína LCYB1 está presente en las líneas transgénicas de tabaco</i>	99
4.4	<i>La sobre-expresión del gen Dclcyb1 provoca un aumento en los niveles de carotenoides en distintos modelos vegetales</i>	102

INDICE DE TABLAS

TABLA I	<i>Partidores usados para la amplificación de fragmentos por PCR convencional en esta Tesis.....</i>	35
TABLA II	<i>Partidores usados para la amplificación de fragmentos por qRT-PCR en esta Tesis.....</i>	36
TABLA III	<i>Construcciones generadas en esta tesis.....</i>	54
TABLA IV	<i>Predicción de la localización subcelular de la proteína DcLCYB1.....</i>	56
TABLA V	<i>Genes carotenogénicos empleados para la transformación de tabaco.....</i>	108
TABLA VI	<i>Cuantificación de pigmentos de las líneas transgénicas de tabaco transformadas con las construcciones pGWB2/lcyb1 y pMDC32/lcyb1.....</i>	135
TABLA VII	<i>Cuantificación de los niveles de expresión, carotenoides totales y β-caroteno en hojas y raíces de las líneas transgénicas de zanahoria transformadas con la construcción pGWB2/lcyb1.....</i>	136
TABLA VIII	<i>Cuantificación de los niveles de expresión, carotenoides totales y β-caroteno en hojas y raíces de las líneas transgénicas de zanahoria transformadas con la construcción pMDC32/lcyb1.....</i>	136



INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de los complejos enzimáticos formados por las enzimas carotenogénicas.....	3
Figura 2	Ruta de biosíntesis de los carotenoides en plantas.....	5
Figura 3	Ramificación de la ruta de biosíntesis de los carotenoides.....	11
Figura 4	Esquema de la clonación del fragmento de interés en el vector de entrada.....	32
Figura 5	Esquema de la recombinación sitio-específica.....	33
Figura 6	Esquema de los vectores empleados en esta tesis.....	34
Figura 7	Amplificación del gen <i>lcyb1</i> con terminador (A) y sin terminador (B) de la transcripción.....	49
Figura 8	Digestión de la construcción <i>pCR8/lcyb1</i> con <i>HindIII</i> y <i>AvaI</i>	51
Figura 9	Análisis de restricción con la enzima <i>HindIII</i> de los vectores <i>pGWB2</i> , <i>pMDC32</i> , <i>pMDC85</i> y <i>pGWB8</i> que poseen clonado el gen <i>lcyb1</i>	53
Figura 10	PCR de colonia de <i>A. tumefaciens</i> transformado con los vectores <i>pGWB2/lcyb1</i> , <i>pMDC32/lcyb1</i> , <i>pMDC85/lcyb1</i> y <i>pGWB8/lcyb1</i>	55
Figura 11	Localización subcelular de la proteína <i>DcLCYB1</i>	58
Figura 12	Proceso de organogénesis somática de <i>N. tabacum</i> transformado con los vectores <i>pGWB2/lcyb1</i> , <i>pMDC32/lcyb1</i> , y <i>pGWB8/lcyb1</i>	60
Figura 13	Proceso de embriogénesis somática de <i>Daucus carota</i> transformado con los vectores <i>pMDC32/lcyb1</i> y <i>pGWB2/lcyb1</i>	61
Figura 14	Análisis molecular de las líneas de tabaco obtenidas.....	63
Figura 15	Análisis molecular de las líneas de las zanahorias obtenidas.....	64
Figura 16	Análisis de SDS-PAGE de la proteína <i>DcLCYB1</i>	66
Figura 17	Análisis de western blot de la proteína <i>DcLCYB1</i>	66
Figura 18	Análisis de la expresión del gen <i>Dclcyb1</i> y de los niveles de pigmentos en plantas de tabaco transgénicas para el vector <i>pGWB2/lcyb1</i>	70
Figura 19	Análisis de la expresión del gen <i>Dclcyb1</i> y de los niveles de pigmentos en plantas de tabaco transgénicas para el vector <i>pMDC32/lcyb1</i>	71
Figura 20	Niveles de expresión y carotenoides de las líneas transgénicas de tabaco promediados.....	72
Figura 21	Análisis de qRT-PCR de genes clave en la ruta carotenogénica del tabaco.....	77
Figura 22	Análisis de qRT-PCR y HPLC de las hojas de las zanahorias transgénicas para el vector <i>pGWB2/lcyb1</i>	82
Figura 23	Análisis de qRT-PCR y HPLC de la raíz modificada de las zanahorias transgénicas para el vector <i>pGWB2/lcyb1</i>	83
Figura 24	Análisis de qRT-PCR y HPLC de las hojas de las zanahorias transgénicas para el vector <i>pMDC32/lcyb1</i>	84

Figura 25 *Análisis de qRT-PCR y HPLC de la raíz modificada de las zanahorias transgénicas para el vector pMDC32/Icyb1*..... 85

Figura 26 *Niveles promedio de expresión y de carotenoides de las hojas de las líneas transgénicas de zanahoria*..... 87

Figura 27 *Niveles promedio de expresión y de carotenoides de las raíces de las líneas transgénicas de zanahoria*..... 89

Figura 28 *Análisis de qRT-PCR de genes clave en la ruta carotenogénica de la zanahoria*..... 93

Figura 29 *Análisis de qRT-PCR de genes clave en la ruta carotenogénica de la zanahoria*..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS

Medio LB	: Medio Luria Bertani
2,4-D	: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BrEt	: Bromuro de etidio
ABA	: Ácido Abscísico
ccs	: Capsantina capsorrubina sintasa
DEPC	: Dietilpirocarbonato
DNasa	: Desoxi-ribonucleasa
dNTP	: Desoxinucleótido trifosfato
DO	: Densidad óptica
HPLC	: Cromatografía Líquida de alta resolución
Ct	: Ciclo umbral por sobre la fluorescencia basal
BLAST	: Herramienta de alineamiento básico local de nucleótidos
Kb	: Kilobase
TEMED	: Tetrametiletilendiamina
rpm	: Revoluciones por minuto
µL	: Microlitro
RT	: Transcripción Reversa
CTAB	: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IBA	: Ácido Indol Butírico
BAP	: Benzil Amino Purina
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
Medio MS	: Medio Murashige y Scoog
GFP	: Green Fluorescent Protein

RESUMEN

Los carotenoides son compuestos lipídicos isoprenoides sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y también por algunas bacterias y levaduras. En las plantas estos compuestos son sintetizados en los plastidios y son esenciales en estos organismos vegetales debido a que participan en los procesos de fotosíntesis, foto-protección y síntesis de hormonas. En los animales, actúan como moléculas antioxidantes y precursores de la vitamina A al ser incorporados en la dieta. La ruta de biosíntesis de estos compuestos está bien caracterizada y altamente conservada en las plantas, conociéndose las principales enzimas involucradas en su síntesis. Sin embargo, la regulación de la ruta es más compleja y aunque ha sido ampliamente estudiada, aún no se comprenden a cabalidad todos los factores implicados en la regulación de la síntesis de carotenoides en plantas. Actualmente, se sabe que el principal mecanismo regulatorio ocurre a nivel transcripcional, donde factores activadores como la luz y el desarrollo tienen un efecto directo en la activación de la expresión de los genes carotenogénicos, como por ejemplo los genes *psy* y *lcyb*, que son dos de los puntos de regulación más importantes en la ruta.

Nuestro modelo de estudio, *Daucus carota* (zanahoria), es una hortaliza que acumula de manera natural en la raíz modificada grandes cantidades de β -caroteno, el principal carotenoide de este organismo. Este compuesto es sintetizado a partir del licopeno en una reacción catalizada por la enzima licopeno β -ciclase (LCYB). En la zanahoria se han identificado dos genes *lcyb* (*Dclcyb1* y *Dclcyb2*). La funcionalidad de estos genes la comprobamos usando un sistema de expresión heterólogo bacteriano, en donde se demostró que el gen *Dclcyb1* codifica para una enzima más eficiente que la enzima codificada por el gen *Dclcyb2*. Análisis de expresión génica indican que el

gen *Dclcyb1* es el que presenta el mayor aumento en los niveles de expresión durante el desarrollo de las hojas y de la raíz modificada. Más aún, el silenciamiento génico post-transcripcional de este gen demostró que es necesario para la síntesis de β -caroteno, tanto en la hoja como en la raíz de esta planta.

Considerando las evidencias expuestas anteriormente es que en este trabajo se continuó con la caracterización del gen *Dclcyb1*. Para ello, en primera instancia se determinó la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1 en plantas de tabaco transformadas transitoriamente con el vector pMDC85//*lcyb1*, encontrando una ubicación de esta proteína en los cloroplastos de las células epidermales. Luego se determinó la presencia de la proteína en seis líneas de tabaco transgénicas para el vector pGWB8//*lcyb1* mediante *western blot*.

Posteriormente expresamos el gen *Dclcyb1* en un sistema vegetal heterólogo (*Nicotiana tabacum*) y en nuestro modelo de estudio *D. carota* empleando los vectores pGWB2//*lcyb1* y pMDC32//*lcyb1*. En tabaco, la expresión de *Dclcyb1* fue dos veces mayor con el vector pGWB2 en comparación con el vector pMDC32. Esto se correlacionó con los niveles de carotenoides obtenidos en las líneas transgénicas para el vector pGWB2, donde se obtuvo el mayor aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, siendo este aumento de 5 y 2,5 veces, respectivamente, mientras que para la construcción pMDC32//*lcyb1* no se obtuvieron cambios significativos en los niveles de estos compuestos. Además, se determinaron los niveles de expresión de tres genes clave en la ruta carotenogénica (*psy1*, *psy2* y *lcyb2*) para tres líneas obtenidas con cada vector encontrando un efecto activador del gen *Dclcyb1* en la mayoría de estos genes, lo cual indica la importancia que tiene este gen en la regulación de la ruta en tabaco.

Al sobre expresar *Dclcyb1* en nuestro modelo de estudio determinamos que la expresión del gen *Dclcyb1* en hojas de zanahoria fue de 1,8 veces mayor con el vector pMDC32 que con el vector pGWB2. Esto se correlacionó con los niveles de carotenoides obtenidos, donde si bien no hubo un aumento significativo en los niveles de carotenoides totales, si hubo un aumento de 1,4 veces más en los niveles de β -caroteno. Por otra parte, la expresión de este gen en la raíz de la zanahoria se correlacionó con lo observado en la hoja siendo la expresión de este gen 7,5 veces mayor con el vector pMDC32 que con el vector pGWB2, el que causó un silenciamiento del gen en las raíces de estas líneas. Estos niveles de expresión se correlacionaron con los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno observados para estas plantas, presentando un aumento de 4,3 y 4,4 veces, respectivamente, para el vector pMDC32 en comparación con el vector pGWB2. Al igual que en el sistema heterólogo, se determinaron los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2* para tres líneas obtenidas con cada vector, tanto en hoja como en raíz, encontrando un efecto activador del gen *Dclcyb1* en la mayoría de estos genes endógenos, lo cual indica la importancia que tiene este gen en la regulación de la ruta carotenogénica en la zanahoria.

En conjunto, estos resultados corroboran la funcionalidad *in vivo* del gen *Dclcyb1* en estos organismos vegetales y la gran importancia que tiene este gen en la regulación de la ruta carotenogénica tanto en tabaco como en zanahoria.

ABSTRACT

Carotenoids are lipidic isoprenoid compounds synthesized by all photosynthetic organisms and also by bacteria and yeasts. In plants, these compounds are synthesized in plastids and they are essentials in these organisms due to their role in processes like photosynthesis, photo-protection and hormone synthesis. In animals, they act as antioxidant molecules and also as vitamin A precursors when they are incorporated in the diet. The carotenogenic pathway is well characterized and highly conserved in plants, and the most important enzymes of the pathway have been identified. However, the regulation of the carotenogenic pathway is highly complex and even though the pathway has been widely studied, to date all the factors implied in their regulation are not fully understood. To date, it is known that the major regulatory mechanism occurs at the transcriptional level where activating factors as light and development have a direct effect in the activation of the carotenogenic gene expression, for example *psy* and *lcyb*, which are two important key regulatory points of the pathway.

Our study model, *Daucus carota* (carrot), is a vegetable that in their modified root naturally accumulates great amounts of β -carotene, the principal carotenoid of this organism. This compound is synthesized from lycopene in a reaction catalyzed by the lycopene β -cyclase (LCYB). In carrot, two *lcyb* genes has been identified (*Dclcyb1* y *Dclcyb2*). Our previous results carried out in a bacterial heterologous system, indicate that both genes encode for enzymes with LCYB activity. In addition, we determined that the *Dclcyb1* encodes for a protein more efficient than the protein encoded by the *Dclcyb2* gene. Genic expression analysis showed that the *Dclcyb1* is the gene that presents the highest increase in their expression levels throughout carrot development

in leaves and modified root. Moreover, post-transcriptional gene silencing of this gene indicates that the *Dclcyb1* is necessary for the β -carotene synthesis in leaves as well as in carrot roots. Considering this evidences, in this work we continue with *Dclcyb1* characterization. Firstly, we determined the subcellular localization of DcLCYB1 protein in tobacco plants transiently transformed with pMDC85//*lcyb1* vector. We observed that this protein present a chloroplast localization in epidermal leaves cells. Then, we determined the presence of this protein in pGWB8//*lcyb1* transgenic lines through *western blot*.

After that we expressed *Dclcyb1* in a heterologous plant system (*Nicotiana tabacum*) and in our model system, *D. carota* using pGWB2//*lcyb1* and pMDC32//*lcyb1* vectors. In transgenic tobacco, the expression levels of *Dclcyb1* genes measured through qRT-PCR, indicated that *Dclcyb1* expressed two fold higher in the pGWB2 than the pMDC32 vector transgenic plants. This correlated with the carotenoid levels obtained by the pGWB2 transgenic lines, which present the highest increment in total carotenoids and β -carotene, being this of 5 and 2,5 fold, respectively. For the pMDC32 vector we did not observed significant changes in total carotenoids and β -carotene levels. Besides, we determined the expression levels of three key carotenogenic genes (*psy1*, *psy2* y *lcyb*) for three transgenic tobacco lines of each vector. We observed an activating effect of *Dclcyb1* gene for almost all three genes in the lines, indicating the great importance of this gene in tobacco pathway regulation.

In transgenic carrots over expressing *Dclcyb1*, we determine that the expression levels of *Dclcyb1* gene in leaves was 1,8 fold higher with pMDC32 vector than the pGWB2 vector. This result agree with the carotenoid levels, where no significant changes in total carotenoid levels was observed, although an increase of 1,4 fold in β -

carotene levels was obtained. On another hand, the expression levels of this gene in carrot roots present a correlation with those observed in carrot leaves being the expression levels of *Dclcyb1* gene of 7,5 fold higher with pMDC32 than pGWB2 vector, which in this case produced gene silencing. These expression levels have a correlation with total carotenoid and β -carotene levels in carrot roots with an increase of 4,3 and 4,4 fold , respectively. We also determined the expression levels of *psy1*, *psy2* y *lcyb2* genes for three transgenic carrot lines of each vector, in both organs. We observed an activating effect of *Dclcyb1* gene for almost all three genes in all the lines, indicating the great importance of this gene in the carotenogenic pathway regulation of *D. carota*.

These results, taken together, proved the *in vivo* functionality of *Dclcyb1* gene in these plant models and also showed the importance of this gene in the carotenogenic pathway regulation in tobacco as well as in carrot.

INTRODUCCIÓN

1.1 Biosíntesis, estructura y función de los carotenoides

Los carotenoides son pigmentos isoprenoides naturales y liposolubles (Tanaka y col., 2008). Su estructura química consta de ocho unidades isoprénicas unidas en sus extremos para formar un esqueleto carbonado con una base de cuarenta carbonos. Además, estos compuestos poseen un sistema de dobles enlaces conjugados, que van desde tres a quince, y que actúan como cromóforos otorgándoles color y distintas propiedades. El rango espectral de absorción de los carotenoides varía entre 400 y 500 nm (Armstrong & Hearst, 1996; Giorio y col., 2007).

Actualmente, se han descrito más de 700 carotenoides estructuralmente distintos los cuales se subdividen en dos grandes grupos: los carotenos, que contienen solo átomos de carbono e hidrogeno y las xantófilas, que poseen además sustituyentes oxigenados (Giorio y col., 2007). Estos compuestos son sintetizados de manera natural por las plantas, las algas, los hongos, algunas bacterias y las levaduras (Fujisawa y col., 2008; Jayaraj y col., 2007). En las plantas, son sintetizados y acumulados principalmente en los plastidios (Cunningham & Gantt, 1998) y se almacenan en las membranas tilacoidales asociadas a los centros cosechadores de la luz en los cloroplastos (Peter & Thornber, 1991; Cunningham & Gantt, 1998). Además, se ha reportado que estos compuestos también son almacenados, tanto en las membranas y los cuerpos grasos de los cromoplastos como en las estructuras cristalinas dentro del

estroma (Kirk & Tilney-Bassett, 1978; Cunningham & Gantt, 1998; Howitt & Pogson, 2006; Maass, 2009).

En las plantas superiores, la ruta carotenogénica se encuentra altamente conservada y se han descrito los genes involucrados en ésta (Cunningham & Gantt, 1998). Aunque generalmente se encuentra un producto génico por actividad enzimática, existen algunas especies vegetales como el tomate que poseen más de un gen que codifica para una misma enzima carotenogénica. Los genes carotenogénicos se encuentran en el núcleo y una vez traducidas las proteínas, éstas son importadas a los plastidios, donde participan en la biosíntesis de los carotenoides (Howitt & Pogson, 2006).

En los últimos años se han identificado y caracterizado las actividades enzimáticas de dichos genes y esclarecido aún más la ruta general de biosíntesis de los carotenoides en las plantas (Cunningham & Gantt, 1998; Hirschberg, 2001). Se ha propuesto que algunas de las enzimas involucradas en las primeras reacciones que se llevan a cabo en la ruta de biosíntesis de los carotenoides como la IPP isomerasa (IPI), geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPPS) y la fitoeno sintasa (PSY) se agrupan en un complejo enzimático ubicado en el estroma del cloroplasto (Figura 1). Por otra parte, las enzimas involucradas en las reacciones de desaturación y ciclación como la fitoeno desaturasa (PDS), ζ -caroteno desaturasa (ZDS), licopeno β -ciclaza (LYCB) y licopeno ϵ -ciclaza (LYCE) formarían parte de un gran complejo multienzimático localizado en la membrana del tilacoide (Figura 1; Bonk y col., 1997; Cunningham & Grantt, 1998).

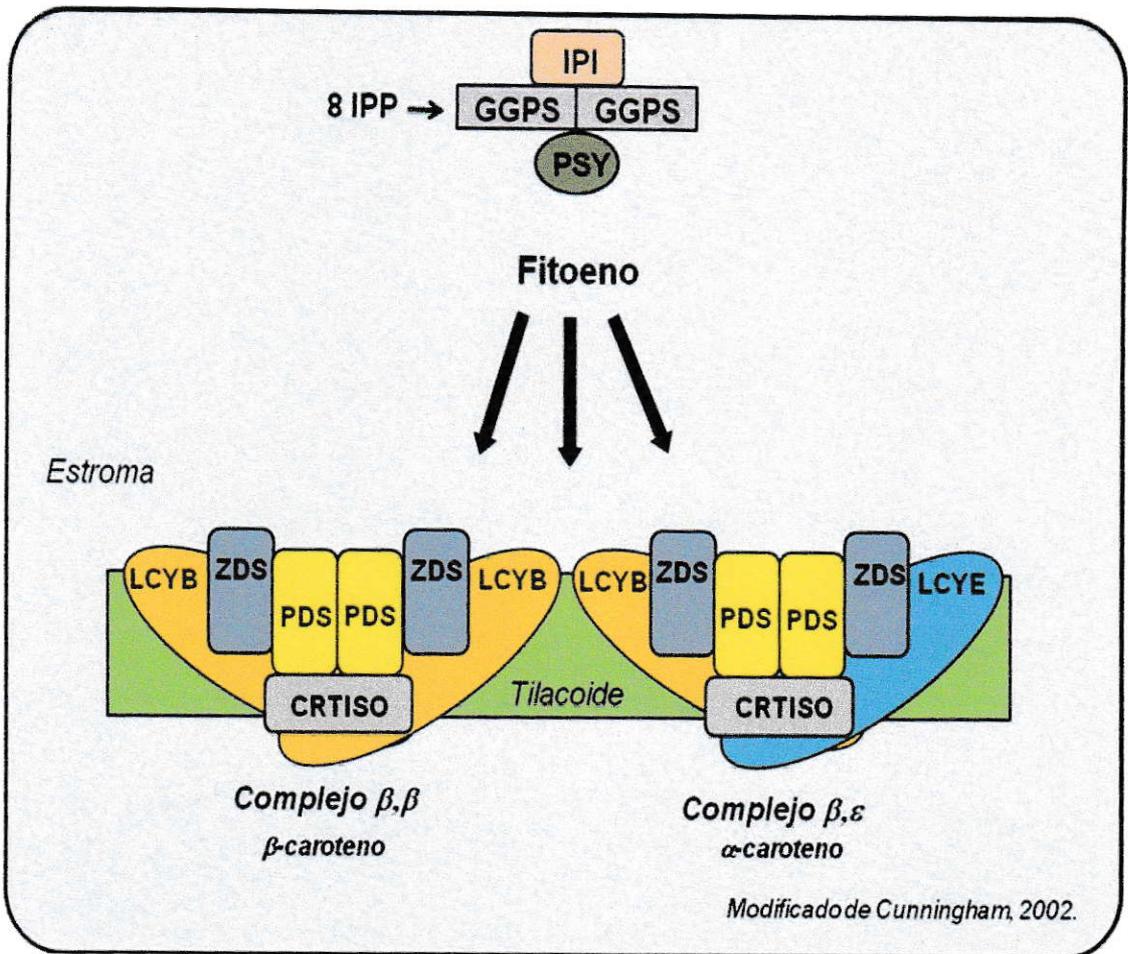


Figura 1. Esquema de los complejos enzimáticos formados por las enzimas carotenogénicas. Se observan las distintas enzimas carotenogénicas formando complejos en el estroma y en la membrana del tilacoide en los plastidios de las plantas.

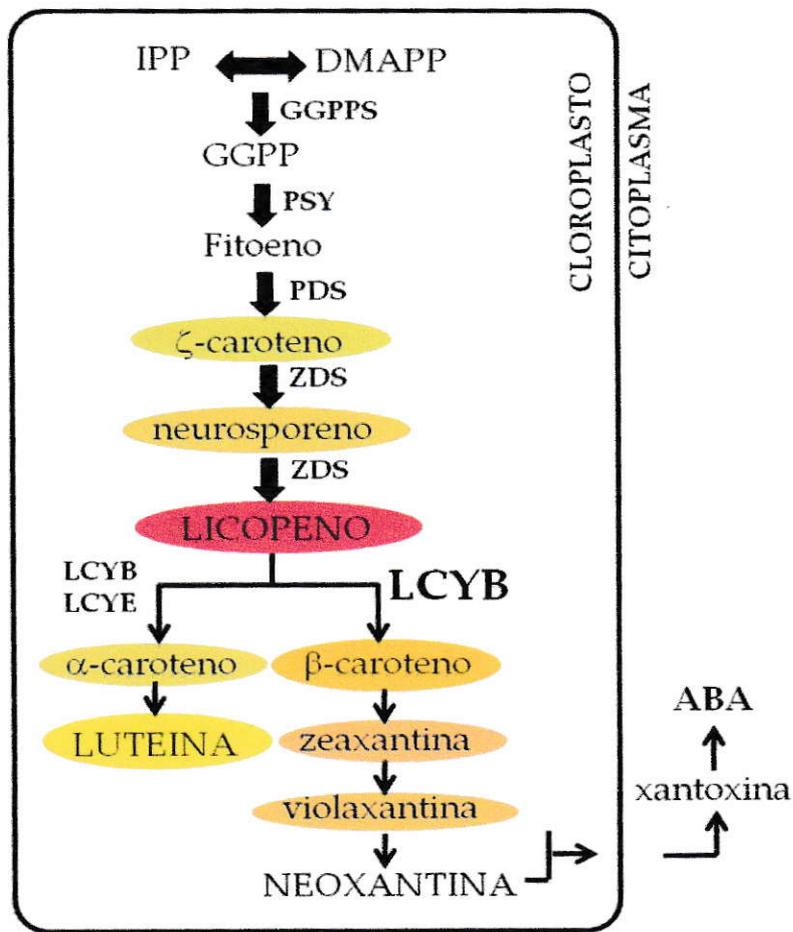
La ruta de biosíntesis de los carotenoides se encuentra ampliamente descrita en varios artículos (Cunningham y Gantt 1998, Cunningham 2002, etc) y se presenta un esquema de ésta en la Figura 2. El primer carotenoide, denominado fitoeno, se forma a partir de dos moléculas de GGPP (C_{20}) en una reacción catalizada por la enzima fitoeno sintasa (PSY) (Figura 2, Tanaka y col., 2008). A partir de este compuesto se inician una serie de desaturaciones seriales que generan fitoflueno, ζ -caroteno (amarillo pálido) y neurosporeno (naranja-amarillo), hasta obtener finalmente el

pigmento denominado licopeno, el cual posee un color rojo. Estas cuatro desaturaciones sucesivas son llevadas a cabo por las enzimas PDS, CRTISO, Z-ISO y ZDS como se muestra en la Figura 2.

A partir del licopeno se genera el punto de ramificación de la ruta. Si este compuesto es ciclado en sus dos extremos por la LCYB, se sintetiza el β -caroteno. Por otro lado, ciclaciones mediadas por la enzima LCYB en conjunto con la enzima licopeno ϵ -ciclase (LCYE) dan origen al α -caroteno (Figura 2). Luego, el α -caroteno es hidroxilado en sus dos anillos formando luteína, mientras que el β -caroteno a través de una serie de hidroxilaciones y epoxidaciones permite la formación de los compuestos denominados xantófilas (Figura 2). A partir de la xantófila denominada neoxantina se genera una molécula de 15 carbonos llamada xantoxina la cual es precursora del ácido abscisico (ABA).

Las características estructurales de los carotenoides les otorgan distintas propiedades y es por ello que cumplen diferentes funciones tanto en los organismos vegetales como en los animales. Estos pigmentos son componentes esenciales de las membranas fotosintéticas en todas las plantas, algas y cianobacterias. Además, cumplen una extraordinaria variedad de funciones en las plantas (Britton G, 1995; Demmig-Adams y col., 1996; Frank & Cogdell 1996; Goodwin, 1980; Yamamoto & Bassi, 1996). Por ejemplo, los carotenoides participan en la fotoprotección de las células contra el daño provocado por la luz, canalizando el exceso de energía (Bassi y col., 1993; Young, 1993; Kuhlbrandt y col., 1994; Bartley & Scolnik, 1995; Demmig-Adams & Adams, 2002). Los carotenoides asociados a los centros de reacción y a los complejos antena reaccionan eficientemente con el triplete de clorofila (cuando la clorofila absorbe la energía de un fotón), el singlete del oxígeno y también con el anión

superóxido, evitando así el daño desencadenado a partir del estado excitado del triplete de la clorofila (Britton G, 1995; Demmig-Adams y col., 1996; Frank & Cogdell 1996). Además, mediante el ciclo de las xantófilas los carotenoides participan también en la disipación térmica del exceso de la energía absorbida por los pigmentos asociados a los complejos antena, además de actuar como pigmentos accesorios a la clorofila durante la fotosíntesis.



Modificado de Dong y col., 2007.

Figura 2. Ruta de la biosíntesis de los carotenoides en las plantas. Diagrama simplificado de las enzimas y los principales productos de la ruta en las plantas. IPP, isopentenil pirofosfato; IPI, isopentenil isomerasa; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GGPPS, geranyl geranyl pirofosfato sintasa; GGPP, geranyl geranyl pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ-caroteno desaturasa; LCYB, licopeno β-ciclasa; LCYE, licopeno ε-ciclasa; BHY, β-caroteno hidroxilasa; EHY, ε-caroteno hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; NSY, neoxantina sintasa; ABA, ácido abscísico.

Por otra parte estos compuestos, actúan como estabilizadores de las membranas, evitando la oxidación de los lípidos que las componen (Demigg-Adams y col., 1996) y como precursores en la biosíntesis del ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal cuya función es de vital importancia en la resistencia a estrés abiótico, dormancia, apertura y cierre de estomas y en la germinación (Nambara & Marion-Poll, 2005; Leung and Giraudat, 1998; Rock & Zeevart, 1991; Milborrow, 2001; Lindgren y col., 2003; Howitt & Pogson, 2006).

Además, en los cromoplastos de las plantas los carotenoides se encuentran asociados a lípidos polares y proteínas, formando complejos lipo-proteicos en estructuras globulares, cristalinas, membranosas, fibrilares o tubulares (Vishnevetsky y col, 1999; Camara y col, 1995). Estas estructuras permiten la estabilización y almacenaje de carotenoides en los cromoplastos otorgándole a estos órganos color amarillo, anaranjado o rojizo, característico de estos pigmentos. De esta forma, órganos vegetales con alto contenido de cromoplastos, como flores y frutos, adquieren colores más atractivos para animales e insectos que permiten la dispersión de polen y semillas (Bartley and Scolnik, 1995; Britton G, 1995).

En los animales, los carotenoides cumplen una función esencial, son precursores de la vitamina A, la cual participa en múltiples procesos como la visión, la respuesta inmune, el crecimiento y la reparación del tejido epitelial, la reproducción, el mantenimiento de las membranas de la superficie de los ojos y la integridad del epitelio respiratorio, urinario y tracto intestinal (Al-Babili & Beyer, 2005). Además, los carotenoides participarían en el tratamiento y prevención de las enfermedades degenerativas y de algunos tipos de cáncer, debido a sus propiedades antioxidantes

(Lorenzo y col., 2009). Debido a que los mamíferos no sintetizan carotenoides de forma natural, éstos se deben ingerir en la dieta para poder ser metabolizados.

1.2 Regulación de la ruta carotenogénica en las plantas

Aún cuando la ruta carotenogénica se encuentra altamente conservada en todos los organismos vegetales, la regulación de esta es altamente compleja y se han identificado distintos factores que influyen en la regulación de la misma. Entre estos factores podemos mencionar la regulación transcripcional, la cual puede ser mediada por luz y por el desarrollo de la planta, el secuestro y acumulación de carotenoides en distintos órganos, y la regulación post-traducciona. Es por esto que a continuación se describirán brevemente los aspectos de la regulación que están más relacionados con la hipótesis y el desarrollo de este trabajo.

Entre los reguladores de la vía carotenogénica más estudiados, se encuentra la luz. Se ha descrito en diferentes modelos que 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 & Paliyath, 2005; Pizarro & Stange, 2009; Rodríguez-Villalón A. y col., 2009). Por ejemplo en *Arabidopsis 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*) 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*) al exponer las plantas a condiciones de luz (Woitsch y Römer, 2003). En zanahoria recientemente se ha logrado identificar el promotor de este gen observando la presencia de diversas cajas regulatorias que responden a

distintos estímulos (hormonas vegetales y luz). Experimentalmente se corroboró de que efectivamente la luz y hormonas producen un aumento de expresión del gen en plántulas de zanahoria y plantas de tabaco (Fuentes, 2011).

Otro de los puntos de regulación ocurriría a nivel del secuestro y la acumulación de carotenoides. Esto estaría determinado en parte por la biogénesis de diferentes tipos de plastidios (Deruere y col., 1994; Vishnevsky y col., 1999). Los carotenoides en cromoplastos se encuentran en forma de plastoglobulos o cristales de mayor estabilidad frente a la degradación lumínica en comparación a los carotenoides presentes en cloroplastos (Steinmuller & Tevini, 1985; Merzlyak & Solovchenko, 2002). En relación a esto, recientemente se determinó que la tasa de síntesis y degradación de los carotenoides en las hojas es muy elevada (Beisel y col., 2010). Otro punto de regulación está dado por la activación de la ruta por producto final. En este contexto se ha descrito que el ABA presenta una retroalimentación positiva sobre la expresión del gen PSY en *A. thaliana* (Rodríguez-Villalón A. y col., 2009).

En última instancia, otro tipo de regulación es la redundancia génica, que corresponde a los casos en donde se ha reportado que dos o más genes codifican para enzimas con la misma actividad. En la planta modelo *A. thaliana*, existe una copia única 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). 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, mientras que la variedad de papaya que posee ambas enzimas activas, presenta una pulpa 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).

1.3 Importancia del gen *lcyb* en la ruta de biosíntesis de los carotenoides

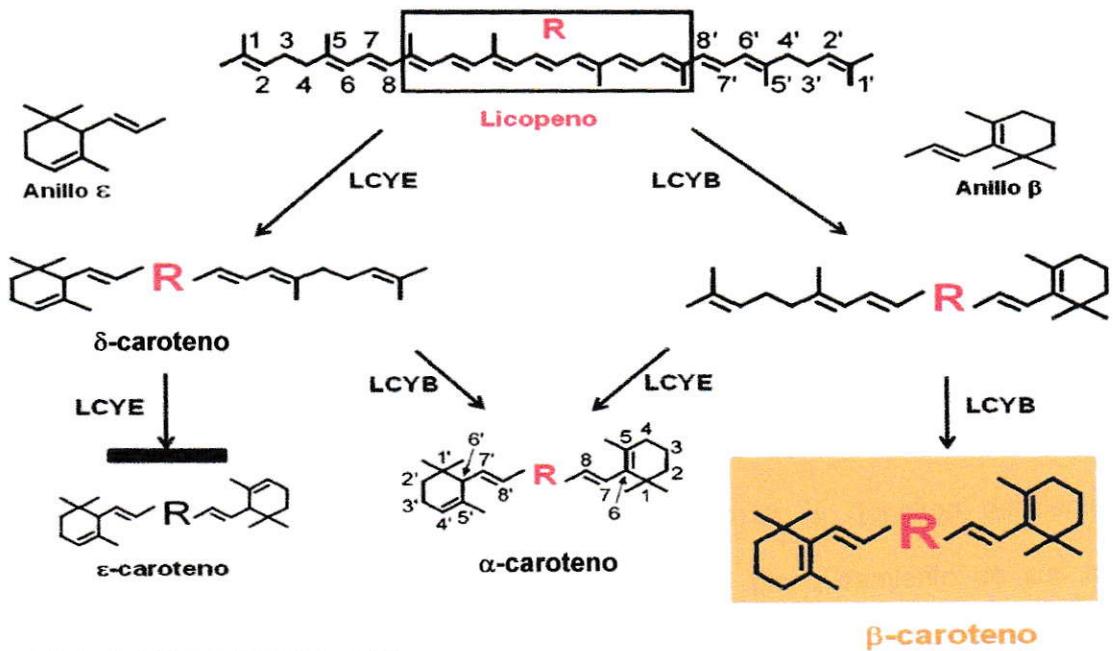
El gen licopeno β -ciclase (*lcyb*) codifica para la enzima licopeno β -ciclase (LCYB), la cual está involucrada en la ciclación del licopeno y es el punto de ramificación de la ruta (Figura 2). La ciclación del licopeno por las enzimas licopeno ciclasas (LCYE y LCYB) es un punto de división clave en la vía de síntesis de los carotenoides, y alteraciones en su regulación o en la actividad enzimática afectan fuertemente la composición de los carotenoides en los distintos tejidos vegetales (Hirchsberg, 2001; Bramley, 2002; Cunningham, 2002; Botella-Pavia & Rodríguez-Concepción, 2006; Howitt y Pogson, 2006). Las enzimas tipo licopeno ciclasas presentan alrededor de 400 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 40 kDa. Cabe destacar que las enzimas carotenogénicas de plantas poseen un péptido de destinación a cloroplasto (péptido señal) en el extremo amino terminal que en el caso

de las licopeno β -ciclasa de plantas es de una longitud de entre 50-100 aminoácidos (Schnurr, G. y col., 1996).

La formación de los anillos β o ϵ ionona en las plantas son catalizados por dos enzimas distintas, la licopeno β -ciclasa y la licopeno ϵ -ciclasa. Ambas enzimas muestran una alta homología en su secuencia aminoacídica y es muy probable que hayan evolucionado desde un ancestro común (Krubasik & Sandmann, 2000). Otro miembro de esta familia de las proteínas licopeno ciclasas de las plantas es la capsantina capsorubina sintasa (CCS) de *Capsicum annuum* (Bouvier y col., 1994). Esta enzima convierte la anteraxantina o la violaxantina en capsantina o capsorubina mediante un mecanismo similar al de la ciclación del licopeno (Bouvier y col., 1996). Además, la enzima CCS de tomate y pimentón (Huguene y col., 1995) también puede convertir el licopeno en β -caroteno *in vitro* y su secuencia aminoacídica es muy similar a la de las licopeno β -ciclasas, por lo que se ha propuesto que el gen *ccs* ha evolucionado a partir de una duplicación génica del gen de licopeno β -ciclasa (Krubasik & Sandmann, 2000).

En las plantas, los carotenoides asociados al aparato fotosintético son compuestos bicíclicos, comúnmente con dos anillos β o modificaciones de éstos, como el β -caroteno (Cunningham & Gantt, 1998). La LCYB cataliza la formación del β -caroteno a partir del licopeno (Cunningham y col., 1996; Fraser y col., 1995; Huguene y col., 1995; Pecker y col., 1996). Esta puede actuar secuencialmente sobre los dos extremos de la molécula lineal del licopeno, introduciendo los dos anillos β y produciendo de esta forma β -caroteno, vía γ -caroteno el cual sería el intermediario en esta reacción (Figura 3; Alquezar, 2007). Por otra parte, la enzima LCYE puede

introducir únicamente un anillo ϵ en uno de los extremos de la molécula del licopeno lo que da origen al δ -caroteno (Figura 3). Seguido de esto, la enzima LCYB cataliza el paso de δ -caroteno a α -caroteno, y agrega un anillo β en el extremo lineal de la molécula de δ -caroteno (Figura 3; Hirshberg, 2001; Fraser & Bramley, 2004; Bouvier y col., 2005). Excepcionalmente, en algunas especies de lechuga se ha descrito una enzima LCYE capaz de introducir dos anillos ϵ en la molécula lineal del licopeno (Figura 3) lo que genera ϵ -caroteno y finalmente lactucaxantina (Cunningham & Gantt, 2001).



Modificado de Cunningham y Gantt, 1998.

Figura 3. Ramificación de la ruta de la biosíntesis de los carotenoides. A partir de la molécula del licopeno y por medio de las enzimas LCYB y LCYE se produce α -caroteno y β -caroteno. Por una parte, al agregar un anillo ϵ a la molécula de licopeno se produce el δ -caroteno, el cual al ser ciclizado en su otro extremo con un anillo β se convierte en α -caroteno, el cual es el precursor de la luteína. Por otro lado, dos ciclaciones sucesivas con anillos β producen el β -caroteno (precursor de las xantófilas y el ABA) en el que su intermediario monocíclico corresponde a γ -caroteno.

Los genes que codifican para las enzimas LCYB han sido identificados en tomate (N° acc. X86452, AF254793), zanahoria (N° acc. DQ192190, DQ192191), tabaco (N° acc. CAA57386), distintas especies de cítricos (N° acc. AF240787, AY196766, AY217103, AF152246) y pimentón (N° acc. X86221), entre otras plantas superiores, y presentan todos ellos al menos un 78% de identidad a nivel aminoacídico. Estas proteínas en su estado maduro poseen un sitio de unión al dinucleótido (FAD/NADH) que al parecer está implicado en su activación alostérica (Hornero & Britton, 2002) y dos motivos conservados característicos de este tipo de enzimas (Hugueney y col., 1995).

Dado que la mayoría de los carotenoides son esenciales para la vida de la planta, solo se han descrito algunos mutantes con pérdida de función para enzimas carotenogénicas. Recientemente, fue descrito en arroz (*Oryza sativa*) dos mutantes del gen *lcyb*, *phs4-1* y *phs4-2*, que presentan deleciones en la región codificante del gen. La actividad licopeno β -ciclase es codificada por un solo gen en arroz, por esto las mutantes homocigotas *phs4-1* y *phs4-2* son letales a las 4 semanas después de la germinación y en condiciones heterocigotas generan el "fenotipo deficiente de carotenoides" que se caracteriza por presentar un blanqueamiento de sus hojas, acumular especies reactivas del oxígeno y muerte celular en sus hojas con una distribución en mosaico. También presentan baja resistencia al estrés abiótico y semillas con germinación temprana (vivíparas), dada por la baja concentración de ABA (Conti y col, 2004; Dong y col, 2007). Este es el único mutante descrito del gen *lcyb* en plantas que poseen un solo gen que codifique para la enzima licopeno β -ciclase. Esto muestra la importancia de esta actividad enzimática para la vida de las plantas. En tomate existen los mutantes *Beta*, *Old-gold* y *Old-gold-crimson* que presentan

mutaciones en el gen *cycb*, que codifica para una enzima con actividad licopeno β -ciclasa específica de fruto (Ronen y col, 2000). El mutante *Beta* presenta niveles de expresión aumentados del gen *cycb* generando un aumento en los niveles de β -caroteno en el fruto de tomate, mientras que los mutantes *Old-gold* y *Old-gold-crimson* presentan una delección en el gen *cycb* y esto provoca la acumulación de licopeno en el fruto de tomate. Sin embargo, pese a que los *Old-gold* y *Old-gold-crimson* presentan pérdida de función generan plantas viables, ya que en tomate también existe el gen *lcyb*, (asociado principalmente a la biosíntesis de carotenoides en tejido fotosintético) que no se ve afectado funcionalmente en estas plantas, lo cual permite que sean viables (Ronen y col, 2000).

En pimentón (*Capsicum annuum*) también se han descrito 2 genes que codifican para la actividad licopeno β -ciclasa, estos son *lcyb* y *ccs* (Huguene y col, 1995). Este último codifica para una proteína que además tiene actividad capsantina capsurrubina sintasa (CCS), encargada de la síntesis de capsantina y capsurrubina (Bouvier y col, 1994). Estos pigmentos de color rojo, son los que dan la tonalidad característica a los pimentones. Análisis de expresión de estos genes muestran que *lcyb* se expresa preferentemente en hojas y casi no es percibido durante la maduración de frutos, mientras que *ccs* es transcrito principalmente durante la maduración de frutos de pimentón (Huguene y col, 1995; Huguene y col, 1996). Estos estudios indican que en estos modelos vegetales que sintetizan alto contenido de carotenoides en órganos ricos en cromoplastos, existe más de un gen que codifica para enzimas clave en la biosíntesis de carotenoides como PSY y LCYB (Bramley, 2002), donde uno de ellos es específico de tejido fotosintético (cloroplastos) y el otro es específico de fruto (cromoplastos).

1.4 Aumento en los niveles de expresión del gen *lcyb1* en modelos vegetales

Desde el punto de vista biotecnológico, se han llevado a cabo distintas estrategias para aumentar los niveles totales de los carotenoides y en especial del β -caroteno en distintos organismos vegetales. La mayoría de los estudios y reportes han sido sobre la enzima PSY debido a que es el punto clave en la regulación de la ruta carotenogénica. Si bien las enzimas PSY y LCYB son las que dirigen los puntos clave de la ruta carotenogénica (Bramley, 2002), y aunque la expresión aumentada del gen *psy* ha generado un incremento en los niveles de carotenoides en distintos organismos vegetales, recientemente se ha empezado a caracterizar cada vez más enzimas licopeno β -ciclasas de distintas especies de plantas como azafran, kiwi, naranja, papaya entre otros (Ahrazem y col., 2010; Ampomah-Dwamena y col., 2009; Alquezar y col., 2009; Devitt y col., 2010), las cuales podrían tener un buen uso para aplicaciones biotecnológicas. Hasta la fecha, se ha aumentado la expresión del gen *lcyb* de *A. thaliana* y tomate con resultados bastante alentadores en cuanto a la síntesis de carotenoides en las plantas transformadas (Rosati y col., 2000; Dharmapuri y col., 2002; D'Ambrosio y col., 2003).

En los tomates transgénicos que aumentan los niveles de expresión del gen *lcyb* de *A. thaliana*, se observan frutos de color naranja con un aumento de 1,7 veces en los niveles totales de los carotenoides y 6,9 veces en los niveles de β -caroteno (Rosati y col., 2000; Dharmapuri y col., 2002). Además, al aumentar la expresión del gen *lcyb* de tomate en la misma planta, también se obtienen frutos de color naranja lo que refleja una conversión casi del 100% de licopeno a β -caroteno en los frutos de tomate

(D'Ambrosio y col., 2003). Por último, la expresión del gen *lcyb* de la planta *Lycium barbarum* en *Nicotiana tabacum* (tabaco) generó un aumento de 1,5 veces en los niveles de β -caroteno en las hojas del tabaco (Ji y col., 2008).

1.5 *Daucus carota* como modelo de estudio

En *Daucus carota* (zanahoria), nuestro modelo de estudio, los carotenoides son almacenados en la raíz modificada de manera natural y están biodisponibles para los animales y los humanos (Horvitz y col., 2004). Sin embargo, la síntesis y acumulación de estos compuestos también se produce en sus hojas, que se encuentran expuestas a la luz, por lo que es posible que la expresión de los genes carotenogénicos sea activada por luz en las hojas de *D. carota*, tal como ha sido descrito en otros modelos vegetales (Von Lintig y col, 1997; Römer y col, 2005). Por otra parte, una de las particularidades de este modelo es que sintetiza altos niveles de carotenoides en su raíz modificada, que crece en oscuridad, lo cual supone que en este órgano existiría algún tipo de regulación distinta a la descrita actualmente, convirtiéndola en un modelo de gran interés de estudio. La raíz de reserva sintetiza una gran cantidad de β -caroteno, con valores reportados de 0,394 mg/g de peso fresco (Jayaraj y col., 2008) y 0,6 mg/g de peso seco (Stange y col., 2008). La zanahoria de color naranja contiene predominantemente β -caroteno (45-80%) acompañado de α -caroteno los que en conjunto constituyen sobre el 95% de los carotenoides totales (Simon & Wolff, 1987). Sin embargo hay variedades de zanahoria de color rojo, amarillo y púrpura en las que en su composición se encuentra como factor común el β -caroteno acompañado de licopeno, luteína y antocianos, respectivamente (Baranska y col., 2006).

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 síntesis de los carotenoides en *D. carota* y entre ellas se encuentran la licopeno β -ciclase (LCYB) 1 y 2 (Just y col., 2007).

Uno de estos genes codifica para la enzima LCYB2 (Just y col., 2007), la cual es un miembro de una familia génica que incluye a la licopeno β -ciclase1 (LCYB1), teniendo una alta identidad aminoacídica con la licopeno β -ciclase de tomate específica de cromoplastos (CYCB) y con la capsantina capsorubina sintasa de pimentón (CCS). Por otra parte, en zanahoria nunca se ha detectado producción de capsantina o capsorubina, por lo que se piensa que en *D. carota*, es más probable que la enzima LCYB2 (CCS) tenga una actividad licopeno β -ciclase. Los estudios de la expresión de los genes carotenogénicos en la zanahoria, realizados en nuestro laboratorio, demostraron que *lcyb1* es el gen que presenta el mayor aumento en sus niveles de expresión (comparado con *psy1*, *psy2*, *pds*, *zds1* y *zds2*) durante el desarrollo de la planta (Fuentes, 2009). Este aumento alcanza niveles de 16,2 veces en las hojas y 12,4 veces en la raíz modificada de una planta adulta (12 semanas de cultivo). Esto se correlaciona con el aumento de los carotenoides totales durante el desarrollo de la raíz, y en especial del β -caroteno (Fuentes y col., 2011).

La funcionalidad del gen *lcyb1* fue evaluada en nuestro laboratorio, por medio de experimentos de complementación heteróloga en un sistema bacteriano y mediante silenciamiento génico post-transcripcional (Moreno, 2010; Pizarro, 2008). Con la primera aproximación, se encontró que el gen *lcyb1* de *D. carota* puede convertir el licopeno en β -caroteno en un sistema bacteriano (Moreno, 2010). Más aún, el gen *lcyb1* presentó una mayor tasa de conversión de licopeno a β -caroteno que el gen

lcyb2 de *D. carota*, el cual es capaz de convertir el licopeno a β -caroteno pero presenta acumulación del intermediario γ -caroteno, lo cual evidencia la mayor eficiencia en la conversión por parte del gen *lcyb1* de *D. carota* (Moreno, 2010). En segunda instancia, las líneas transgénicas de *D. carota* con el gen *lcyb1* silenciado, presentaron una disminución significativa de los niveles de β -caroteno y de los carotenoides totales en las hojas y en la raíz modificada (60% y 40% respectivamente), por lo cual la expresión de este gen es necesaria para la síntesis de los carotenoides en toda la planta (Pizarro, 2008). Si bien, estos resultados dan cuenta de la funcionalidad del gen, en esta tesis de Magister completamos la caracterización funcional del gen *lcyb1* al evaluar su localización subcelular y al sobre expresar el gen en una planta heteróloga (*N. tabacum*) y en *D. carota*, permitiendo perfilar al gen *lcyb1* como un excelente candidato a nivel biotecnológico.

1.6 Estrategia a utilizar

Es por lo anterior que en esta tesis nosotros proponemos que al aumentar la expresión del gen *lcyb1* de *D. carota* (*Dclcyb1*) en modelos vegetales aumentarán los niveles de carotenoides totales y específicamente de β -caroteno en las plantas transformadas con este gen. Para probar esta hipótesis, nosotros proponemos estudiar la función y caracterizar la función del gen *Dclcyb1*. Para esto se decidió aumentar los niveles de expresión de este gen en plantas de tabaco y zanahoria como ha sido reportado previamente para caracterizaciones funcionales de otros genes carotenogénicos (Kumagai y col. 1998; Gerjets y col., 2007; Zhu y col., 2007; Flores, 2011). Debido a que la síntesis de los carotenoides es llevada a cabo en los plastidios de las células vegetales (Dong y col., 2007), en primera instancia se corroborará la localización sub-celular de la proteína codificada por este gen en las hojas de *N.*

tabacum, para tener una primera aproximación de que esta enzima está cumpliendo una correcta función. En segunda instancia, y también en plantas de tabaco, se corroborará la presencia de la proteína LCYB1 de *D. carota* (DcLCYB1) por medio de experimentos de *western blot*, para dar cuenta de que efectivamente el gen está produciendo una proteína que está presente en las plantas transgénicas. Luego la presencia del gen *Dclcyb1* en las plantas transgénicas será corroborada mediante experimentos de qRT-PCR en tiempo real para dar cuenta del aumento en la expresión de este gen. Y por último, mediante experimentos de Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) se determinará la composición de los pigmentos presentes en estas plantas transgénicas, con lo que al juntar todos los resultados obtenidos podremos aceptar o rechazar la hipótesis que se planteará en este trabajo.

1.7 Hipótesis

El aumento de la expresión del gen *lcyb1* de *D. carota* en plantas de tabaco y zanahoria se correlaciona con un aumento de los niveles promedio de carotenoides totales y de β -caroteno en estos modelos vegetales.

Sin embargo, podría ser que esta correlación no se observe en las plantas transformadas por lo cual se enuncia la siguiente hipótesis alternativa:

El aumento en la expresión del gen *lcyb1* de *D. carota* en plantas de tabaco y zanahoria no necesariamente se correlaciona con el aumento en los niveles promedio de carotenoides totales y de β -caroteno en estos modelos vegetales.

1.8 Objetivo

1.8.1 Objetivo General

Caracterización funcional y localización sub celular del gen licopeno β -ciclasa1 (*lcyb1*) de *D. carota* (zanahoria) en tabaco (sistema heterólogo) y en zanahoria.

1.8.2 Objetivos Específicos

- Generar las construcciones para la transformación transitoria y estable de tabaco, y transformación estable de zanahoria.
- Evaluar la localización sub-celular de la proteína LCYB1 mediante análisis bioinformático y expresión transitoria en tabaco.
- Transformar establemente, obtener y analizar molecularmente las líneas transgénicas de tabaco y zanahoria.
- Determinar la presencia de la proteína LCYB1 mediante *western blot* y evaluar la expresión de genes carotenogénicos mediante qRT-PCR.
- Evaluar la composición de pigmentos en las líneas transgénicas de tabaco y zanahoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Se emplearon los reactivos de la calidad adecuada respecto a las técnicas de biología molecular desarrolladas. Estos productos fueron obtenidos de las empresas y marcas registradas como Invitrogen, Fermentas, Promega, Axygen, New England Biolabs, Biorad, Merck, US Biological, MO BIO laboratories Inc., Phyto Technology Laboratories y Sigma-Aldrich.

2.2 Material Biológico

Genotipo de la cepa de *E. coli* DH5 α : *supE44*, Δ *lacU169*(ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

Genotipo de la cepa de *E. coli* DB3.1: F- *gyrA462* *endA1* *glnV44* Δ (*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsdS20*(r_B^- , m_B^-) *ara14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL20*(Sm^r) *xyl5* Δ *leu* *mtl1*.

Genotipo de la cepa de *E. coli* Mach 1: Δ *recA1398* *endA1* *tonA* Φ 80 Δ *lacM15* Δ *lacX74* *hsdR*(r_K^- m_K^+).

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

Para el trabajo con plantas se usó *Daucus carota* variedad Nantes y *Nicotiana tabacum* (tabaco).

2.3 Cultivos Bacterianos

2.3.1 Cultivo de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *E. coli* DH5 α se incubó en medio LB líquido (1% (p/v) de triptona, 0.8%(p/v) de NaCl, 0,5%(p/v) de extracto de levadura), a 37°C con una agitación de 250 rpm. Para el caso de medio LB sólido, a la mezcla de LB líquido se le agregó agar 1.6% (p/v) y se incubaron en una placa de Petri durante 16 h a una temperatura de 37°C. Tanto para el cultivo líquido como para el sólido, se le agregó además el antibiótico correspondiente a la resistencia otorgada por el vector (espectinomicina 100 mg/mL, kanamicina 100 mg/mL o ampicilina 100 mg/mL).

A. tumefaciens se incubó en 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 del antibiótico correspondiente para la selección del plásmido de interés (kanamicina 100 mg/mL). El cultivo líquido con *Agrobacterium* se incubó durante 20 h, con una agitación de 250 rpm, mientras que el cultivo sólido se incubó por 48 h, ambos a una temperatura de 28°C. A partir de los cultivos líquidos se realizó un respaldo en glicerol al 33% de cada clon y se almacenó a -80°C.

2.3.2 Cultivo de *A. tumefaciens* para la transformación de tejidos vegetales

Para la preparación de este cultivo, se inocularon 50 μ L de *A. tumefaciens* transformadas (sección 2.4.9) en 15 mL de LB con los antibióticos respectivos y se crecieron de manera convencional en agitación durante 24 h a 28°C. Luego, se centrifugó por 5 min a 5500 g, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 30 mL de MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) con acetosiringona a una concentración final de 25 mM. Finalmente, se incubó por 2 h en agitación a 28°C antes de utilizarlo para

infectar el tejido vegetal (de manera estable o transitoria), con la finalidad de estimular la capacidad infecciosa de *A. tumefaciens*.

2.4 Quimiocompetencia de células de *E. coli* Mach1 y *A. tumefaciens*

Un cultivo de *E. coli* se incubó a 37°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,5. Este cultivo se centrifugó a 4°C durante 10 min a 5000 g, y se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0.1M. Luego, se centrifugó nuevamente a 4°C por 5 min a 5000 g y el precipitado se resuspendió en 10 mL de CaCl₂ 0.1M. Finalmente, se incubaron las células a 4°C durante 30 min y se almacenaron en glicerol 33% a -80°C.

Para el caso de *A. tumefaciens*, el cultivo se incubó a 28°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ sobre 0,5. Las células se mantuvieron en hielo durante 10 min y se centrifugó a 4°C durante 20 min a 3000 g, para posteriormente resuspenderlas en 1 mL de CaCl₂ 20 mM. Finalmente, las células se congelaron con nitrógeno líquido para ser almacenadas a -80°C hasta su utilización.

2.4.1 Transformación de células quimio-competentes

Para la transformación tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens*, se utilizó la transformación mediante golpe térmico. Para el caso de *E. coli*, se mezcló una alícuota de 200 µl de bacterias quimio-competentes, con la reacción de ligación ó recombinación de interés, y se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente, se aplicó un golpe térmico de 42°C durante 45 seg. y luego se depositó en hielo por 2 min. A continuación se agregó 1 mL de LB líquido y la mezcla se incubó por 1 h a 37°C. Luego, las células se centrifugaron, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendió en el volumen remanente. Este volumen de células se sembró en medio

LB sólido con los antibióticos adecuados para la selección (espectinomicina 100 mg/mL, kanamicina 100 mg/mL). Las placas se incubaron a 37°C por 16 h.

Para la transformación de *A. tumefaciens* se descongeló en hielo una alícuota de 100 µl de células quimio-competentes de *A. tumefaciens* y se mezcló con 300 ng del vector de destinación (pMDC85, pGWB2, pMDC32, y pGWB8). Luego, se aplicó el golpe térmico a las células incubando la mezcla en nitrógeno líquido durante 5 min. Posteriormente, se descongeló a 23°C durante 15 min. La mezcla se cultivó en agitación en medio LB líquido a 28°C durante 18 h. Finalmente, las células se centrifugaron, se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendieron en el volumen remanente. La mezcla de la transformación se plaqueó en placas de Petri con medio LB sólido con los antibióticos adecuados (rifampicina 10 mg/mL, gentamicina 100 mg/mL y kanamicina 100 mg/mL) para la selección por 48 h a 28°C.

2.5 Métodos de biología molecular

2.5.1 Purificación del RNA vegetal

Se procedió a extraer el RNA de la hoja de *N. tabacum* desde las plantas transgénicas de 3 meses de desarrollo. Para esto, 100 mg de tejido fueron pulverizados en morteros previamente estériles en presencia de nitrógeno líquido. Se añadió 1 mL de RNA-Solv (Omega Bio-tek), 0,2 mL de cloroformo por cada mL de RNA-Solv agregado, se depositó en un tubo Eppendorf y se agitó por 15-25 s. Se incubó en hielo por 10 min para luego centrifugar a 12000 g por 15 min a 22°C. Se transfirió el sobrenadante a un Eppendorf y se agregó 500 µL de isopropanol enfriado a -20°C al RNA por cada mL de RNA-Solv agregado. Se incubó 30 min a -20°C para luego centrifugar a 12000g por 10 min. a 22°C. Se lavó el precipitado con 500 µL de EtOH

80% enfriado a -20°C y se agitó en vortex por 10 s para posteriormente centrifugar a 14000 g. El RNA precipitado se resuspendió en 50 μL de agua DEPC libre de RNasa y finalmente se cargaron 3 μL en un gel de agarosa para verificar su integridad. También se determinó su concentración y las razones 260/280 y 260/230, indicativas de la pureza del RNA con respecto a proteínas, sales y solventes, respectivamente, en un espectrofotómetro NanoDrop™.

2.5.1.1 Pureza y calidad del RNA vegetal

En los casos en que las razones 260/280 y 260/230 observadas en el NanoDrop™ fueron insuficientes para considerar que el RNA extraído era de la pureza adecuada para la síntesis del cDNA (razones $\geq 1,8$), el RNA se limpió agregando un volumen de cloroformo frío y agitando en vortex durante 5 min. Luego de centrifugar a 10.000xg durante 5 min a 4°C , la fase acuosa superior (que contiene el RNA) se precipitó con 3 volúmenes de Etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M, pH: 4,8, durante 30 min a -80°C . Luego de centrifugar a 10.000xg durante 30 min a 4°C , el precipitado de RNA se lavó con 1 mL de etanol 75% en agua libre de nucleasas y una vez seco se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas y se procedió a verificar nuevamente su integridad como se describió previamente.

2.5.2 Extracción del DNA genómico de las plantas

Para la extracción del DNA se siguió el protocolo descrito por Doyle y Doyle en 1987. Aproximadamente 100 mg de tejido vegetal se congelaron y molieron con nitrógeno líquido y se homogenizó con 0,7 mL de CTAB (cetil trimetilamonio bromuro al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20mM y Tris pH 8 100 mM) y 0,005 mL de β -Mercaptoetanol. El homogenizado se mantuvo a 60°C por 30 min, con agitación en vortex cada 5 min, y

luego se volvió a agregar 0,7 mL de CTAB y se incubó a 70°C por 15 min. Posteriormente, se agregó 0,4 mL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó y se separó la fase acuosa (superior) de la orgánica. La fase acuosa que contiene el DNA fue transferida a un tubo Eppendorf estéril y el DNA se precipitó con isopropanol frío por 30 min a -20°C. Posteriormente, se centrifugó y se lavó el precipitado con etanol 70%. Después de esto, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, y se secó el precipitado 20 min a 25°C para finalmente resuspenderlo en agua nanopura.

2.5.3 Extracción del DNA plasmidial de *E. coli*

Se siguió el protocolo y se usaron los reactivos proporcionados por el fabricante del kit Axyprep™ de Axygen. Con este DNA se realizaron los análisis de digestión, las recombinaciones y las amplificaciones por PCR.

2.5.4 Digestiones enzimáticas

Para determinar la orientación del gen *lcyb1* en las construcciones pCR8//*lcyb1* S/T y pCR8//*lcyb1* C/T estos vectores se digirieron con la enzima de restricción *Ava*I. La reacción contenía 200 ng del DNA plasmidial de las construcciones, buffer Tango 1X, y 5 U de la enzima *Ava*I. Esta reacción se incubó por 1 h a 37°C.

Para corroborar la orientación en que se clonó el gen *lcyb1* en los vectores de destinación pMDC32, pMDC85, pGWB2 y pGWB8 se digirieron estas construcciones con la enzima de restricción *Hind*III. La reacción contenía 250 ng del DNA plasmidial de las construcciones, buffer Tango 1X, y 5 U de la enzima *Hind*III. Esta reacción se incubó por 1 h a 37°C.

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

2.6 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 I), 0,2 mM de dNTPs y 1U de Taq polimerasa ó PFU polimerasa ó Elongasa (Fermentas), además de DNA, cDNA o cultivo bacteriano como molde.

El programa estándar utilizado consistió de un paso inicial de desnaturalización del DNA por 4 min a 95°C, seguido por 32 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 min.

Para visualizar los ácidos nucleicos (DNA o RNA), 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 BrEt 1 μg/mL. Las muestras fueron mezcladas con el buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol 0.25% y glicerol 80%) previo a ser cargadas en el gel.

Las reacciones de PCR se utilizaron para diferentes fines, como confirmar la transformación tanto de *E. coli* como de *A. tumefaciens*, en el caso del PCR de colonia. También se utilizó para determinar la transgenia de los tabacos y zanahorias obtenidos producto de la organogénesis y embriogénesis somática, amplificando el gen *hptII* a partir de DNA genómico.

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

Primero se trató 2 µg del RNA extraído, con DNAsal Fermentas siguiendo las instrucciones del fabricante y detalladas en el seminario de título (Moreno, 2010), para eliminar remanentes de DNA en la muestra.

Para la síntesis de cDNA se utilizó la Transcriptasa Reversa Improm-II (Promega). En base a las instrucciones del fabricante, se mezcló 1µg de RNA con 10 pmoles de partidador oligo A (5'- CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'); la mezcla se sometió 5 min a 70°C, luego los tubos se pusieron en hielo durante 5 min, tiempo durante el cual se agregó la mezcla para la transcripción reversa. El programa continuó con 5 min a 25°C para la hibridación, luego 60 min a 42°C para la extensión y finalizó con la inactivación de la enzima sometiendo la reacción a 70°C durante 15 min. Se hizo además un control negativo sin Transcriptasa Reversa, agregando RNA en vez de cDNA al medio de reacción, de manera de descartar remanentes de DNA en las posteriores amplificaciones.

2.6.2 PCR en Tiempo Real o qRT-PCR cuantitativo

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

Se utilizó el programa *AmplifX* para diseñar partidores que amplificaran regiones internas de la secuencia codificante específicas de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb1* de *N. tabacum*. Además, se utilizaron los partidores disponibles en el laboratorio (Fuentes, 2009; Ocaez, 2010) para medir los niveles de mensajeros de los genes de interés en la ruta carotenogénica de la zanahoria: *lcyb1* (DQ192190), *psy1* (nº acceso:

DQ192186), *psy2* (nº acceso: DQ192187), *lcyb2* (nº acceso AY552527), además del gen 18S (nº acceso AY552527) que fue usado como gen normalizador del experimento. 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.

Luego, se determinó la eficiencia de los partidores *psy1*, *psy2* y *lcyb* de *N. tabacum* (Tabla 2). Para esto, se realizó una re-amplificación mediante PCR en Tiempo Real para cinco diluciones (desde 1/100 hasta 1/1·10⁶) de una amplificación por un PCR convencional de la región específica de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb* de *N. tabacum*.

La eficiencia de cada partidador (E) se obtuvo de la siguiente fórmula:

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

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 µL.

El programa de amplificación consistió de una desnaturalización inicial de 4 min 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 min 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 se consideró en primer lugar que las curvas de amplificación tuvieran la forma sigmoidea característica de este tipo de experimentos y que la curva de disociación fuera óptima. 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 utilizar un gen normalizador y un gen calibrador.

En este caso se utilizó como gen normalizador al gen de "mantenimiento" (*housekeeping*) codificante de la sub unidad ribosomal 18S en el caso de los experimentos realizados para el tabaco y el gen de la ubiquitina para el caso de la zanahoria.

Por otra parte, como "calibrador" en esta tesis se utilizó los resultados de la amplificación de 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 la expresión del gen *Dclcyb1*) 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 *MxPro-MX3000p Analysis Software*. Los datos se ingresaron a la Ecuación 2 (Pfaffl, 2001), junto a los valores de eficiencia de cada par de partidores.

$$\text{Razón} = \frac{(1 + E_{\text{gen objetivo}}) \times e^{(Ct_{\text{gen objetivo}} - Ct_{\text{calibrador objetivo}})}}{(1 + E_{\text{gen normalizador}}) \times e^{(Ct_{\text{gen normalizador}} - Ct_{\text{calibrador normalizador}})}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Los datos obtenidos fueron graficados mediante el programa GraphPad Prism. Además, se utilizó un test de t no pareado de dos colas ($p < 0,05$) en los conjuntos de datos obtenidos. Cada muestra se obtuvo de tres hojas diferentes y cada medición de éstas se realizó en triplicado.

2.7 Construcciones genéticas

Las construcciones generadas en este seminario de título fueron obtenidas por medio de la metodología Gateway® la cual se basa en las propiedades de recombinación sitio-específicas del bacteriófago lambda (λ) para realizar las etapas de clonamiento y sub-clonamiento en la obtención de las construcciones genéticas.

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

Una vez realizada la clonación, la enzima es escindida del vector, y se obtiene el vector de entrada con el gen de interés (Figura 4).

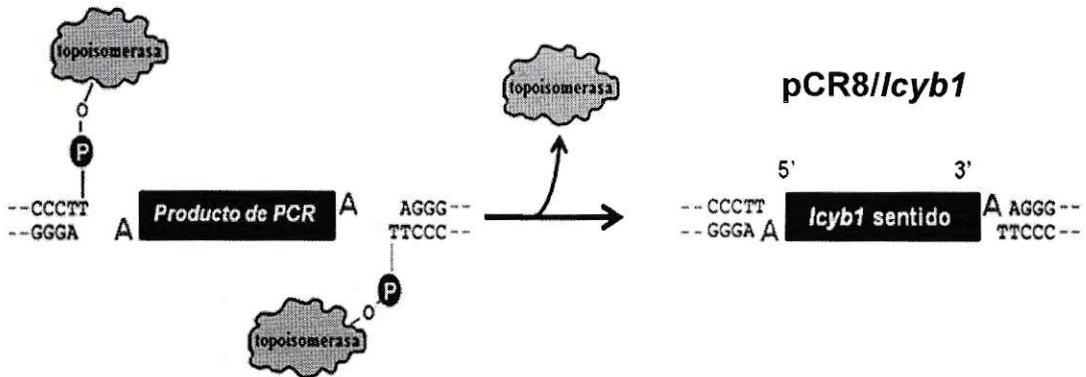


Figura 4. Esquema de la clonación del fragmento de interés en el vector de entrada. El producto de PCR que presenta una base adenina en sus extremos se introducirá por medio de una unión de la base A con una timina libre presente en los extremos del vector pCR8, obteniendo de esta manera la construcción pCR8/lcyb1.

Luego de clonar el fragmento de interés en el vector de entrada, este se transfiere al vector final de destinación mediante recombinación sitio específica (Figura 5). Existe una amplia gama de estos vectores dependiendo del estudio que se desee realizar.

En este trabajo se utilizaron vectores de destinación como pMDC85 para realizar experimentos de localización subcelular, pGWB8 para detectar la proteína LCYB1 mediante *western blot*, y los vectores pGWB2 y pMDC32 para expresar establemente en el genoma de las plantas el gen *Dclcyb1* de la zanahoria.

Este mecanismo de recombinación requiere de una enzima 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 pueda realizar la recombinación completa a través de un mecanismo de corte y ligación de las hebras (Figura 5). Para ello se ponen en contacto el vector de entrada que posee

clonado el gen de interés entre los sitios attL y el vector de destinación en presencia de la LR Clonasa®. Producto de la recombinación sitio-específica entre los sitios attL del vector de entrada y attR del vector de destinación, se generan dos productos, uno de ellos es el vector de destinación con el gen de interés (Figura 5).

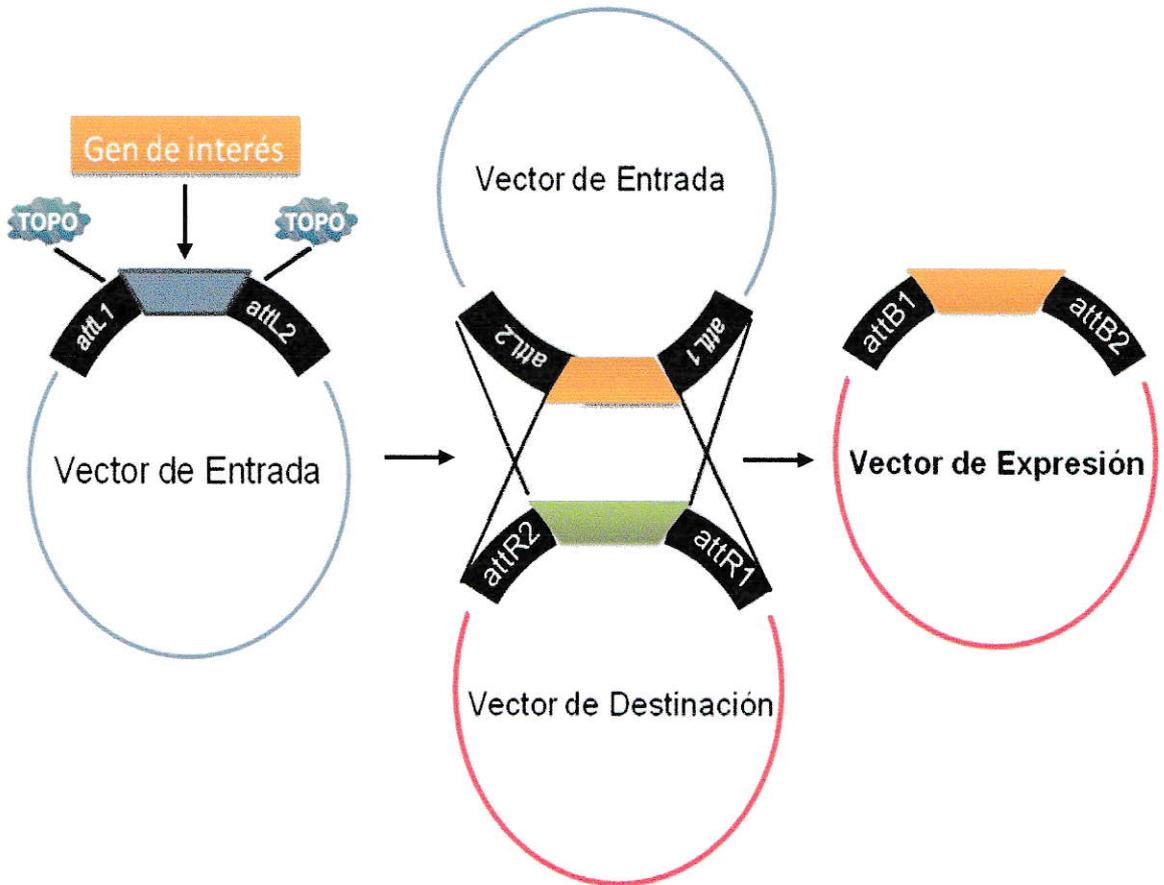


Figura 5. Esquema de la recombinación sitio-específica. Previo a la recombinación, las secuencias se denominan attL y attR y, luego de la recombinación attB y attP, siendo los sitios attB1 y attB2 los que flanquean al gen de interés en el vector de expresión en plantas. La LR Clonasa® es la enzima que permite cortar y ligar el material genético.

2.7.1 Vectores usados en este trabajo

A continuación se muestra un esquema de los vectores utilizados en este trabajo y a partir de las cuales se diseñaron las construcciones obtenidas en el mismo.

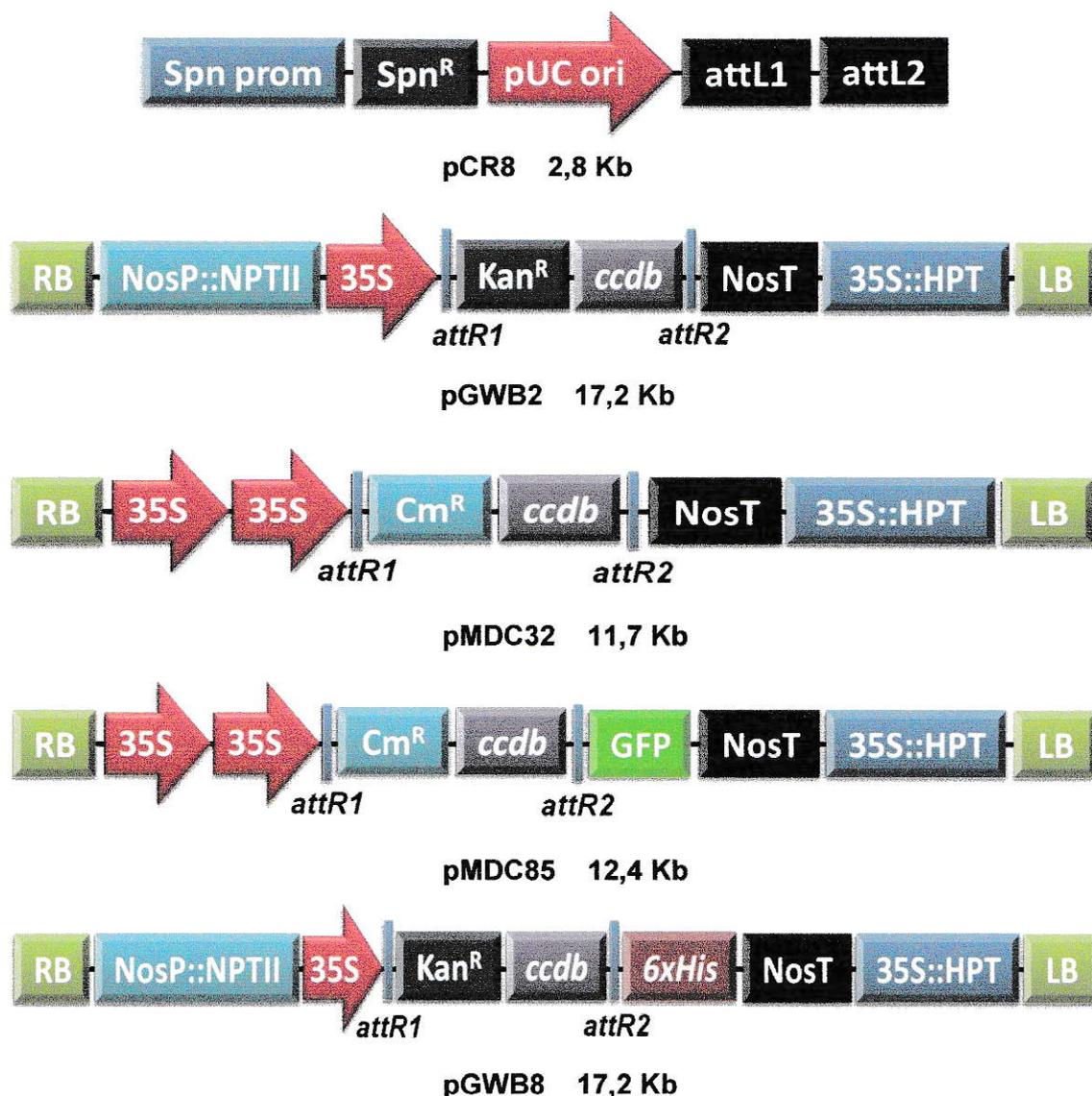


Figura 6. Esquema de los vectores empleados en esta tesis. Vectores de expresión usados en este trabajo para integrar de manera transitoria o estable el gen *icyb1* de *Daucus carota* en el genoma de las plantas. Cada uno de estos vectores posee uno o dos promotores 35S y los genes de resistencia a antibióticos (kanamicina y/o higromicina).

2.7.2 Generación de las construcciones pGWB2//*icyb1*, pMDC32//*icyb1*, pMDC85//*icyb1* y pGWB8//*icyb1*

2.7.2.1 Diseño de partidores

A continuación se detallan los partidores usados para la amplificación del gen *icyb1* y el análisis de los clones. Los partidores se mantuvieron a una concentración de 250 μ M y se diluyeron a 10 μ M para su uso.

Tabla I. Partidores usados para la amplificación de fragmentos por PCR convencional en esta Tesis.

PARTIDOR	SECUENCIA DEL PARTIDOR (5'→3')	DESCRIPCIÓN
5' <i>icyb1</i> ATG sentido	<u>ATG</u> AAA GTG ATG GAT ACT CTA C	Los partidores 5' y 3' fueron diseñados para la clonación del gen <i>icyb1</i> . El partidor 3' no posee el codón de termino de la traducción.
3' <i>icyb1</i> s/t antisentido	CTT CAC AAG CAT TTT GAA CT	
3' <i>icyb1</i> c/t antisentido	CTT CAC AAG CAT TTT GAA <u>CTAG</u>	El partidor 3' posee las bases TAG que detienen la traducción.
18S sentido	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT	Se utilizaron para verificar la integridad tanto del DNA genómico como del cDNA. Amplifican un fragmento de 196 pb del gen para el RNA ribosomal 18S.
18S antisentido	ACA ATG ATC CTT CCG CAG GT	
5' HptII	TTT GTG TAC GCC CGA CAG T	Se utilizaron para verificar si las plantas transformadas integraron el vector en su genoma. Amplifican un fragmento de 600 pb correspondiente al gen de resistencia a higromicina.
3' HptII	AAG ACC TGC CTG AAA CCG A	
M13 sentido	GTA AAA CGA CGG CCA G	Fueron utilizados para secuenciar la construcción pCR8// <i>icyb1</i> .
M13 antisentido	CAG GAA ACA GCT ATG AC	

Tabla II. Partidores usados para la amplificación de fragmentos por qRT-PCR en esta Tesis.

Nombre	Secuencia (5'-3')	T° disociación TD (°C)	Tamaño (pb)	Descripción
18 S F'	TTGATTACGTCCCTG CCCTTT	52-60	196	Gen constitutivo, usado para verificar la calidad del cDNA, y como gen normalizador. TD fragmento: 83°C.
18 S R'	ACAATGATCCTTCC GCAGGT			
Ubi F'	GCTCGAGGACGGCA GAAC	53-60	121	Gen constitutivo, usado para verificar la calidad del cDNA y como gen normalizador. TD fragmento: 84°C.
Ubi R'	CTTGGGCTTGGTGT AGGTCTTC			
q $lcyb1$ F'	TGAGTGCAGCTTAC ACCTACTTGATTA	50-58	161	Gen carotenogénico $lcyb1$ de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 75°C.
q $lcyb1$ R'	AACTGCAGAAGATA TTGGAGA			
q $Ntpsy1$ F'	GGAACCAAGCTAAT GACCCCAGAGAGA	55-58	164	Gen carotenogénico $psy1$ de <i>N. tabacum</i> . TD fragmento: 78°C.
q $Ntpsy1$ R'	GGCCGCCCACTGAA AATATCTTCC			
q $Ntpsy2$ F'	TCA GAG ATG TTG GAG AAG ATG C	54-58	130	Gen carotenogénico $psy2$ de <i>N. tabacum</i> . TD fragmento: 80°C.
q $Ntpsy2$ R'	GCT TCA ATC TCG TCC AAT ATC TTG			
q $Ntlcyb$ F'	CCGTGTTAAATTCCA CCACGCCAA	56-59	132	Gen carotenogénico $lcyb$ de <i>N. tabacum</i> . TD fragmento: 75°C.
q $Ntlcyb$ R'	GAAGCCAGTTGCAT CAAGCACCAC			
q $psy1$ F'	AGTCGATGGAGCAT TACCATAATTC	53-57	95	Gen carotenogénico $psy1$ de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 72°C.
q $psy1$ R'	CTAATGGGTTACAG AGGGTTGTGTTA			
q $psy2$ F'	GCTAATAAACTTCCG TGGGTGTTCC	53-57	112	Gen carotenogénico $psy2$ de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 75°C.
q $psy2$ R'	GCTGGAGTTAGTGC TACCC			
q $lcyb2$ F'	GATTCCTCTGTGTC CATATCTCCC	58-60	70	Gen carotenogénico $lcyb2$ de <i>D. carota</i> . TD fragmento: 75°C.
q $lcyb2$ R'	GATTGCCAGAAAG ACTCAACAG			

2.7.2.2 Clonación del gen *lcyb1* c/t y *lcyb1* s/t en el vector de entrada pCR8®

Se amplificó el cDNA del gen *lcyb1* de *D. carota* (DQ192190) de aproximadamente 1530 pb de acuerdo a la información de la base de datos. Las mejores condiciones de amplificación se estandarizaron mediante un PCR en gradiente. Para amplificar el gen *lcyb1*, con el fin de aumentar su expresión en plantas, se utilizó un partidor sentido ATG y uno antisentido con el terminador de la traducción (c/t) (Tabla I). Por otra parte para los experimentos de localización subcelular se amplificó el gen *lcyb1* con un partidor en sentido ATG y uno en antisentido sin terminador de la traducción (s/t) (Tabla I). Para la amplificación de este gen con y sin terminador se usó la enzima elongasa polimerasa (Fermentas) la cual actúa como una PFU polimerasa pero permite la presencia de una base "A" en cada extremo del amplificado para facilitar su clonación en el vector de entrada. A partir de los productos del PCR se realizó la ligación del gen *lcyb1* c/t y s/t al vector de entrada pCR8/GW/TOPO con 150 ng del producto de PCR, 50 ng de vector, 1 µL de la solución salina (0,2 M de NaCl y 0,01 M de MgCl₂) y la enzima topoisomerasa presente en el vector. La mezcla de la reacción de ligación se incubó durante 16 h a 23°C antes de transformar las células quimio-competentes de *E. coli* Mach1® mediante un golpe térmico de 42°C.

2.7.2.3 Recombinación Gateway® entre los vectores de entrada y destinación

Para obtener un vector que aumentará los niveles de expresión del gen *lcyb1* de *D. carota* se recombinó el vector pCR8/*lcyb1* ATG c/t con el vector de destinación pMDC32 y pGWB2, los cuales poseen un promotor doble y simple 35SCaMV, respectivamente (Figura 6). Para ello se mezcló 100 ng de la construcción pCR8/*lcyb1*

ATG c/t, 240 ng del vector de destinación pMDC32 y pGWB2, y 2 μ L de la enzima LR Clonasa™ II Invitrogen para completar 10 μ L de reacción de recombinación para cada caso.

Para realizar los experimentos de localización sub-celular del gen *icyb1* se recombinó el vector pCR8//*icyb1* ATG s/t con el vector de destinación pMDC85, el cual posee un promotor 35SCaMV doble y el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) (Figura 6). Para ello se mezcló 100 ng de la construcción pCR8//*icyb1* ATG s/t, 240 ng del vector de destinación pMDC85, y 2 μ L de la enzima LR Clonasa™ II Invitrogen para completar 10 μ L de reacción de recombinación.

La mezcla de la reacción se incubó por 16 h a 23 °C. Para detener la reacción se agregó 1 μ L de proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante 10 min a 37°C. Finalmente, se transformaron las bacterias quimio-competentes de *E. coli* Mach1® por golpe térmico (sección 2.4.1) y se seleccionaron los clones transformantes en placas de Petri con LB sólido con los antibióticos respectivos (Tabla III, sección 3.2).

2.8 Secuenciación de los clones pCR8//*icyb1*

Los clones positivos de las construcciones pCR8//*icyb1* ATG c/t y s/t identificados mediante los análisis de digestión enzimática fueron secuenciados en MacroGen Co. (USA), usando los partidores del fago M13 y partidores del gen de interés clonado en el vector pCR8 (Tabla I, sección 2.7.3.1).

2.9 Obtención de plantas transgénicas de tabaco y zanahoria que expresan el gen *lcyb1* de *D. carota*.

2.9.1 Transformación transitoria de hojas de tabaco con *A. tumefaciens* que porta el vector pMDC85//*lcyb1*

Un clon de *A. tumefaciens* transformado con el vector pMDC85//*lcyb1* fue crecido en LB líquido suplementado con kanamicina (50 mg/mL), gentamicina (100 mg/mL) y rifampicina (10 mg/mL) durante 18 h a 28°C con agitación hasta una D.O. de 0.5-0.8. Se sedimentaron las bacterias centrifugándolas a 5500 g por 5 min y se resuspendieron hasta una D.O. de 0.5-0.8, en un medio de infiltración que consiste en MES 10 mM pH 5.8, MgCl₂ 10 mM y acetosiringona (3,5-dimetoxi-4-hidroxiacetofenona) 300 mM. La suspensión fue incubada a 25 °C por 2 h antes de la agro-infiltración. La agro-infiltración se realizó en *N. tabacum* en donde se perfundió la suspensión de *A. tumefaciens* por la cara abaxial de hojas jóvenes usando una jeringa de 5 mL sin aguja y presionando suave y firmemente hasta observar la infiltración de una amplia región de la hoja (Sparkes y col., 2006). Luego de 4 días, las hojas fueron cosechadas para los análisis.

2.9.2 Cultivo y transformación estable de tabaco

Para la transformación de tabaco se usaron plantas cultivadas *in vitro*. Para esto se esterilizaron las semillas con una solución de detergente y cloro (5%). Posteriormente, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas se sembraron en frascos de vidrio con medio MS sólido (Medio basal Murashige & Skoog 0,44%, mioinositol 100 ppm, sacarosa 20% y agar-agar 7%) a pH

5,8. Al cabo de 4 semanas las hojas de las plantas tuvieron un tamaño adecuado para ser transformadas de manera estable.

Para este tipo de transformación se realizaron cultivos de *A. tumefaciens* aptos para favorecer la infección de los tejidos vegetales. Luego, se coincubaron por 10 min segmentos de hojas de plántulas de tabaco cultivadas *in vitro* con el cultivo de *Agrobacterium* portador de la construcción de interés. Posteriormente, las hojas se depositaron en una placa de medio MS sólido, sin antibiótico. La placa se mantuvo en condiciones de oscuridad durante 48 h para facilitar la infección de *Agrobacterium* a las células vegetales. Luego se traspasaron las hojas o explantes a los medios adecuados para inducir la organogénesis somática, la cual permitió generar brotes y finalmente plantas adultas que portan el gen *lcyb1* de *D. carota*.

El proceso de organogénesis consta de tres medios de inducción: el medio 1 contiene kanamicina (Kan, 25mg/L) o higromicina (15 mg/mL), 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 indispensables para inducir la organogénesis somática. La kanamicina se utilizó para seleccionar las plantas que portan el vector pGWB2 con el gen de interés y la higromicina para seleccionar las plantas que portan el vector pMDC32 con el gen de interés. El medio 2 contiene Kan (50 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Finalmente el medio 3 contiene Kan (100 mg/L) y cefotaxime (150 mg/L) antibiótico que favorece la eliminación de *Agrobacterium*. A todos estos medios se les agregó el antifúngico PPM (90 mg/L) para evitar el crecimiento de posibles agentes contaminantes en el medio MS.

Para el cultivo en el invernadero, las plántulas *in vitro* obtenidas producto de la organogénesis somática, se trasplantaron a maceteros de 1200 cm³, con una mezcla de tierra de hoja: tierra fina especial N°3 marca sunshine: vermiculita (1:1:1) con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 22°C. Esta primera etapa es crucial ya que consiste en la aclimatación de las plantas a su nuevo sustrato, la tierra, y especialmente a las condiciones de humedad ambiental. Para favorecer esta etapa, inicialmente cada plántula se cubrió con un recipiente de plástico de manera de mantener la alta humedad en la que fueron desarrolladas durante su cultivo *in vitro*. A partir de 2 semanas, las plantas se destaparon gradualmente, para finalmente destaparlas completamente en un periodo de aproximadamente 4 semanas.

2.9.3 Cultivo y transformación estable de *D. carota*

Para la transformación estable de la zanahoria, se utilizaron los explantes de las plántulas cultivadas *in vitro*. Para el cultivo *in vitro*, primero se esterilizaron las semillas durante 10 min. en agitación con una solución al 2% de fungicida CAPTAN. Se decantó la mezcla para descartar el líquido. Luego, se lavó tres veces con 50 mL de agua destilada estéril. Después, se les agregó a las semillas 50 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20% y se mantuvo en agitación durante 1 hora. Las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se retiró el exceso de agua de las semillas con papel absorbente estéril. Luego, éstas se sembraron en placas con medio basal MS. Las plantas regeneradas fueron utilizadas para la transformación estable de zanahoria con los vectores pGWB2//*icyb1* y pMDC32//*icyb1*.

En *D. carota* se ha estandarizado el método de transformación estable por *A. tumefaciens* (modificado de Chen y Punja, 2002). En este procedimiento se

coincubaron explantes de los epicotilos de zanahoria, de 1 cm de largo, cultivadas *in vitro* con los cultivos de *A. tumefaciens* que contienen las construcciones pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1*. Esta co-incubación se realizó en un tubo Falcon de 50 mL durante 10 min con agitación constante. Luego, los explantes se secaron en papel absorbente estéril y se depositaron en una placa de MS sin antibiótico ni hormonas. La placa se mantuvo en condiciones de oscuridad durante 48 h, para luego traspasar los explantes a las placas de medio I para inducir la embriogénesis.

El medio I contiene kanamicina (25 mg/L) o higromicina (4 mg/mL) (ya que los vectores pGWB2 y pMDC32 expresan el gen *nptII* y *hptII* en plantas), la auxina 2,4-D (1 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Después de 6 semanas, los explantes se pasaron al segundo medio (medio II), que contiene kanamicina (50 mg/L) o higromicina (8 mg/mL), 2,4-D (0,5 mg/L) y cefotaxime (300 mg/L). Después de permanecer 5 semanas en el segundo medio los explantes desarrollaron tejido pre-embriogénico, y al finalizar las 5 semanas se pasaron al tercer (medio III). En este medio, se aumentó la concentración de kanamicina a 100 mg/L, el cefotaxime se redujo a 150 mg/L y se eliminó la hormona 2,4-D para favorecer la maduración de los embriones, los que empezaron a aparecer al cabo de las 3 semanas en este medio. Al cabo de las 5 semanas se logró obtener tejido embriogénico, los cuales dieron origen a plántulas de zanahoria. Los explantes se desarrollaron con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a través de su desarrollo en los tres medios de crecimiento. Las plántulas regeneradas se pasaron a frascos de MS donde elongaron y enraizaron. Luego de 6 meses, se obtuvieron plántulas con raíces apropiadas para su aclimatación a tierra. Para el cultivo en invernadero, las plántulas *in vitro* obtenidas de la embriogénesis somática producto de la transformación con los vectores pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1* se trasplantaron a

maceteros de 1200 cm³ aprox., con una mezcla de tierra de hoja: vermiculita (2:1) y condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a una temperatura constante de 22°C. Para la aclimatación de las plantas, éstas inicialmente fueron cubiertas con una bolsa de plástico de manera de mantener la alta humedad a la que fueron sometidas durante su cultivo *in vitro*. Luego de 4 semanas, las plantas se comenzaron a destapar gradualmente, para terminar por destaparlas completamente en un periodo de 6 semanas aproximadamente.

2.10 Análisis bioquímicos y bioinformáticos

2.10.1 Localización Subcelular del gen *lcyb1* de *D. carota* mediante Microscopía de fluorescencia

Para realizar los experimentos de localización subcelular se utilizó la construcción pMDC85/*lcyb1*, la cual cuenta con un promotor 35S doble y el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP). El análisis de la localización subcelular se realizó verificando la expresión de GFP en tejido vegetal de tabaco (hoja) transformado transitoriamente con el vector pMDC85/*lcyb1* mediante *A. tumefaciens* que porta este vector (sección 2.9.1). Para esto se agro-infiltró hojas de tabaco. Luego de transcurridos 4 días de incubación a 23°C, se realizaron cortes muy finos del tejido infiltrado de hojas. Estas muestras fueron observadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX70). Como control negativo se utilizaron muestras infiltradas con *Agrobacterium* transformado con el vector pCAMBIA-GFP y como control positivo se usaron muestras transformadas con pBI121/*recA*, vector que cuenta con el gen que codifica para la proteína RECA, la cual presenta una localización subcelular plastidial.

2.10.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE)

Con el fin de analizar la expresión de la proteína recombinante (LCYB1::HIS) se usó SDS-PAGE. El gel separador fue preparado al 12 % (p/v) usando 1.7 mL de agua desionizada, 2 mL de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0.8 % (p/v); 1,3 mL de un tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 50 μ L de SDS 10% (p/v), 50 μ L de APS 10 % (p/v) fresco y 5 μ L de TEMED. El gel concentrador fue preparado al 5 % (p/v) usando 0.68 mL de agua desionizada, 170 μ L de una solución de acrilamida 30 % (p/v) y bis-acrilamida 0.8 % (p/v); 130 μ L de un tampón Tris-HCl 0.5 M pH 6,8; 10 μ L de SDS 10% (p/v), 10 μ L de APS 10 % (p/v) fresco y 1 μ L de TEMED. El tampón de corrida fue preparado con Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 192 mM, SDS 0.1 % (p/v). Se mezclaron las muestras con una solución 3X de tampón de carga [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, glicerol 20 % (v/v), β -mercaptoetanol 2% (v/v), Azul de bromofenol 0.1 % (p/v) y SDS 4 % (p/v)] y hervidas por 10 min. Se cargaron \sim 70 μ g de proteínas de cada muestra y se corrió por dos h con un potencial de 100 V. Los geles fueron revelados mediante tinción de Coomassie (Merril, 1990).

2.10.2.1 Inmunodetección mediante Western-Blot

Una vez resuelto el gel SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa usando Trans-Blot® SD “Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad). La transferencia se efectuó a 15 V por 2 h. Luego de la transferencia se lavó la membrana en TBS-T [Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 140 mM y Tween-20 0.1 % (v/v)] y se constató la transferencia incubando la membrana con una solución de Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0.1 % (p/v), ácido acético 5 % (v/v)). Se lavó la membrana

con agua destilada hasta que la tinción desapareciera, luego se incubó con leche 4 % (p/v) con agitación suave (3 h, TA). Después se lavó 3 veces con TBS-T durante 5 min. La membrana fue incubada en leche 4 % (p/v) y el anticuerpo primario ("Monoclonal Anti-poly Histidine antibody produced in mouse" Sigma® (1:3000) con agitación suave (16 hrs, 4 °C). Luego de la incubación, se lavó la membrana 3 veces con TBS-T durante 10 min. Después del último lavado la membrana fue incubada en leche 4 % (p/v) y el anticuerpo secundario ["Anti-Mouse IgG (whole molecule) alkaline phosphatase conjugate" Sigma® (1:25000)] con agitación suave (3 h, TA). La membrana se lavó 3 veces con TBS-T durante 10 min y 2 veces con tampón Alcalino (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM y MgCl₂ 5 mM) durante 5 min. Para el revelado se incubó la membrana con 20 mL de tampón Alcalino, 66 µL de NBT 50 % (p/v) en DMSO y 33 µL de BCIP 50 % (p/v) en DMSO a TA, hasta que las bandas se hicieran visibles (~10 min). Finalmente la reacción se detuvo con 20 mL de EDTA (20 mM).

2.10.3 Determinación de la cantidad y la composición de los carotenoides

2.10.3.1 Extracción de los Carotenoides

Para la extracción a partir de las hojas del tabaco (3 meses de edad) y las hojas (3 meses de edad) y raíces (6 meses de edad) de la zanahoria, se utilizaron 100 mg de tejido. El tejido se molió en un mortero en presencia de N₂ líquido y se homogeneizó con 2 mL de una solución de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v). Se recolectó el homogenizado y se agitó continuamente durante 2 min en un vórtex y se mantuvo en hielo y oscuridad por 2 min más. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Los carotenoides fueron recuperados de la fase superior. Durante todo el proceso de

extracción, la muestra se mantuvo en oscuridad y frío. Finalmente, la fase orgánica recuperada se secó con N₂ gaseoso y se almacenó a -80°C hasta determinar la cantidad de carotenoides.

2.10.3.2 Cuantificación de los pigmentos totales mediante espectrofotometría.

La extracción de carotenoides se secó en N₂ gaseoso y se resuspendió en 1 mL de bencina de petróleo. Se midió la absorbancia de esta solución para determinar la cantidad de pigmentos totales (carotenoides y clorofila) en la muestra a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides Totales} = \frac{\text{Volumen de resuspensión (mL)}^* \times \text{Absorbancia (474 nm)} \times 100}{21 \times \text{Peso Seco (g)}^{**}} \times \text{DILUCION}$$

*El volumen de resuspensión fue de 0,5 mL de una dilución 1:4 a partir de la 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 y 0,285, para raíz y hoja de zanahoria, y 0,11 para hoja de tabaco (Pizarro 2008, Flores 2011).

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

2.10.3.3 Composición de los pigmentos mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para determinar la composición y la cantidad de los pigmentos presentes en las muestras obtenidas a partir de la extracción realizada anteriormente, se usó un equipo de HPLC Shimadzu, modelo LC-10AT con detector de diodos. La extracción de los

carotenoides se resuspendió en 400 μ L de acetona, y 50 μ L de esta solución se utilizaron para el análisis de HPLC. Estos pigmentos se separaron por HPLC en una columna de fase reversa RP-18 Lichrocart 125-4 (Merck). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo de 1 ml/min a temperatura ambiente, en condiciones isocráticas. Los espectros de cada máximo de elución fueron obtenidos utilizando un detector con arreglo de diodos. Los carotenoides fueron identificados de acuerdo a sus espectros de absorción, tiempos de retención y comparación con estándares específicos para cada carotenoide. Para la cuantificación de los carotenoides fue usado el programa computacional LC-Solutions®, el cual determinó la cantidad de cada carotenoide como el área bajo la curva de cada pico. Con lo mencionado anteriormente se logró asignar de manera precisa un carotenoide a determinado pico.

Finalmente, para determinar la concentración de los carotenoides, se correlacionó el área correspondiente a los picos de interés con la concentración de los carotenoides totales obtenida previamente por espectrofotometría, de esta manera se restó el contenido de clorofila y se calculó la concentración de los carotenoides detectados.

2.10.4 Análisis “*In silico*” de la localización subcelular de la proteína LCYB1 de *D. carota*

Se realizó un análisis bioinformático para predecir si la proteína codificada por el gen *lcyb1* de *D. carota* presenta un péptido señal, dominios transmembrana y la localización subcelular mediante el uso de programas en línea disponibles en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CBBresearch/Lu/subcellular>) y otros

programas disponibles en línea que predicen específicamente localización subcelular de proteínas vegetales.

RESULTADOS

3.1 Clonación del gen *lcyb1-c/t* y *lcyb1-s/t* en el vector de entrada pCR®8

3.1.1 Amplificación del gen *lcyb1* con y sin terminador mediante PCR

Se amplificó el gen *lcyb1* de *D. carota* a partir del vector pET-Blue1//*lcyb1* generado previamente en el seminario de título (Moreno, 2010) y se verificó que posee un 99% de identidad nucleotídica con el gen *lcyb1* de *D. carota* anotado en la base de datos del GenBank. Para la amplificación del gen *lcyb1* incluyendo el codón de término de la transcripción se usaron los partidores 5' *lcyb1* sentido y 3' *lcyb1 c/t*, y para amplificar el gen *lcyb1* sin el codón de término de la transcripción se usaron los partidores 5' *lcyb1* sentido y 3' *lcyb1 s/t* antisentido (sección 2.7.2.1, Tabla I) y poder fusionar este gen al gen *gfp* para los experimentos de localización subcelular. En la Figura 7 A y B se muestra la amplificación del fragmento de 1,6 Kb correspondiente al gen *lcyb1* con y sin terminador, respectivamente. El control negativo (carril C-, Figura 7) no presenta ningún tipo de amplificado, lo que refleja una correcta manipulación de las muestras y desarrollo de la técnica.

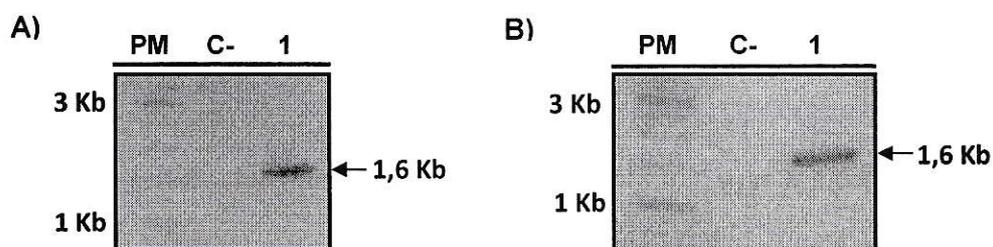


Figura 7. Amplificación del gen *lcyb1* con codón de término (A) y sin codón de término (B) de la transcripción. Se amplificó un fragmento de 1,6 Kb correspondiente al gen *lcyb1* de *D. carota* a partir de DNA plasmidial (vector pET-Blue1//*lcyb1*). Como control negativo (C-) se usó agua como molde. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con BrEt. PM: Estándar de peso molecular de 1Kb.

Una vez obtenido el amplificado del gen *lcyb1* de *D. carota* se llevó a cabo la reacción de ligación con el vector pCR8 y la transformación de células de *E. coli* DH5 α mediante golpe térmico (sección 2.4.1).

3.1.2 Análisis de la construcción pCR8//*lcyb1* s/t y c/t

De las colonias obtenidas se seleccionaron 4 para cada construcción (pCR8//*lcyb1* c/t y s/t) y se incubaron por 16 h en medio LB líquido con el antibiótico espectinomycin (50mg/L, sección 2.3.1). Luego, se extrajo el DNA plasmidial mediante kit de extracción (sección 2.5.3), el cual se digirió con las enzimas de restricción *Ava*I y *Hind*III (sección 2.5.4) para corroborar la presencia y orientación del gen *lcyb1* en el vector. La enzima *Hind*III corta una vez en el inserto en la posición 37 del gen *lcyb1*, mientras que la enzima *Ava*I corta tres veces en el vector pCR8 en las posiciones 561, 1174 y 2078 pb. De las 4 colonias digeridas para cada construcción, se obtuvieron dos colonias que presentaron las 4 bandas de 2024, 1383, 904 y de 160 pb (aunque no se observó la banda de 160 pb debido a la resolución del gel de agarosa, Figura 8) de acuerdo a lo esperado para un vector que porta el cDNA del gen *lcyb1* en orientación sentido respecto del origen de replicación pUC y del sitio attL1. El patrón de bandas obtenido es distinto del esperado para el inserto del gen en antisentido (1600, 1300, 900 y 560 pb). Un clon fue posteriormente secuenciado, corroborando la perfecta identidad nucleotídica (100%) con la secuencia originalmente clonada en pET-Blue1//*lcyb1*.

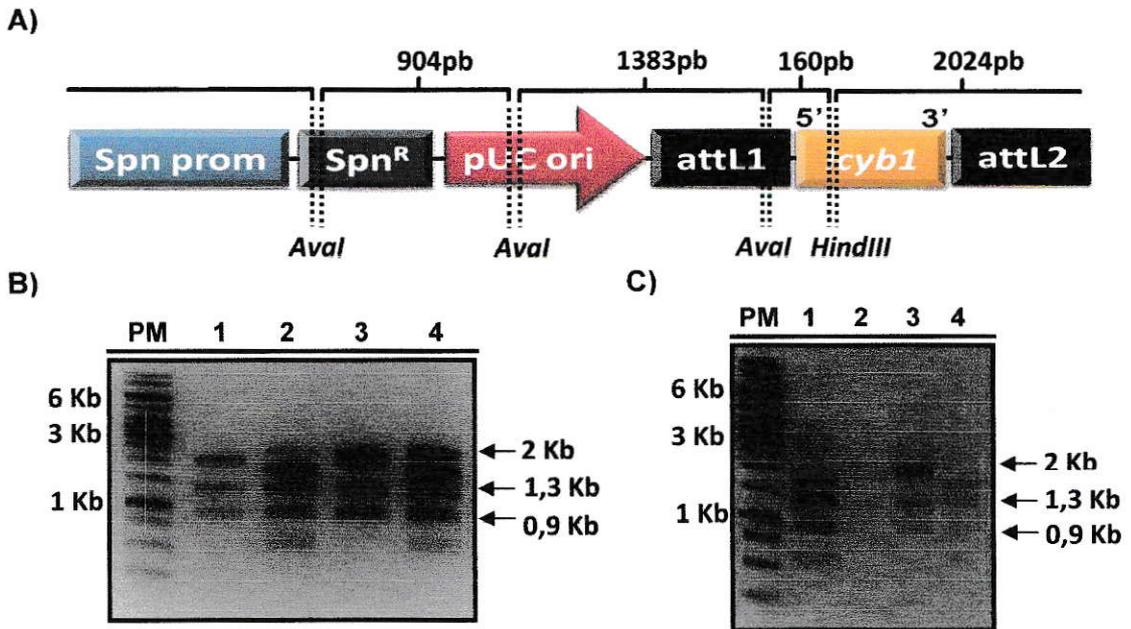
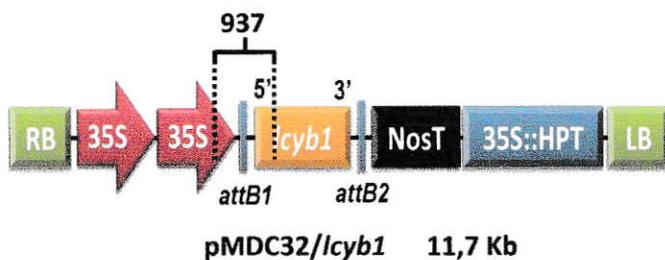
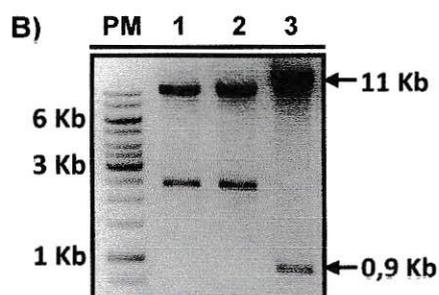
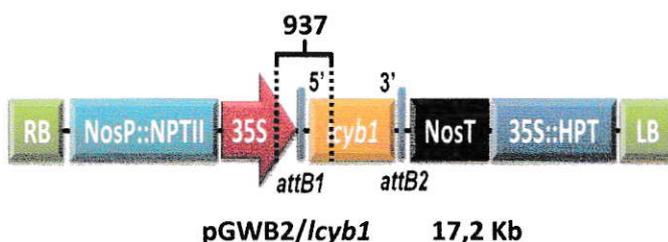
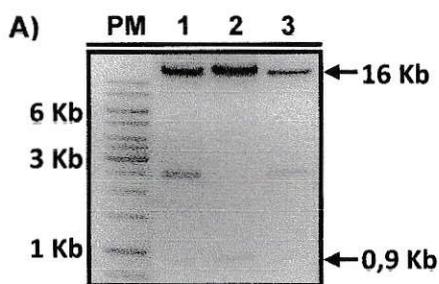


Figura 8. Digestión de la construcción pCR8//lcyb1 con HindIII y Aval. **A)** Esquema de la digestión del vector pCR8//lcyb1 con las enzimas HindIII y Aval para la inserción del gen *Dclcyb1* en orientación sentido. **B)** Carriles 1, 2, 3 y 4: Digestión del DNA plasmidial de cuatro clones que portan el vector pCR8//lcyb1 ct (con terminador). **C)** Carriles 1, 2, 3 y 4: Digestión del DNA plasmidial de cuatro clones que portan el vector pCR8//lcyb1 st (sin terminador). Las flechas indican los tamaños de 2, 1,3, 0,9 y 0,16 Kb esperados en los clones en orientación sentido del gen. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con Bret. PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb.

3.2 Construcción de los vectores binarios pGWB2//lcyb1, pMDC32//lcyb1, pMDC85//lcyb1 y pGWB8//lcyb1 para el estudio del gen *lcyb1*

Mediante recombinación sitio-específica (Tecnología Gateway®, sección 2.7; 2.7.2.3; Figura 5) se obtuvieron las construcciones pGWB2//lcyb1 y pMDC32//lcyb1 para realizar los experimentos de expresión del gen *lcyb1* de *D. carota* en los modelos vegetales empleados en este trabajo. Para evaluar la presencia de la proteína LCYB1 se obtuvo el vector pGWB8//lcyb1 y para determinar la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1 se generó la construcción pMDC85//lcyb1.

Una vez generadas las construcciones, se realizaron los análisis moleculares que permitieron corroborar la orientación en sentido del gen *lcyb1* con respecto al promotor 35S presente en los vectores de expresión. Estas construcciones fueron digeridas con la enzima de restricción *HindIII*, la cual presenta un sitio de corte en cada vector de expresión (4954, 2849, 3559 y 4954 pb, respectivamente en cada vector) y otro en el gen *lcyb1* (35 pb). Es así como se obtuvieron dos bandas de 16,3 Kb y 0,9 Kb para el vector pGWB2/*lcyb1* (Figura 9 A), 10,8 Kb y 0,9 Kb para el vector pMDC32/*lcyb1* (Figura 9 B), 11,5 Kb y 0,9 Kb para pMDC85/*lcyb1* (Figura 9 C) y 16,5 Kb y 0,9 Kb para el vector pGWB8/*lcyb1* (Figura 9 D).



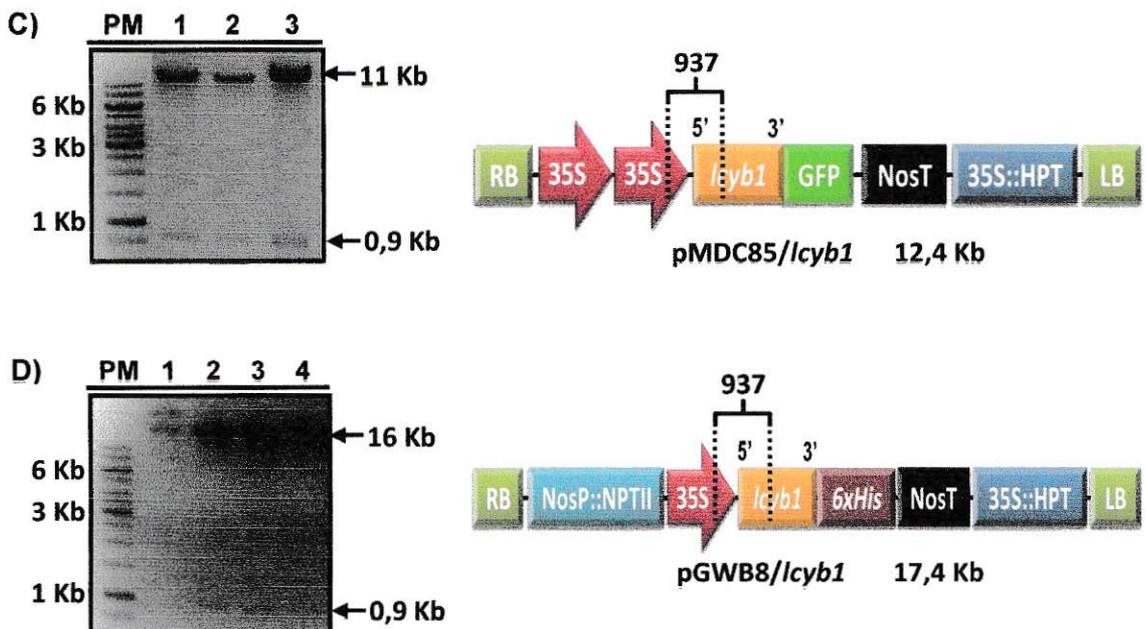


Figura 9. Análisis de restricción con la enzima *Hind*III de los vectores pGWB2, pMDC32, pMDC85 y pGWB8 que poseen clonado el gen *lcyb1*. Se muestran los esquemas (derecha) y la digestión (izquierda) con la enzima *Hind*III de los vectores respectivos. **A)** Se muestran 3 clones pGWB2/*lcyb1* en donde solo en el clon 2 se observan los fragmentos de 16 y 0,9 Kb (flechas en negro) y que corresponden a una orientación en sentido del gen *lcyb1*. **B)** Se muestran 3 clones pMDC32/*lcyb1* en donde solo en el clon 3 se observan los fragmentos de 11 y 0,9 Kb (flechas en negro) esperados para la clonación en orientación en sentido del gen *lcyb1*. **C)** Se muestran 4 clones pMDC85/*lcyb1* donde en los tres clones se observan los fragmentos de 11 y 0,9 Kb (flechas en negro) y que corresponden a una orientación en sentido del gen *lcyb1*. **D)** Se muestran 4 clones pGWB8/*lcyb1* donde en el clon 1 se observa DNA plasmidial sin digerir y en los clones 2, 3 y 4 se observan los fragmentos de 11 y 0,9 Kb (flechas en negro) y que corresponden a una orientación en sentido del gen *lcyb1*.

De este modo contamos con al menos un clon de cada construcción que posee el gen *lcyb1* clonado en sentido respecto al promotor 35SCaMV, los que fueron usados posteriormente para transformar *Agrobacterium tumefaciens* (sección 2.4.1). Los vectores obtenidos en esta tesis se resumen en la Tabla III.

Tabla III. Construcciones generadas en esta tesis.

Construcción	Nombre	Genotipo y características relevantes	Resistencia conferida
<i>pCR8/lcyb1</i>	<i>pCR8/lcyb1</i>	Construcción que presenta al gen <i>lcyb1</i> clonado con y sin terminador de la transcripción.	Espectinomicina (100 mg/mL)
<i>pMDC32/lcyb1</i>	<i>pM32/lcyb1</i>	Promotor doble 35S; gen <i>HptII</i> ; Amp ^R . Presenta el gen <i>lcyb1</i> clonado en orientación sentido con respecto al promotor doble 35S.	Kanamicina en bacterias (100 mg/mL) Higromicina en plantas (50 mg/mL)
<i>pGWB2/lcyb1</i>	<i>pG2/lcyb1</i>	Promotor 35S; gen <i>NptII</i> y <i>HptII</i> ; Amp ^R y Cam ^R . Presenta el gen <i>lcyb1</i> clonado en orientación sentido con respecto al promotor doble 35S.	Kanamicina en bacterias y plantas (100 mg/mL) Higromicina en plantas (50 mg/mL)
<i>pGWB8/lcyb1</i>	<i>pG8/lcyb1</i>	Promotor 35S; gen <i>NptII</i> y <i>HptII</i> ; Amp ^R y Cam ^R . Presenta el gen <i>lcyb1</i> fusionado a una cola de histidina en orientación sentido al promotor 35S.	Kanamicina en bacterias y plantas (100 mg/mL) Higromicina en plantas (50 mg/mL)
<i>pMDC85/lcyb1</i>	<i>pM85/lcyb1</i>	Promotor doble 35S; gen <i>NptII</i> y <i>HptII</i> ; Amp ^R y Cam ^R . Presenta el gen <i>lcyb1</i> fusionado al gen del GFP en orientación sentido al promotor 35S.	Kanamicina en bacterias (100 mg/mL) Higromicina en plantas (50 mg/mL)

3.2.1 PCR de colonia de *Agrobacterium tumefaciens* transformado con los vectores *pGWB2/lcyb1*, *pMDC32/lcyb1*, *pMDC85/lcyb1* y *pGWB8/lcyb1*

Se obtuvieron colonias de *A. tumefaciens* transformadas con los vectores *pGWB2/lcyb1*, *pMDC32/lcyb1*, *pMDC85/lcyb1* y *pGWB8/lcyb1* a partir de las cuales se hizo un PCR de colonias (sección 2.6) con partidores específicos para el gen *lcyb1* (Tabla I) y poder corroborar de manera temprana que la construcción con el gen de

interés efectivamente se integró en el genoma de *A. tumefaciens*. Se obtuvieron 1 y 2 clones que amplificaron el gen *lcyb1* (Figura 10).

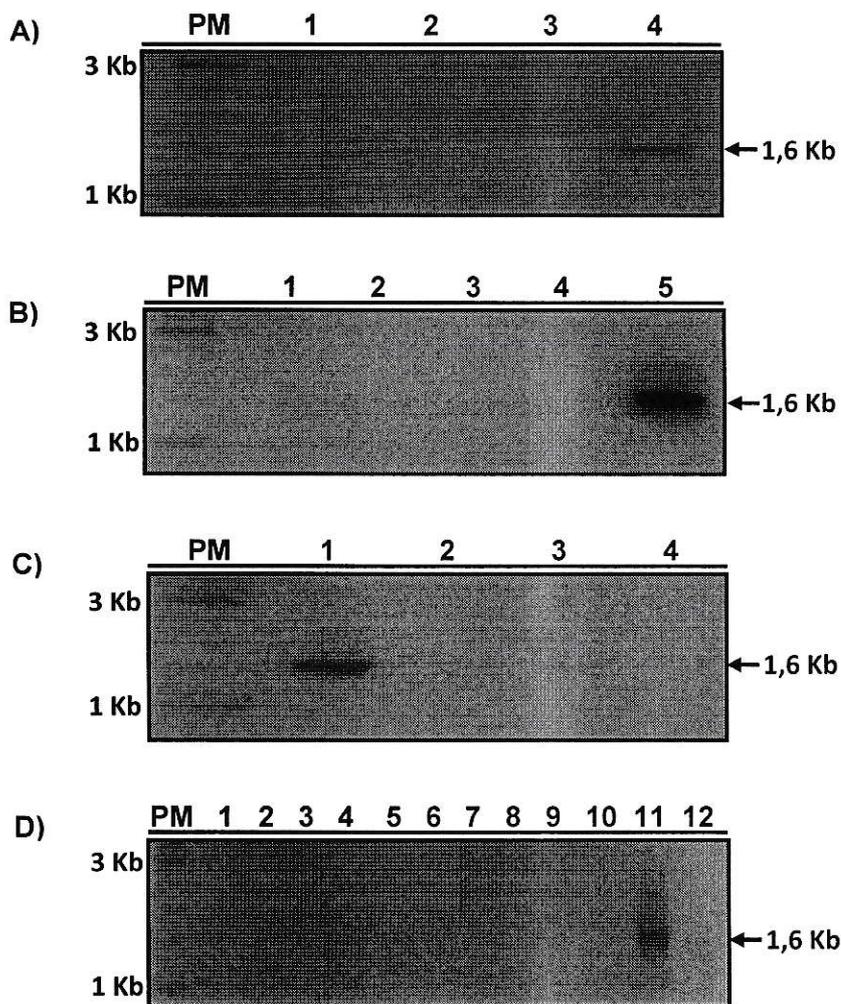


Figura 10. PCR de colonia de *A. tumefaciens* transformado con los vectores pGWB2//*lcyb1*, pMDC32//*lcyb1*, pMDC85//*lcyb1* y pGWB8//*lcyb1*. En los clones positivos se observa el amplificado de 1,6 Kb correspondiente al gen *lcyb1* de *D. carota*. **A)** *Agrobacterium* transformado con el vector pGWB2//*lcyb1*. **B)** *Agrobacterium* transformado con el vector pMDC32//*lcyb1*. **C)** *Agrobacterium* transformado con el vector pMDC85//*lcyb1*. **D)** *Agrobacterium* transformado con el vector pGWB8//*lcyb1*.

A partir de esta confirmación temprana de la correcta clonación e inserción del gen *lcyb1* en el vector de expresión y en *A. tumefaciens* se transformaron plantas de

tabaco y zanahoria de manera transitoria (tabaco) y estable (tabaco y zanahoria) con estos vectores.

3.3 Determinación de la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1

3.3.1 Determinación “*In silico*” de la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1

Mediante el uso de distintas herramientas bioinformáticas (resumidas en la Tabla IV) se predijo que la proteína LCYB1 de *D. carota* es destinada a los cloroplastos (Tabla IV) y que es probable que no posea dominios transmembrana (datos no mostrados).

Tabla IV. Predicción de la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1.

Herramienta en línea	Descripción del método	Resultado	Detalles
WoLF-PSORT	Localización subcelular en eucariontes	Cloroplasto y Réticulo	CP: 3.0, RE: 3.0, NC: 2.5, CM: 2.0, MP: 2.0, CT: 2.0
Plant-mPloc	Localización subcelular en plantas	Cloroplasto	-
Y-loc	Localización subcelular en plantas	Cloroplasto	97.6% de precisión esperada
SubcellProt	Localización subcelular en plantas	Cloroplasto	85% de precisión esperada
EpiLoc	Localización subcelular en plantas	Cloroplasto	CP: 0.7; CM: 0.05; RE: 0.01; MP: 0.007; M: 0.01
ESLpred2	Predicción mediante alineamientos y propiedades fisicoquímicas	Cloroplasto	48% de precisión esperada

CP: cloroplasto; **CM:** citoplasma; **CT:** citoesqueleto nuclear; **RE:** reticulo; **MP:** membrana plasmática; **M:** mitocondria. Los valores que entrega el programa **WoLF-PSORT** hacen referencia directamente al número de secuencias en la base de datos que se asemejan a la secuencia objetivo y que se ubican en el compartimento sub-celular mencionado, los valores de **Y-loc** se refieren a la probabilidad de encontrar esa proteína en el compartimento sub-celular indicado, los valores de **EpiLoc** hacen referencia a un puntaje arbitrario que entrega el método con una valor máximo de 1 y mínimo de 0.

3.3.2 Determinación de la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1 por medio de agro-infiltración de hojas de tabaco con el vector pMDC85//*cyb1*

Para evaluar la localización sub-celular se empleó la construcción pMDC85//*cyb1* (Tabla III), en la cual se produce una proteína LCYB1 fusionada a la proteína reportera GFP. Además, se contó con un control positivo de este experimento el cual corresponde al vector pBI121 que presenta el gen *recA*, que codifica para una proteína de localización plastidial, y que se encuentra fusionada a GFP (donado por la Dra. Lee Meisel), y un control negativo que corresponde al vector pCAMBIA-GFP. Estos vectores se emplearon para transformar de manera transitoria hoja de tabaco y al cabo de 4 días se realizaron cortes delgados del tejido y se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia con el fin de detectar la fluorescencia del GFP (sección 2.10.1). La proteína GFP debido a su pequeño tamaño (251 aa) es destinada principalmente al citoplasma y núcleo celular, lo cual fue observado en muestras del tejido transformado con pCAMBIA-GFP (Figura 11 A). Este resultado concuerda con el campo claro donde se puede observar claramente el contorno celular, dado por la membrana y la pared celular (Figura 11 D). Al infiltrar con el vector pMDC85//*cyb1* se observa un patrón de fluorescencia de GFP de puntos discretos de forma ovalada dentro de la célula, el cual es característico de los plastidios vegetales (Figura 11 B) y que se puede observar también en nuestro control positivo, RECA (figura 11 C). Esto se condice con lo observado en el campo claro para estos dos patrones de fluorescencia donde se observan estas estructuras al interior de la célula (Figura 11 E y F). Con este resultado, en conjunto con los resultados obtenidos por medio de análisis bioinformáticos corroboramos la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1 a los plastidios de células vegetales.

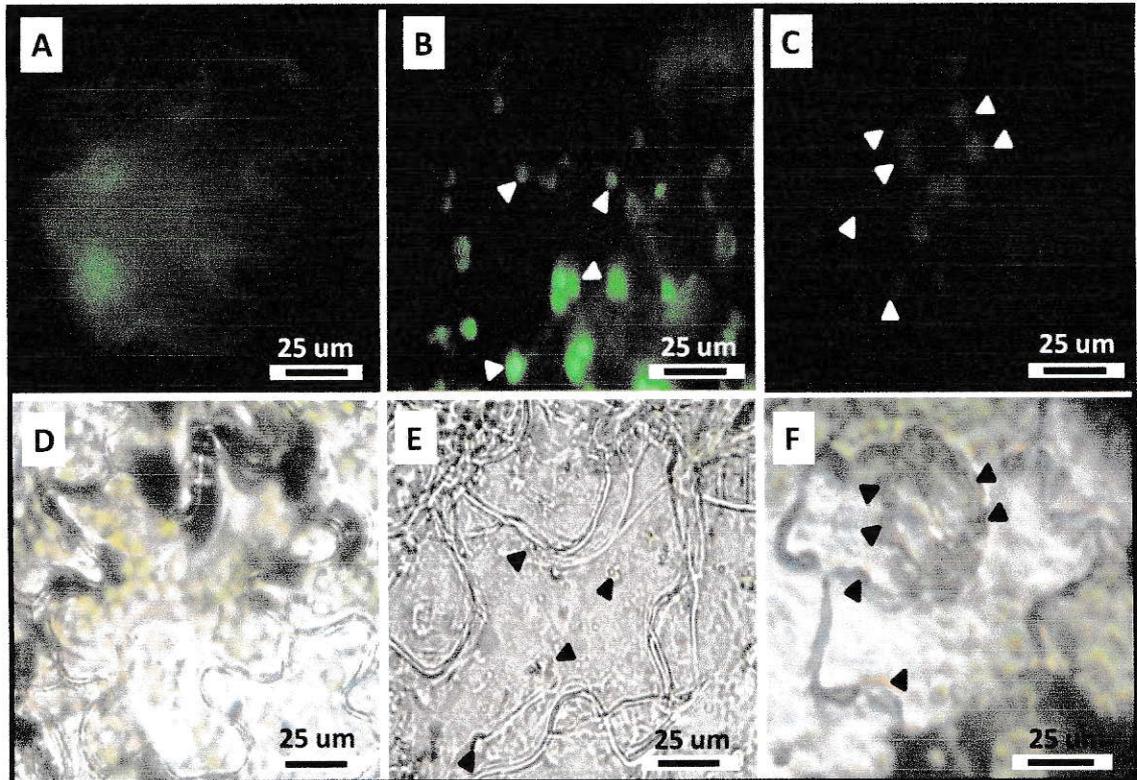


Figura 11. Localización subcelular de la proteína DcLCYB1. **A)** Control Negativo: Fluorescencia de células epidermales de tabaco expresando GFP soluble. **B)** Fluorescencia de células epidermales de tabaco expresando DcLCYB1-GFP. **C)** Control Positivo: Fluorescencia de las células epidermales de tabaco expresando RECA-GFP. **D)** Control Negativo: Se observan en el campo claro células epidermales de tabaco transformadas con la construcción pCAMBIA-GFP. **E)** Campo claro donde se observan células epidermales de tabaco transformadas con la construcción DcLCYB1-GFP. **F)** Control Positivo: Se observa en el campo claro células epidermales de tabaco transformadas con la construcción RECA-GFP. Las flechas blancas indican fluorescencia plastidial. Las flechas negras señalan los plastidios en el campo claro de las células observadas.

Estos resultados son de gran relevancia y son el primer indicio de que la proteína DcLCYB1 efectivamente se encuentra localizada en los plastidios de las células de tabaco, compartimiento donde se lleva a cabo la biosíntesis de carotenoides y donde se ha reportado previamente que las enzimas carotenogénicas cumplen su función.

3.4 Transformación y obtención de las plantas de tabaco y zanahoria transformadas establemente

3.4.1 Transformación estable de plantas de tabaco con los vectores pGWB2//*cyb1*, pMDC32//*cyb1* y pGWB8//*cyb1*

Para la transformación estable de plantas de tabaco se incubaron hojas de tabaco silvestre con *A. tumefaciens* que porta los vectores pGWB2//*cyb1*, pMDC32//*cyb1* y pGWB8//*cyb1* (Figura 12, sección 2.9.2). Al cabo de 4 semanas estas hojas ya presentaban ensanchamiento y varios brotes en su superficie (figura 12 B), los cuales darán origen a las plántulas de tabaco al finalizar las 8 semanas de cultivo *in vitro*. En la última etapa de este proceso de organogénesis somática se pueden observar plántulas de tabaco de 12 semanas de edad listas para ser pasadas a tierra (figura 12 C). Como control del proceso de transformación también se transformaron hojas de *N. tabacum* con el vector pGWB2 sin inserto y con *Agrobacterium* sin transformar. Sin embargo, solo se obtuvieron plantas en tierra transformadas con *Agrobacterium* como control de la transformación, debido a que los explantes transformados con el vector sin inserto presentaron grandes contaminaciones con hongos.

Finalmente, plántulas de aproximadamente 10 cm de altura fueron trasplantadas a maceteros con tierra (sección 2.9.2), y a partir de estas líneas estables se seleccionaron 9 líneas de cada construcción (pGWB2//*cyb1*, pMDC32//*cyb1* y pGWB8//*cyb1*) para realizar todos los análisis moleculares y bioquímicos mostrados más adelante.

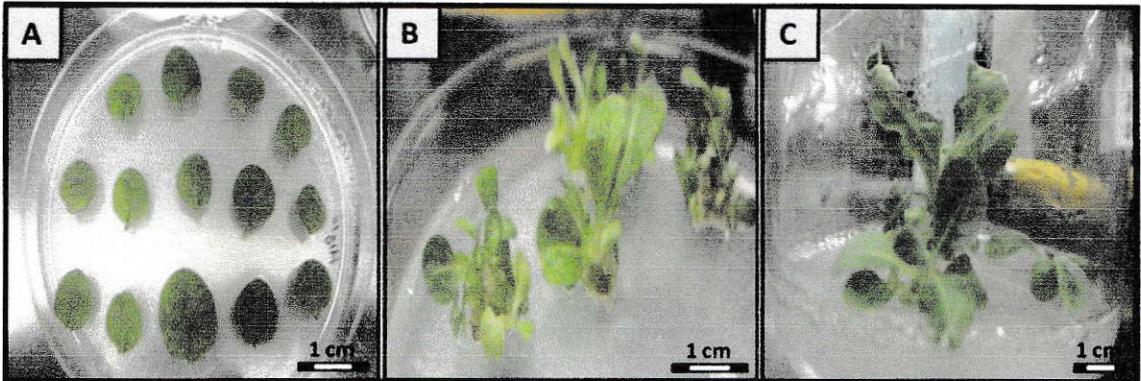


Figura 12. Proceso de organogénesis somática de *N. tabacum* transformado con los vectores pGWB2//*cyb1*, pMDC32//*cyb1*, y pGWB8//*cyb1*. A) Día 0 del proceso de transformación. Explantes de hojas de tabaco transformadas con los vectores pGWB2//*cyb1*, pMDC32//*cyb1* y pGWB8//*cyb1*, en el medio I de inducción (BAP 5 mg/L e IBA 1mg/L) con los respectivos antibióticos y antifúngicos (kanamicina 25 mg/L, cefotaxime 300 mg/L y PPM 90 mg/L). B) Explantes inducidos al final del medio II, luego de 6 semanas post-transformación. C) Plántulas de tabaco luego de 10 semanas cultivadas *in vitro* en ausencia de hormonas y en presencia de antibiótico y PPM.

3.4.2 Transformación estable y obtención de plantas de zanahoria con los vectores pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1*

Explantes de epicotilo de zanahoria (Figura 13 A) fueron transformados con *A. tumefaciens* portando los vectores pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1* con la finalidad de obtener plantas de zanahoria mediante el proceso de embriogénesis somática (sección 2.9.3). Al cabo de 5 semanas estos explantes ya presentaban un engrosamiento producto de la inducción de embriones (Figura 13 B). El tejido pre-embriogénico, dió lugar a embriones que al madurar generaron plántulas de zanahoria al cabo de otras 5 semanas (Figura 13 C). Cuando las plántulas alcanzaron una altura de aproximadamente 10 cm (Figura 13 D), éstas se traspasaron a maceteros con tierra (sección 2.9.3). Para tener un correcto control del proceso de embriogénesis somática se transformaron fragmentos de epicotilo de *D. carota* con *A. tumefaciens* que porta el

vector pGWB2 sin inserto, sin embargo contaminaciones reiteradas impidieron el paso a tierra de estas plántulas, por lo que se usaron plantas silvestres de zanahoria sin transformar como control en los experimentos.

Se seleccionaron 9 líneas de cada construcción para realizar los análisis moleculares y bioquímicos.

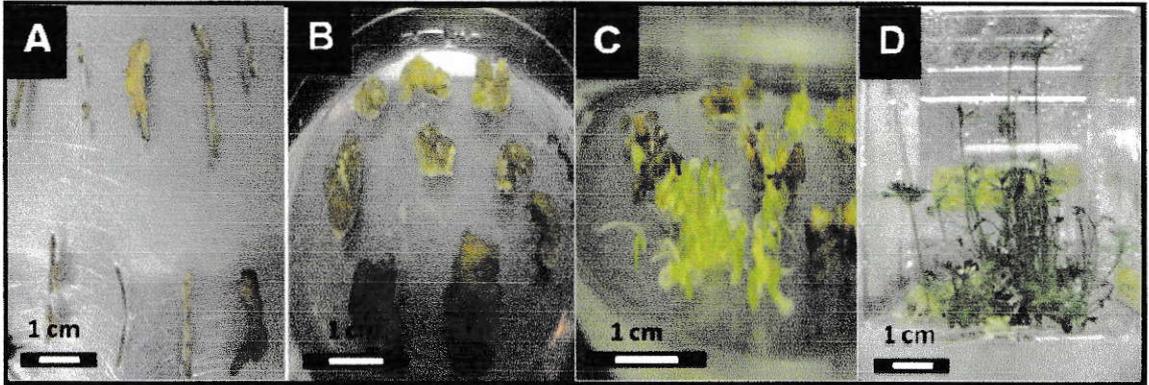


Figura 13. Proceso de embriogénesis somática de *Daucus carota* transformado con los vectores pMDC32//*cyb1* y pGWB2//*cyb1*. **A)** Se observan explantes de epicotilo de zanahoria transformados con los vectores pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1*, en el medio I de inducción (2,4-D 1 mg/L) con los respectivos antibióticos y antifúngicos (kanamicina 25 mg/L ó higromicina 4 mg/L, cefotaxime 300 mg/L y PPM 90 mg/L). **B)** Explantes inducidos al final del medio II, luego de 12 semanas post-transformación. **C)** Tejido pre-embriogénico de zanahoria luego de 17 semanas en medio MS en ausencia de hormonas y en presencia de antibiótico y PPM. **D)** Se observan plántulas de zanahoria de aproximadamente 8 cm de altura.

3.5 Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de tabaco y zanahoria mediante la amplificación del gen *hptII*

3.5.1 Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de tabaco

A partir de las plantas de tabaco adultas (3 meses de edad) transformadas con los vectores pGWB2//*cyb1*, pMDC32//*cyb1* y pGWB8//*cyb1*, se seleccionaron nueve líneas de los primeros dos vectores y ocho líneas del último vector para confirmar la transgénesis de las plantas. En primera instancia se corroboró la calidad del DNA amplificando el gen 18S (Figura 14 A, C y E). Luego de esto, se amplificó el gen *hptII*, gen de resistencia a higromicina que forma parte de la construcción como marcador de selección. En las líneas de tabaco transformadas con el vector pGWB2//*cyb1* se obtuvo la banda esperada de 655 pb en todas las líneas analizadas menos para la línea 8 y 12 (Figura 14 B). Por otra parte, todas las líneas analizadas para los vectores pMDC32//*cyb1* y pGWB8//*cyb1* presentaron el amplificado esperado para el gen *hptII* (Figura 14 D y F). Como es esperado, este gen no amplificó en el DNA de las hojas del tabaco silvestre (WT), lo que indica que los partidores son específicos para el gen *hptII* (Figura 14 B, D y F).

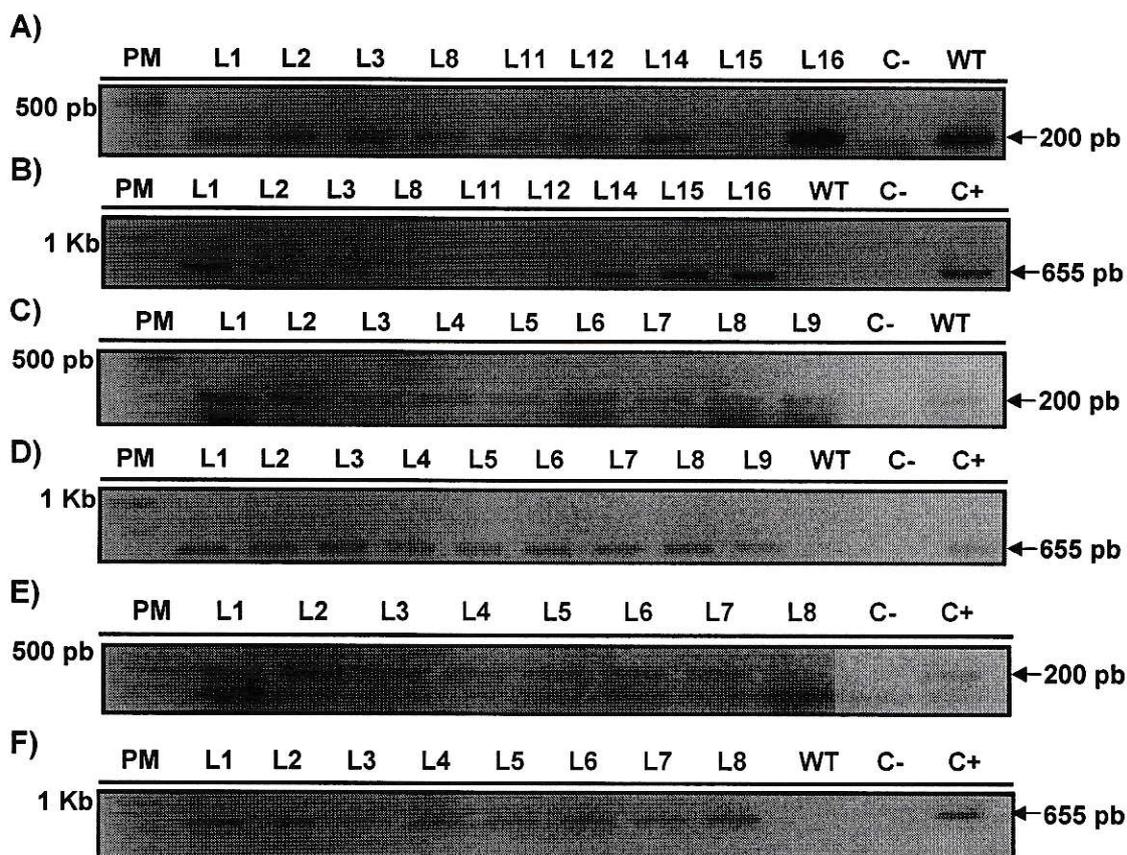


Figura 14. Análisis molecular de las líneas de tabaco obtenidas. A) Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB2//*cyb1*. B) Se amplificó un fragmento de 655 pb del gen *hptII* en las líneas pGWB2//*cyb1*. C) Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pMDC32//*cyb1*. D) Se amplificó un fragmento de 655 pb del gen *hptII* en las líneas pMDC32//*cyb1*. E) Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB8//*cyb1*. F) Se amplificó un fragmento de 655 pb del gen *hptII* en las líneas pGWB8//*cyb1*. Para el control negativo (C-) se utilizó agua como molde. Para el control positivo (C+) del gen *hptII* se utilizó DNA plasmidial (vector pGWB8) como molde.

3.5.2 Análisis molecular para determinar la transgénesis de las líneas de zanahoria obtenidas

A partir de las plantas de zanahoria adultas obtenidas en tierra (al cabo de 6 meses en el proceso de embriogénesis somática y 2 meses en tierra) con los vectores

pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1*, se seleccionaron nueve líneas de cada vector para realizar los respectivos análisis moleculares en las hojas de estas líneas para confirmar la presencia de las construcciones. En primera instancia se corroboró la calidad del DNA amplificando el gen 18S (Figura 15 A y C). Luego de esto, se amplificó el gen *hptII* a partir del DNA de las líneas de zanahoria transformadas con los vectores mencionados anteriormente, obteniendo un amplificado de 655 pb para todas las líneas analizadas (Figura 15 B y D). Como es esperado, este gen no amplificó en el DNA de las hojas de la zanahoria silvestre (Figura 15 B y D).

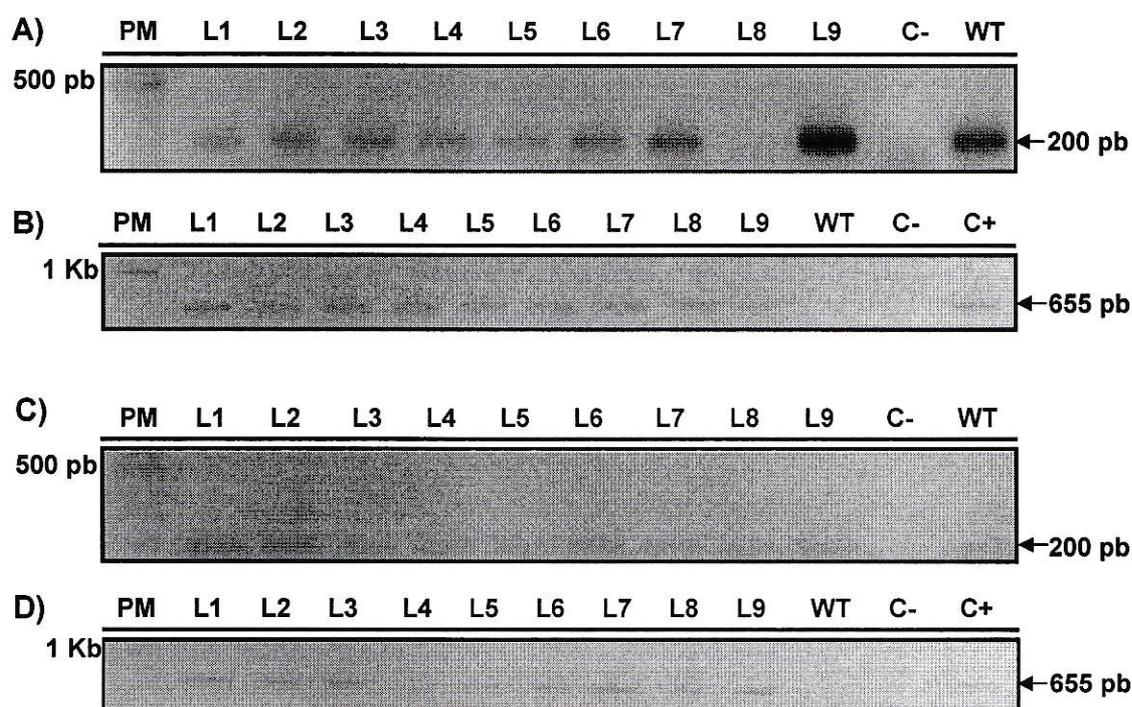


Figura 15. Análisis molecular de las líneas de las zanahorias obtenidas. A) Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pGWB2//*cyb1*. B) Se amplificó un fragmento de 655 pb del gen *hptII* en las líneas pGWB2//*cyb1*. C) Se amplificó un fragmento de 198 pb de la subunidad ribosomal 18S como control a partir de DNA genómico de las líneas transformadas con el vector pMDC32//*cyb1*. D) Se amplificó un fragmento de 655 pb del gen *hptII* en las líneas pMDC32//*cyb1*. Para el control negativo (C-) se utilizó agua como molde. Para el control positivo (C+) del gen *hptII* se utilizó DNA plasmidial (vector pGWB8) como molde.

3.6 Análisis moleculares y bioquímicos de las líneas transgénicas de tabaco y zanahoria

3.6.1 Análisis de expresión de la proteína recombinante DcLCYB1

La presencia de la proteína DcLCYB1 se determinó mediante ensayos de *western blot* (sección 2.10.2.1) en las líneas transgénicas de tabaco transformadas con el vector pGWB8//*cyb1* (Figura 14 F), en el cual la proteína DcLCYB1 se encuentra fusionada a una cola de histidina, que es detectada mediante esta técnica molecular. Las proteínas se extrajeron de las 6 líneas transgénicas de tabaco obtenidas (L1-L6) y se analizaron por SDS-PAGE mediante tinción de azul de Coomasie (Figura 16). En la Figura 16 se observa una serie de bandas correspondientes a todas las proteínas presentes en las muestras, donde la banda más intensa obtenida en todos los carriles, menos en el control positivo, correspondería a la proteína Rubisco, altamente presente en todas las plantas. En el control positivo (C+), el cual corresponde a la proteína Aldosa 6-fosfato reductasa de manzana (MdoA6PR), se observa una menor cantidad de proteínas debido a que la muestra proviene de un extracto purificado de bacteria y no a una extracción vegetal. Según análisis bioinformáticos (datos no mostrados), la proteína DcLCYB1 debería migrar a un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, por lo que en el gel de proteínas se ve enmascarada por la banda más intensa de la proteína Rubisco (Figura 16).

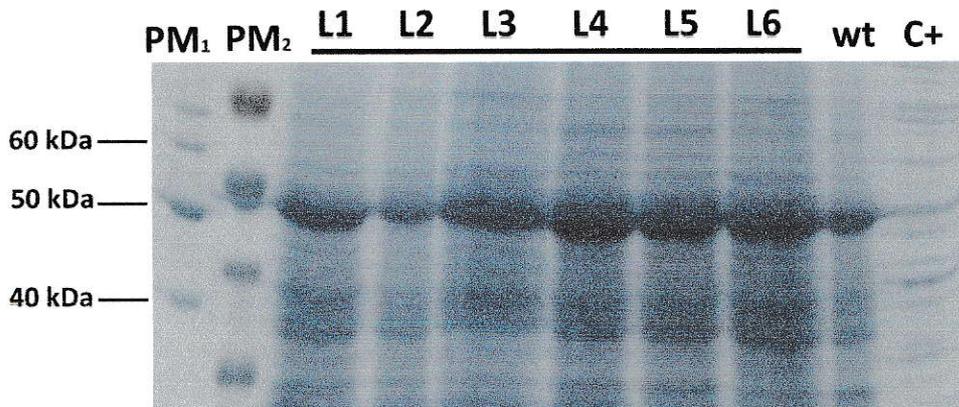


Figura 16. Análisis de SDS-PAGE de la proteína DcLCYB1. Gel de proteínas para corroborar la calidad de la extracción realizada y la presencia de la proteína DcLCYB1. Podemos observar una banda intensa de aproximadamente 50 kDa, que correspondería a la proteína DcLCYB1 junto a la proteína rubisco, de gran abundancia en las líneas transgénicas (L1-L6). La banda de 50 kDa presente en el wt correspondería exclusivamente a la proteína Rubisco. wt: planta silvestre de tabaco; C+: control positivo (correspondiente a un extracto bacteriano donde se clonó la proteína *MdoA6PR*).

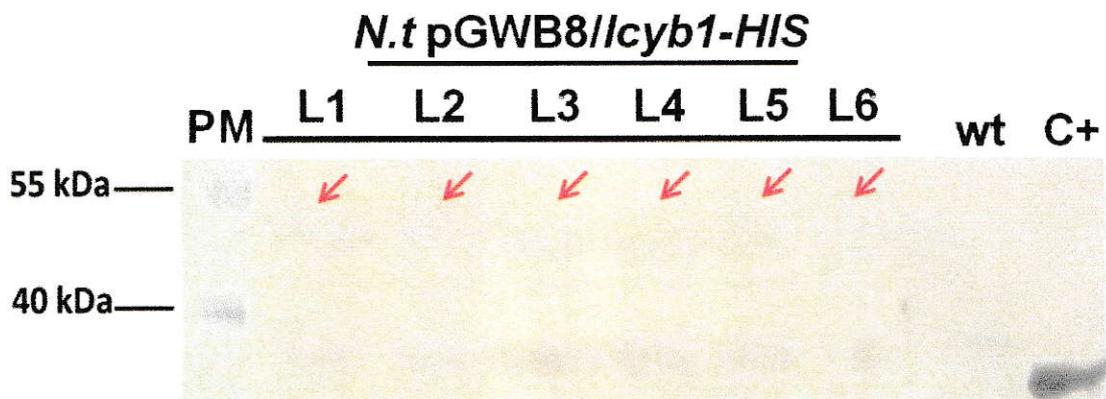


Figura 17. Análisis de western blot de la proteína DcLCYB1. Podemos observar la detección de la proteína DcLCYB1-His mediante un anticuerpo específico anti-HIS, señalado con la flecha roja, para todas las líneas transgénicas de tabaco analizadas (L1-L6), pero no así en la planta silvestre. wt: planta silvestre de tabaco, donde no se observa dicha banda; C+: control positivo (proteína *MdoA6PR*), donde se observa una banda de aproximadamente 35 kDa.

Como se puede observar en la Figura 17, mediante análisis de *western blot* se detectó una banda en los 50 kDa correspondiente a la proteína DcLCYB1-His, de acuerdo al tamaño esperado para ésta. Si bien esta banda no es la única detectada en las seis líneas transgénicas, ésta no está presente en la planta silvestre ni en el control positivo de nuestro experimento, lo que nos indica que la banda correspondería a la proteína DcLCYB1. Además de esta banda, también observamos una banda inespecífica en todas las líneas transgénicas de tabaco y en la planta silvestre en un peso aproximado de 37 kDa, la cual no se encuentra en el control positivo (procedente de bacterias), por lo que se podría atribuir a una detección inespecífica en las plantas de tabaco. La banda de aproximadamente 44 kDa observada en todas las líneas transgénicas podría corresponder a una forma degradada o procesada de la proteína.

3.6.2 Análisis de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* y de los pigmentos en las líneas t

ransgénicas de tabaco

Luego de haber corroborado la transgénesis de las plantas de tabaco obtenidas se seleccionaron 6 de las 9 líneas transgénicas transformadas con los vectores pGWB2//*cyb1* (L1, L3, L11, L14, L15 y L16) y pMDC32//*cyb1* (L2, L3, L4, L5, L6 y L15) para realizar los análisis de expresión del gen *Dclcyb1* en las hojas de este organismo vegetal mediante qRT-PCR (sección 2.6.2).

En cuanto a la expresión del transgen *Dclcyb1*, se observó una expresión de éste entre 27 y 349 veces (Figura 18 A) en las líneas transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1*. Por otra parte, en las líneas transgénicas para el vector pMDC32//*cyb1*,

la expresión de este transgen fue de entre 13 y 130 veces (Figura 18 B). Con estos resultados queda de manifiesto que con estos vectores se logra una expresión aumentada del gen *Dclcyb1* en las plantas de tabaco transgénicas, en comparación con las plantas de tabaco silvestres que carecen normalmente de este transgen.

Una vez corroborado el aumento en los niveles de expresión del transgen *Dclcyb1* en las plantas transgénicas de tabaco se midieron los niveles de carotenoides en las líneas transgénicas para ambos vectores (pGWB2//*cyb1*, Figura 18 B y pMDC32//*cyb1*, Figura 19 B, Tabla V anexo, sección 2.10.3.3). En las plantas transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1* se observó un patrón general de mayores niveles de carotenoides totales con respecto a la planta silvestre (Figura 18 B), en donde 4 de 6 plantas presentaron un claro aumento de entre un 151% y un 667% (L2, L14, L15 y L16) y sólo dos líneas no presentaron cambios o presentaron una disminución en estos niveles (L3 y L11, respectivamente, Figura 18 B, Tabla V anexo). En cuanto a la acumulación de β -caroteno, se observó un claro aumento de entre un 180% y 261% con respecto a la planta silvestre para las líneas L14, L15 y L16, mientras que para la L2 no se observó un cambio significativo y para las líneas L3 y L11 se observó una disminución en los niveles de este compuesto (Figura 18 B, Tabla V anexo). Si bien la línea L11 presentó una disminución en los niveles de β -caroteno, ésta presentó un aumento en los niveles de luteína, la cual se encuentra en la otra ramificación de la ruta carotenogénica y en donde la enzima LCYB actúa en conjunto con la enzima LCYE para producir α -caroteno, compuesto precursor de la luteína (Figura 2 y 3). Cabe destacar que además de la línea L11, las líneas L2, L14, L15 y L16 también presentaron un aumento en los niveles de luteína, y las 3 últimas también presentaron un aumento en los niveles de clorofila (Figura 18 B). Lo anterior refleja una

tendencia mayoritaria (4 de 6 líneas) que indica que en plantas de tabaco transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1* un aumento en la expresión del transgen *Dclcyb1* genera un aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno en estas plantas.

En las plantas transgénicas para el vector pMDC32//*cyb1* se observó una mantención general en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 19 B), aún cuando en todas ellas se observó un aumento en la expresión del gen *Dclcyb1* (Figura 19 A, Tabla V anexo). Solo en las líneas L6 y L15 se observó un aumento de entre 1,3 y 3,1 veces en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, respectivamente. La línea L6 presentó además un aumento en los niveles de luteína, mientras que en ambas líneas la clorofila se vio también aumentada (Figura 19 B). De lo anterior se desprende entonces que en general la expresión del transgen *Dclcyb1* mediante el vector pMDC32//*cyb1* no generó un cambio significativo en los niveles de los carotenoides en las plantas de tabaco.

Con estos resultados se deja de manifiesto la funcionalidad *in vivo* del gen *Dclcyb1* en este sistema heterólogo, la cual se explicará más adelante (Figura 20).

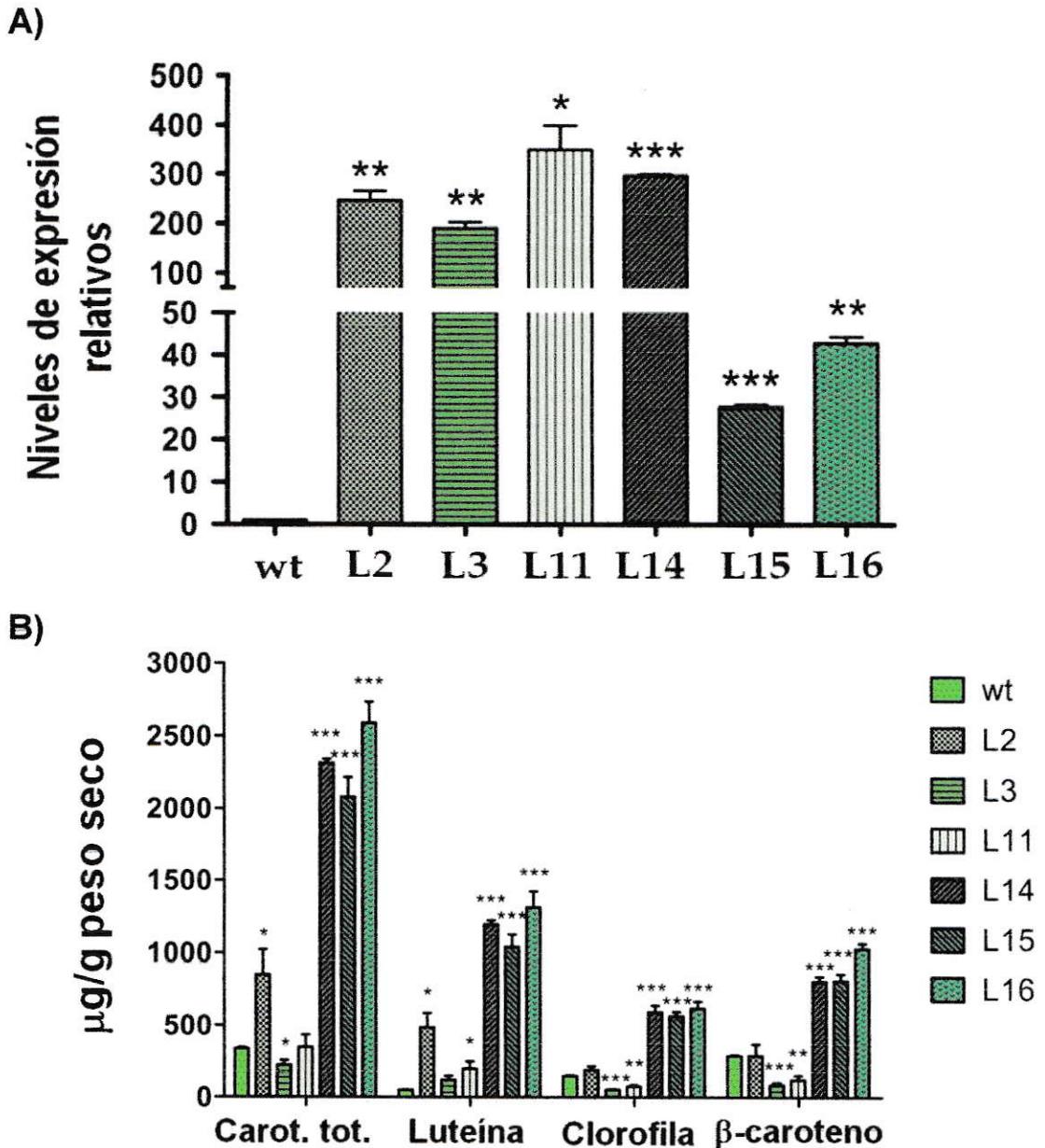
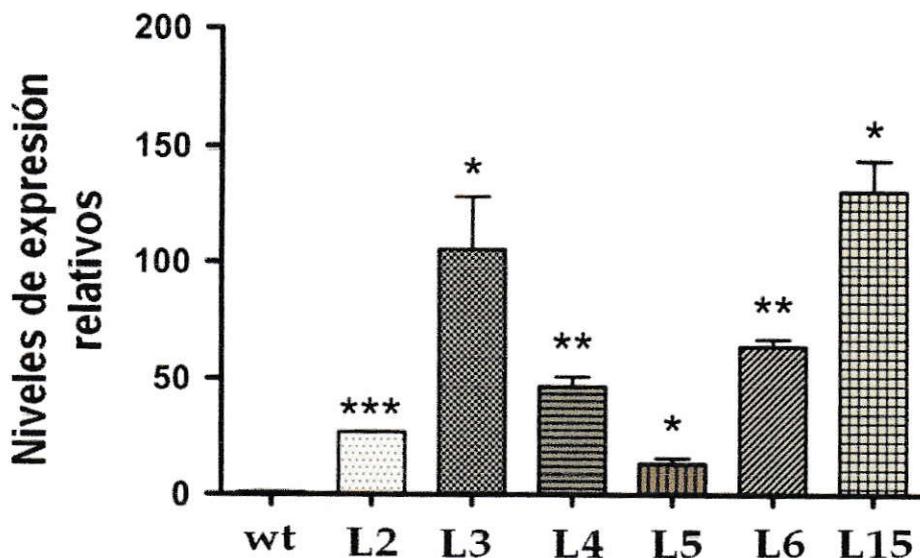


Figura 18. Análisis de la expresión del gen *Dclcyb1* y de los niveles de pigmentos en plantas de tabaco transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1*. **A)** Cuantificación de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* en plantas de tabaco transgénicas transformadas con el vector pGWB2//*cyb1*. **B)** Cuantificación de los niveles de acumulación de carotenoides en hojas de tabaco transgénicos para el vector pGWB2//*cyb1*. wt: plantas de tabacos silvestres. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S y se calibraron con respecto a las plantas de tabaco silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A)



B)

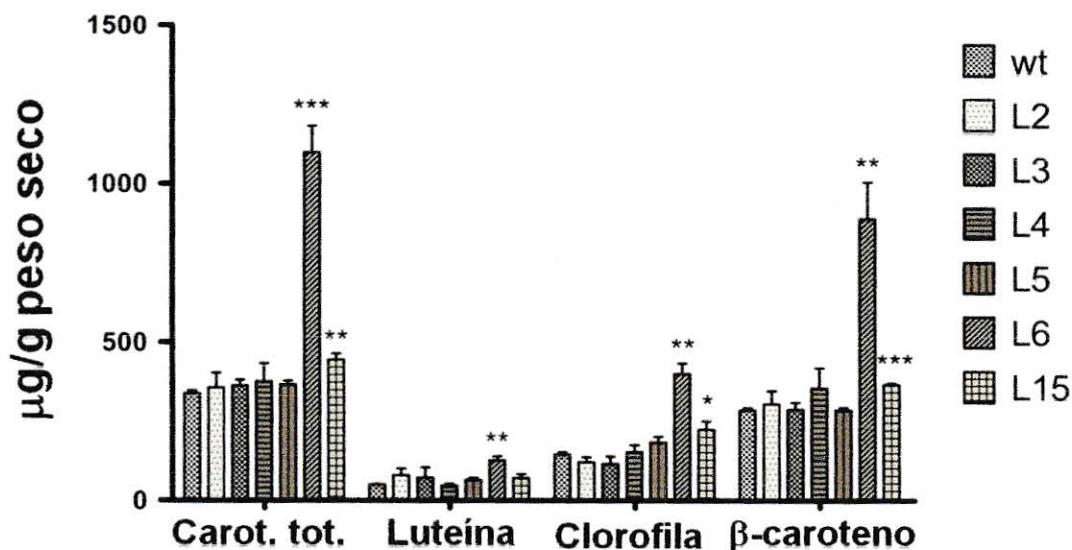


Figura 19. Análisis de la expresión del gen *Dclcyb1* y de los niveles de pigmentos en plantas de tabaco transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. A) Cuantificación de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* en plantas de tabaco transgénicas transformadas con el vector pMDC32//*lcyb1*. B) Cuantificación de los niveles de carotenoides en hojas de tabaco transgénicos para el vector pMDC32//*lcyb1*. wt: plantas de tabacos silvestres. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen 18S y se calibraron con respecto a las plantas de tabaco silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Figura 20 se observa el promedio de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* y de los carotenoides en líneas que presentaron un comportamiento similar en sus niveles de carotenoides totales en los tabacos transgénicos para los vectores pGWB2//*lcyb1* y pMDC32//*lcyb1*. En el primer caso se graficó el promedio de las líneas L2, L14, L15 y L16, que fueron las líneas que presentaron patrones de comportamiento semejantes (expresión del transgen *Dclcyb1* y aumento de los carotenoides), mientras que para el segundo vector se incluyeron las líneas L2, L3, L4 y L5, las cuales mantuvieron inalterados sus niveles de carotenoides, aún cuando presentaron un aumento en la expresión del transgen *Dclcyb1*. Además, se incluyó en la figura el promedio de los niveles de expresión del transgen y de los niveles de carotenoides en líneas representativas de tabacos transgénicos para el vector pGWB8//*lcyb1* (datos no mostrados anteriormente). A partir de esto podemos observar que si bien con los tres vectores empleados se consigue un aumento en los niveles de expresión del transgen *Dclcyb1*, los mayores niveles de expresión para el transgen fueron conseguidos por el vector pGWB2 que posee un solo promotor 35S (Figura 20 A). Este patrón de expresión se condice con el patrón presentado por estos tres vectores en el nivel de carotenoides donde nuevamente el vector pGWB2 presentó los mayores niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 20 B y C).

La Figura 20 permite concluir entonces que en plantas de tabaco transgénicas que expresan el gen *Dclcyb1* utilizando los vectores pGWB2//*lcyb1*, pMDC32//*lcyb1* y pGWB8//*lcyb1*, existe una correlación entre un aumento en los niveles de expresión de este transgen y un aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno. Además, este resultado muestra la funcionalidad *in vivo* del gen *Dclcyb1* en este sistema de expresión heterólogo.

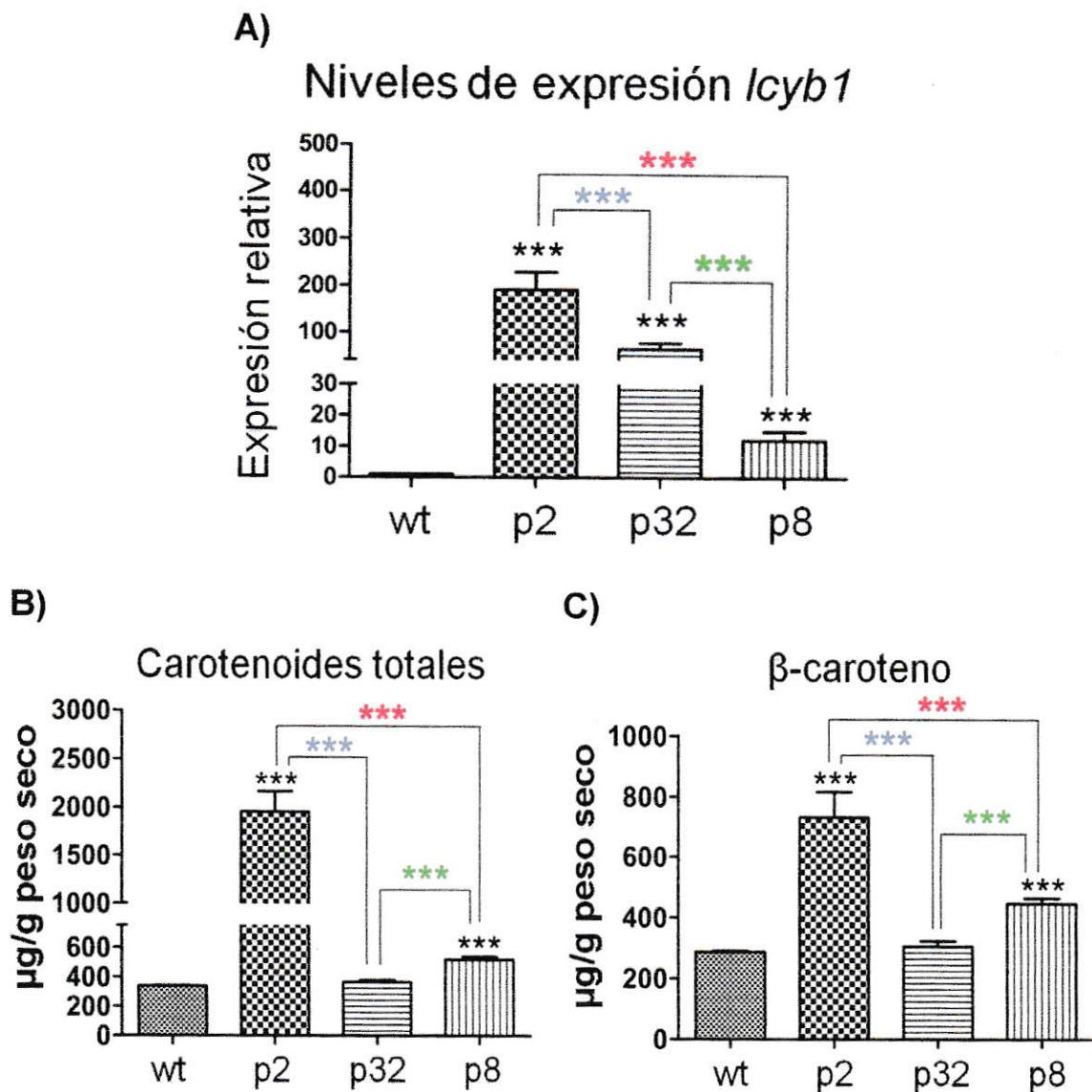


Figura 20. Niveles promedio de expresión y de carotenoides de las líneas transgénicas de tabaco. **A)** Niveles de expresión del gen *Dclcyb1* obtenidos con los tres vectores de expresión pGWB2, pMDC32 y pGWB8 en las plantas transgénicas de tabaco. **B)** Niveles de acumulación de carotenoides totales obtenidos con los tres vectores de expresión pGWB2, pMDC32 y pGWB8 en las plantas transgénicas de tabaco. **C)** Niveles de acumulación de β-caroteno obtenidos con los tres vectores de expresión pGWB2, pMDC32 y pGWB8 en las plantas transgénicas de tabaco. Se seleccionaron las líneas de los vectores pGWB2, pMDC32 y pGWB8 que presentaron un patrón similar en los niveles de carotenoides totales, para la obtención de los promedios de los niveles de expresión, de carotenoides totales y β-caroteno. Los asteriscos (*) en color negro indican el nivel de significancia respecto a la planta silvestre de tabaco, mientras que los asteriscos en color indican el nivel de significancia entre los distintos vectores empleados en cada experimento determinados por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.2.1 Análisis de expresión de genes aledaños claves en la ruta carotenogénica del tabaco mediante qRT-PCR

Las líneas independientes de tabaco transgénicas presentaron distintas respuestas en cuanto al nivel y tipo de carotenoides acumulados en respuesta a la expresión del transgen *Dclcyb1*. Algunas plantas presentaron un aumento en la expresión de este transgen y sin embargo sus niveles de pigmentos no se vieron alterados, mientras que en otras si bien se produjo un aumento en los niveles de carotenoides al expresar el transgen, los niveles de expresión no se correlacionaron con los niveles de aumento de los pigmentos (Figura 18 y 19, A y B, Tabla V anexo).

Con el objetivo de determinar posibles alteraciones en la ruta carotenogénica del tabaco que pudieran dar cuenta de estas distintas respuestas frente a la expresión del gen *Dclcyb1*, se realizó una cuantificación de los niveles de expresión, en las hojas del tabaco, de genes que han sido reportados como claves en la ruta carotenogénica de las plantas (*psy1*, *psy2* y *lcyb*) para así saber si éstos estaban siendo reprimidos o activados (Figura 21). Para esto se seleccionaron 3 líneas (que presentaron respuestas opuestas entre sí en relación a sus niveles de expresión y sus respectivos niveles de acumulación de carotenoides) de las plantas de tabaco transgénicas para cada vector (*pGWB2//lcyb1* y *pMDC32//lcyb1*). Para el vector *pGWB2//lcyb1* se escogieron las líneas L3, L14, y L16, y las líneas L2, L6, y L15 para el vector *pMDC32//lcyb1*. En el caso de las plantas con el vector *pGWB2//lcyb1*, la línea L3 presentó altos niveles de expresión y bajos niveles de carotenoides totales y β -caroteno (Figura 18 A y B, Tabla V anexo). Por otra parte, la línea L14 presentó niveles de expresión de *Dclcyb1* similares a la línea L3, sin embargo ésta presentó altos niveles de carotenoides totales y β -caroteno (Figura 18 A y B, Tabla V anexo). Por último la línea L16 que presentó menores niveles

de expresión (en comparación con las líneas 3 y 14), mostró la mayor acumulación de carotenoides totales y de β -caroteno de todas las líneas analizadas (Figura 18 A y B, Tabla V anexo).

Del análisis de los genes clave de esta ruta en tabaco se desprende que las líneas L3, L14, y L16 presentaron un aumento en los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb* entre 2-14, 2-13 y 2,5-8 veces, respectivamente (Figura 20 A, C y E). Las líneas L14 y L16 presentaron similares niveles de expresión de estos tres genes, lo cual puede dar cuenta de los niveles de carotenoides similares entre ambas. Por otra parte, la línea L3 presentó los mayores niveles de expresión de los tres genes analizados (Figura 20 A, C y E).

De las líneas de tabaco escogidas para el vector pMDC32/*lcyb1*, las líneas L6 y L15 fueron las únicas que presentaron un aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 19 B, Tabla V anexo). Este aumento fue indirectamente proporcional, ya que la línea L6 presentó niveles intermedios de expresión de *Dclcyb1* y los mayores niveles de estos pigmentos, mientras que la línea L15 presentó el mayor nivel de expresión del transgen y niveles de pigmentos solo levemente superiores a la planta silvestre (Figura 19 A, Tabla V anexo). La línea L2, por otra parte, presentó bajos niveles de expresión del transgen en comparación con las líneas L6 y L15 y niveles de carotenoides totales y de β -caroteno iguales a los de la planta silvestre (Figura 19 A y B, Tabla V anexo). Al analizar la expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb* endógenos de tabaco en estas plantas se determinó que en la línea L2 ocurrió una represión en los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb* (Figura 21 B, D y F) lo cual podría estar dando cuenta de la mantención en los niveles de los carotenoides en esta línea. Por otra parte, las líneas L6 y L15 presentaron un aumento en los niveles de expresión de

los genes *psy1* y *psy2*, aunque no así en los niveles del gen *lcyb*, lo cual da cuenta del aumento en la acumulación de carotenoides presentado por estas dos líneas.

Tomando en conjunto los resultados anteriores, donde observamos un efecto inductor por parte del gen *Dclcyb1* en la ruta carotenogénica del tabaco (en los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb*) en las plantas transformadas con el vector pGWB2//*lcyb1* y un efecto similar en las plantas transformadas con el vector pMDC32//*lcyb1* (en los genes *psy1* y *psy2*) podemos corroborar la importancia del gen *Dclcyb1* en la regulación de esta ruta.

caroteno en lugar de la ramificación del β -caroteno. Por el contrario, las líneas L8 y L9, que son las líneas que presentan mayores niveles de β -caroteno, presentan una disminución significativa en los niveles de α -caroteno (Figura 24 B), evidenciando en este caso el direccionamiento del flujo hacia la ramificación del β -caroteno.

En la raíz modificada de las líneas transgénicas para el vector pMDC32//*cyb1* se observó un aumento general en los niveles de transcritos de este gen entre un 12,1% y un 246,7%, en cinco de las seis líneas analizadas (L1, L5, L6, L8 y L9), mientras que la línea L3 disminuyó sus niveles de expresión en un 61,8%, con respecto a la planta silvestre (Figura 25 A, Tabla VII anexo). En general, los niveles de carotenoides totales en la raíz de la zanahoria en las líneas L1, L6, L8 y L9 presentaron aumentos de entre un 11,5% y un 76,3%, mientras que las líneas L3 y L5 mantuvieron constantes sus niveles de carotenoides totales en comparación con la planta silvestre de zanahoria, por lo que la tendencia general es un aumento de estos compuestos en las líneas analizadas (Figura 25 B, Tabla VII anexo). Por otra parte, los niveles de β -caroteno presentaron un aumento de entre un 6% y un 101% en cinco de seis líneas analizadas (L1, L5, L6, L8 y L9, Figura 25 B, Tabla VII anexo). Por el contrario, solo la línea L3 presentó una disminución del 33% en los niveles de este compuesto (Figura 25 B, Tabla VII anexo), lo cual se correlaciona con el silenciamiento del gen *Dc/cyb1* en esta línea (Figura 25 A). En las líneas L5, L8 y L9, el aumento en los niveles de β -caroteno conllevó una disminución en los niveles de α -caroteno, lo cual podría evidenciar un direccionamiento del flujo metabólico de la ruta hacia la ramificación del β -caroteno (Figura 25 B). Esto mismo sucede con la línea L6 que es la línea que mas acumula β -caroteno pero que mantiene sus niveles de α -caroteno (Figura 25 B).

Estos resultados corroboran la importante función *in vivo* que cumple el gen *Dclcyb1* en la ruta carotenogénica de la zanahoria y específicamente en la producción de β -caroteno tanto en las hojas como en las raíces de este organismo vegetal.

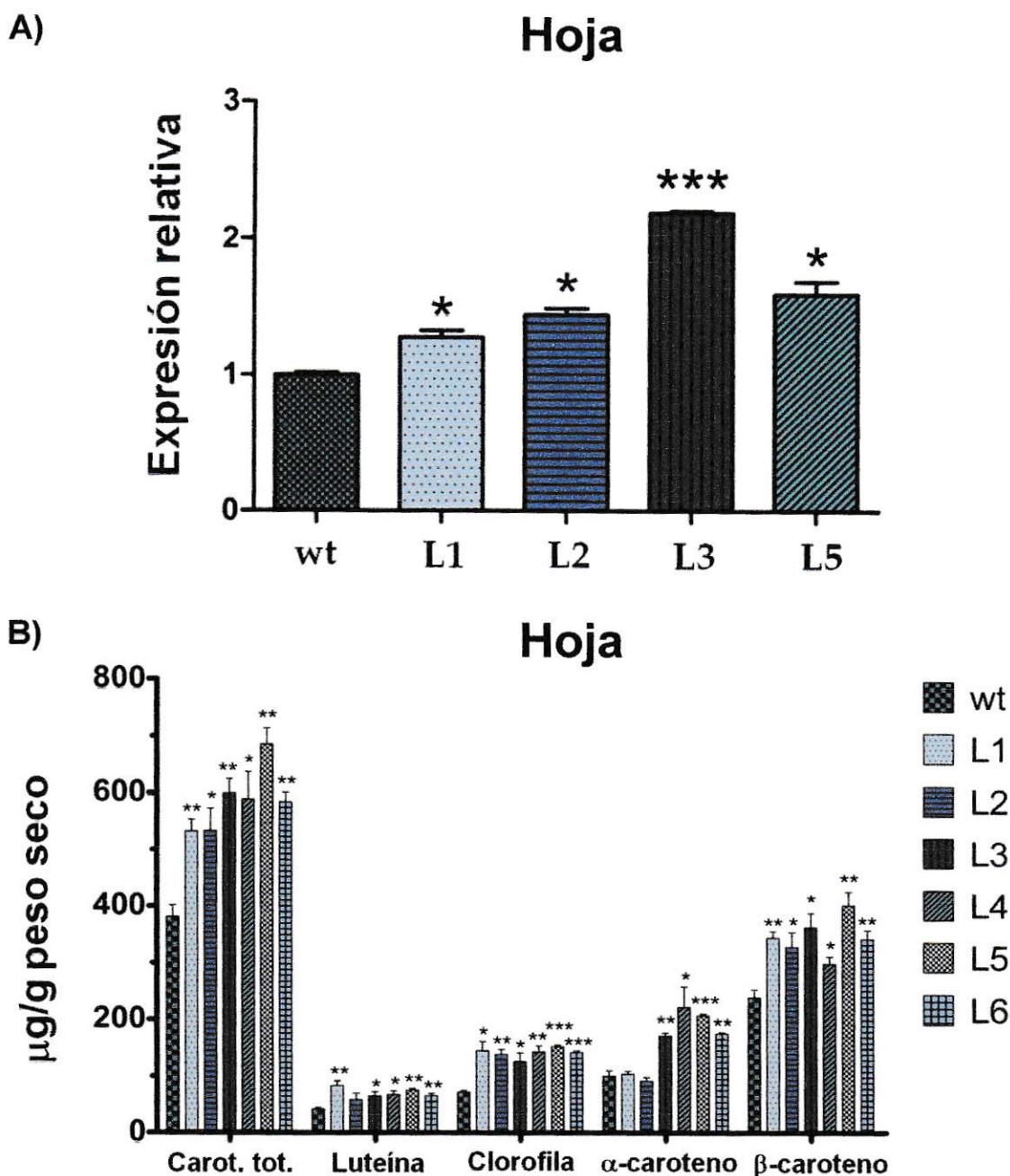


Figura 22. Análisis de qRT-PCR y HPLC de las hojas de las zanahorias transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1*. **A)** Cuantificación de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* en hojas de zanahoria transgénicas transformadas con el vector pGWB2//*cyb1*. **B)** Cuantificación de los niveles de carotenoides en hojas de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1*. wt: plantas de zanahoria silvestres. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen ubiquitina y se calibraron con respecto a las plantas de zanahoria silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

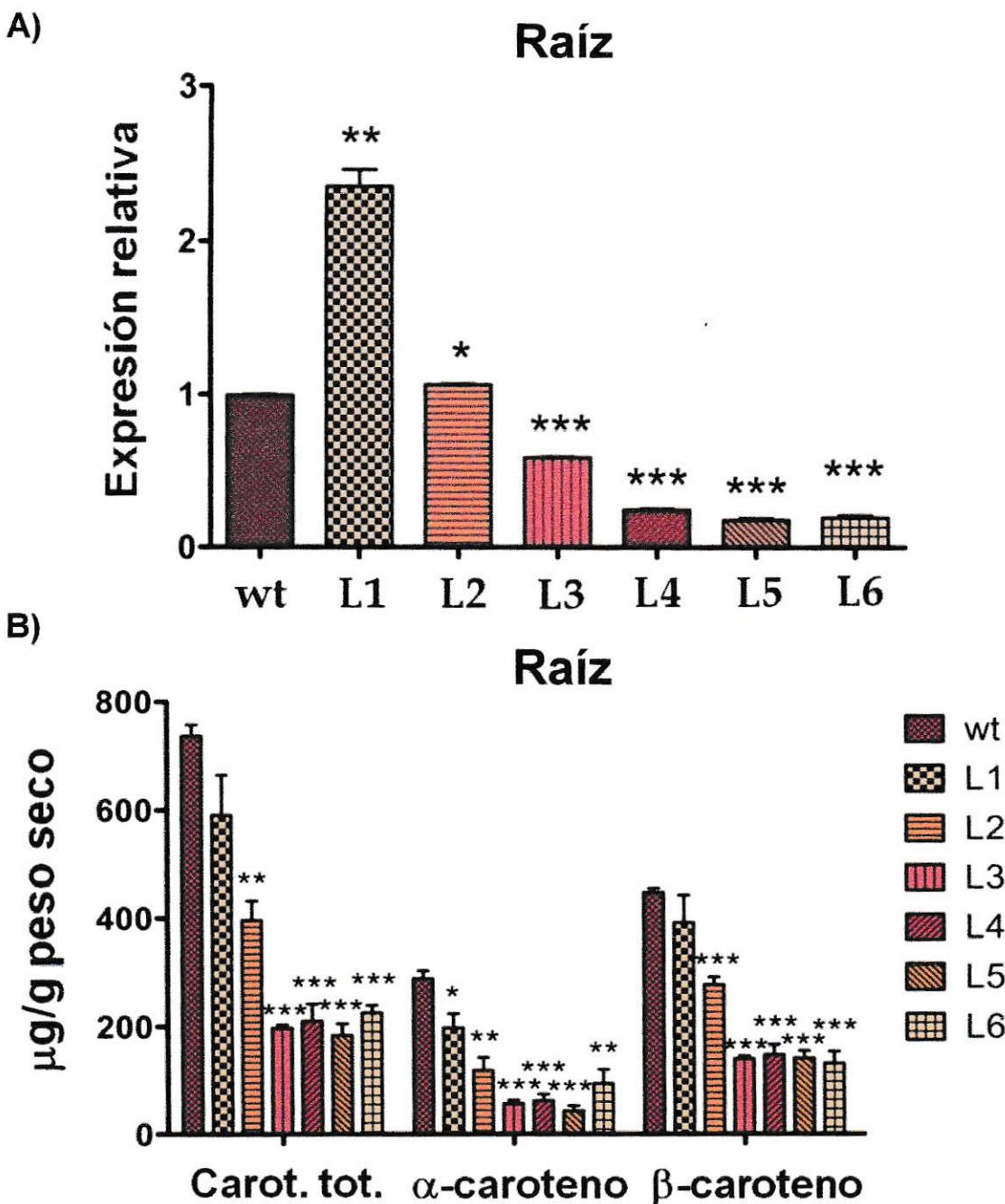


Figura 23. Análisis de qRT-PCR y HPLC de la raíz modificada de las zanahorias transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1*. **A)** Cuantificación de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* en raíz de zanahorias transgénicas transformadas con el vector pGWB2//*cyb1*. **B)** Cuantificación de los niveles de carotenoides en raíz de zanahorias transgénicas para el vector pGWB2//*cyb1*. wt: plantas de zanahoria silvestres. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen ubiquitina y se calibraron con respecto a las plantas de zanahoria silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

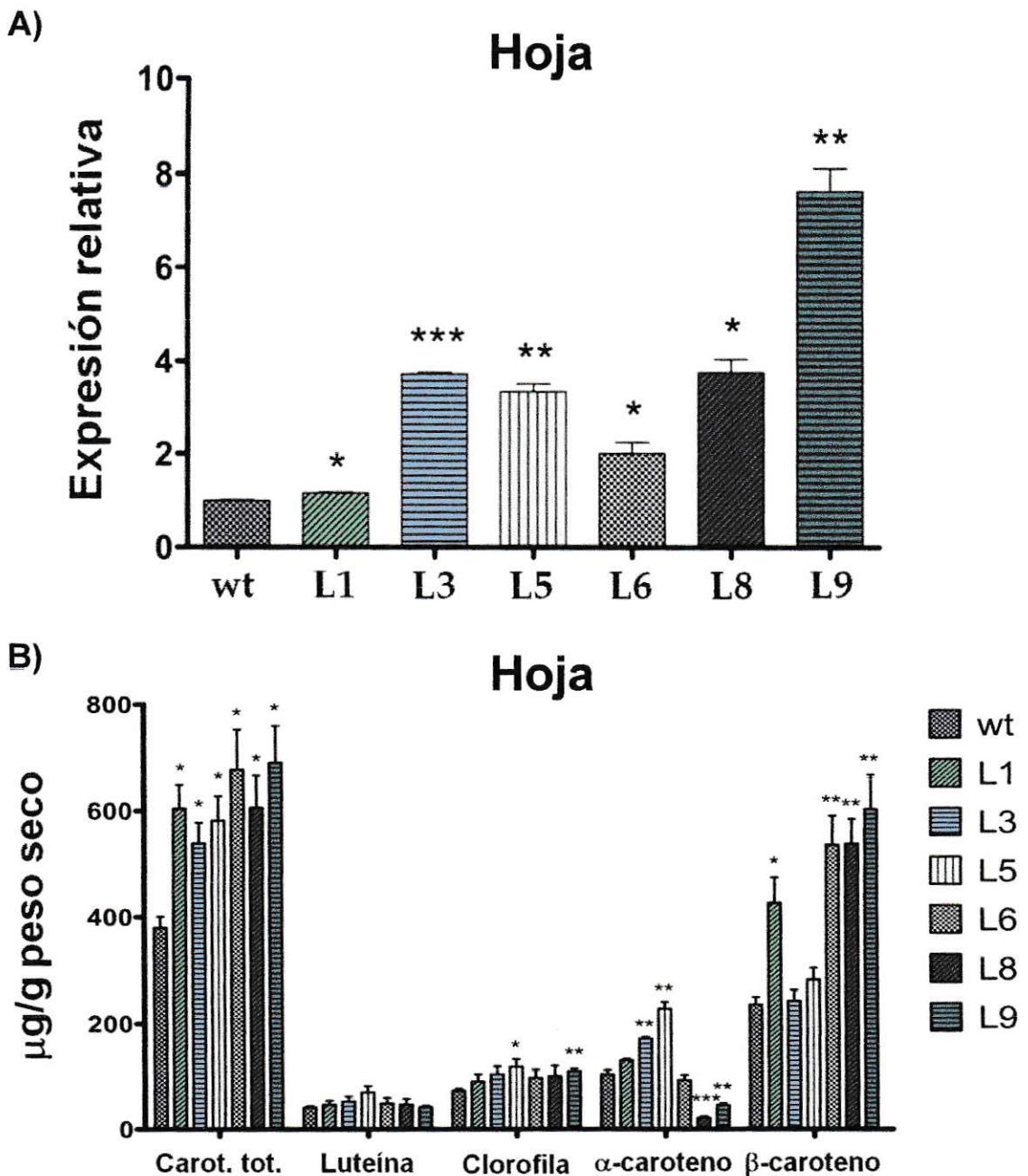


Figura 24. Análisis de qRT-PCR y HPLC de las hojas de las zanahorias transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. **A)** Cuantificación de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* en hojas de zanahoria transgénicas transformadas con el vector pMDC32//*lcyb1*. **B)** Cuantificación de los niveles de carotenoides en hojas de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. wt: plantas de zanahoria silvestres. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen ubiquitina y se calibraron con respecto a las plantas de zanahoria silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

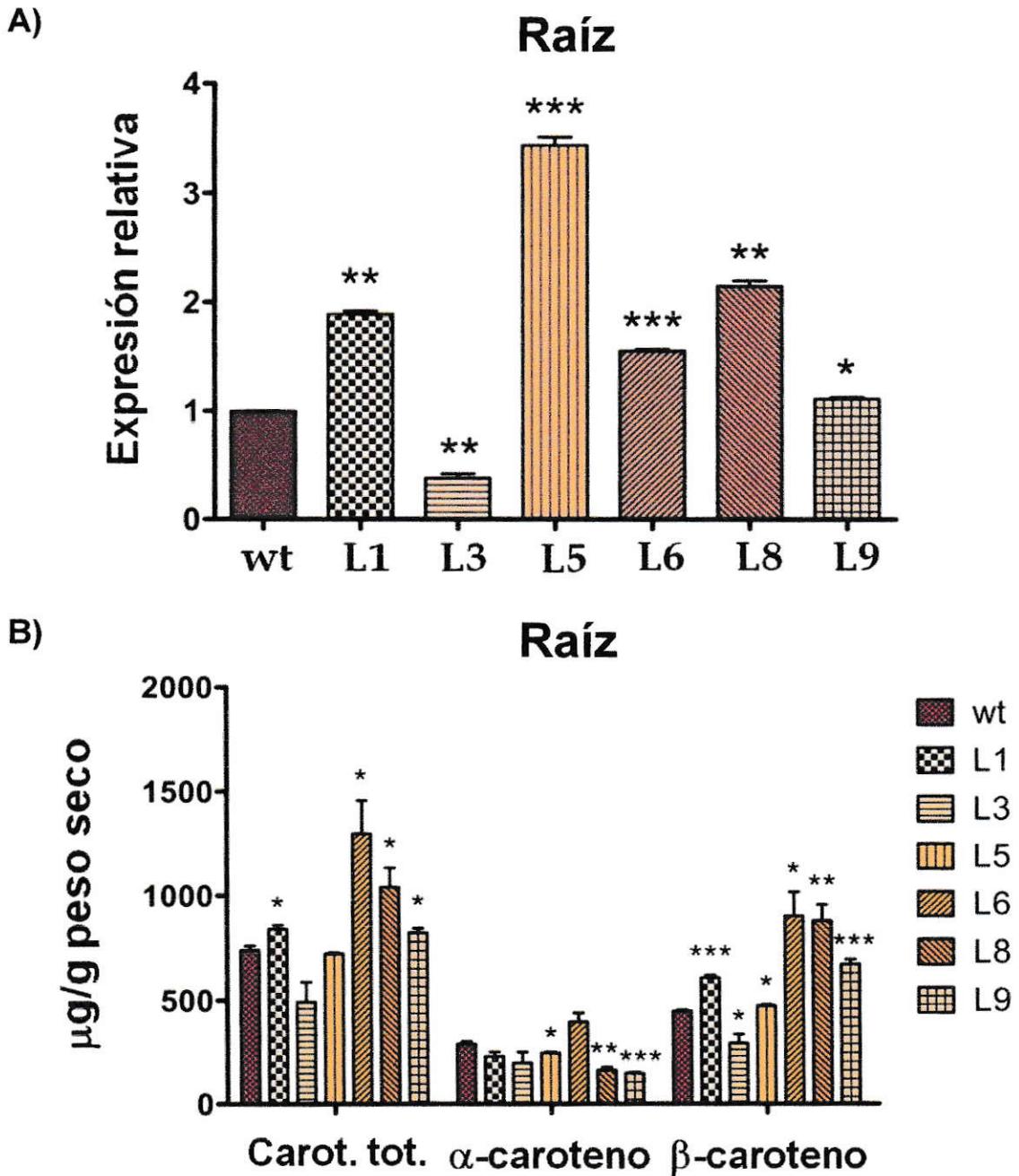


Figura 25. Análisis de qRT-PCR y HPLC de la raíz modificada de las zanahorias transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. **A)** Cuantificación de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* en raíz de zanahorias transgénicas transformadas con el vector pMDC32//*lcyb1*. **B)** Cuantificación de los niveles de carotenoides en raíz de zanahorias transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. wt: plantas de zanahoria silvestres. Los valores se normalizaron respecto a los niveles de expresión del gen ubiquitina y se calibraron con respecto a las plantas de zanahoria silvestres. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En la Figura 26 se observa el promedio de los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* y de los carotenoides en líneas que presentaron niveles similares de carotenoides totales en las hojas de zanahorias transgénicas para los vectores pGWB2//*lcyb1* y pMDC32//*lcyb1*. En el primer caso se graficó el promedio de las líneas L1, L2, L3 y L5 (pGWB2), y en el segundo las líneas L1, L3, L5, L6, L8 y L9 (pMDC32), que fueron las líneas que presentaron patrones de comportamiento semejantes (expresión del transgen *Dclcyb1* y aumento de los carotenoides en hojas de zanahoria). Para la comparación de los niveles de carotenoides las líneas L3 y L5 del vector pMDC32 fueron reemplazadas por las líneas L1 y L9, debido a que estas presentaban niveles de carotenoides semejantes a las otras líneas analizadas (L6 y L8). A partir de esto se observó que en la hoja de la zanahoria con cada vector se obtienen niveles de expresión del gen *Dclcyb1* aumentados con respecto a los niveles de expresión de la planta silvestre de zanahoria. Además, los mayores niveles de expresión del gen *Dclcyb1* fueron obtenidos por las plantas transgénicas para el vector pMDC32 (Figura 26 A). Los mayores niveles de expresión presentados por las líneas transgénicas para el vector pMDC32 en comparación con el vector pGWB2, si bien no tuvieron un efecto directo en los niveles de carotenoides totales, si tuvieron un efecto notorio en los niveles de β -caroteno (Figura 26 B y C). En la figura 26 B se puede observar que con los dos vectores se alcanzaron niveles de carotenoides totales mayores en comparación con la planta silvestre de zanahoria, pero sin presentar diferencias significativas en los niveles de carotenoides totales presentados por cada vector. Por otra parte, y a pesar de que con los dos vectores se consiguieron mayores niveles de β -caroteno con respecto a la planta silvestre de zanahoria (Figura 26 C), con el vector pMDC32 se lograron los más altos niveles de β -caroteno (Figura 26 C).

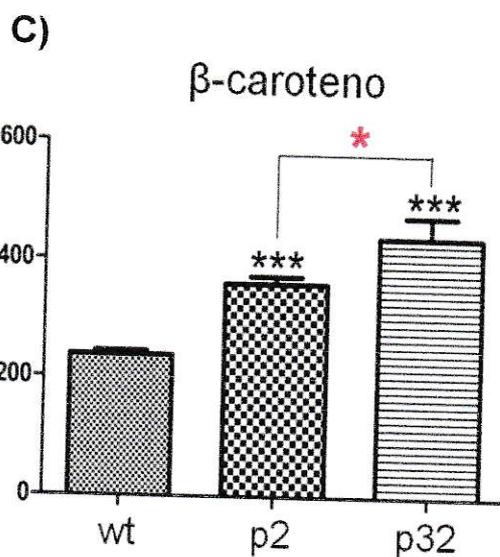
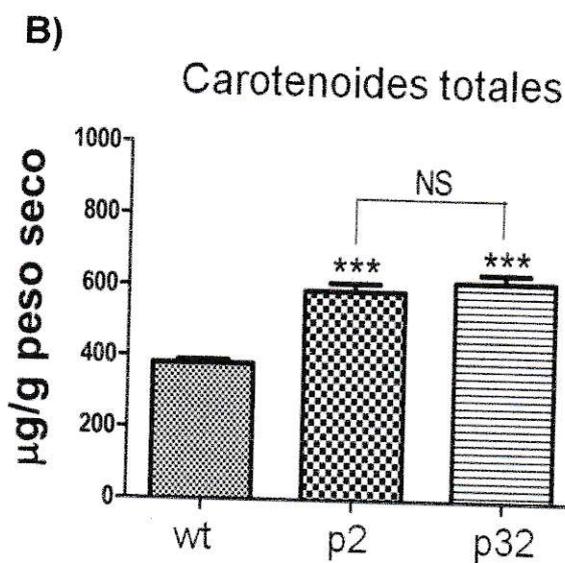
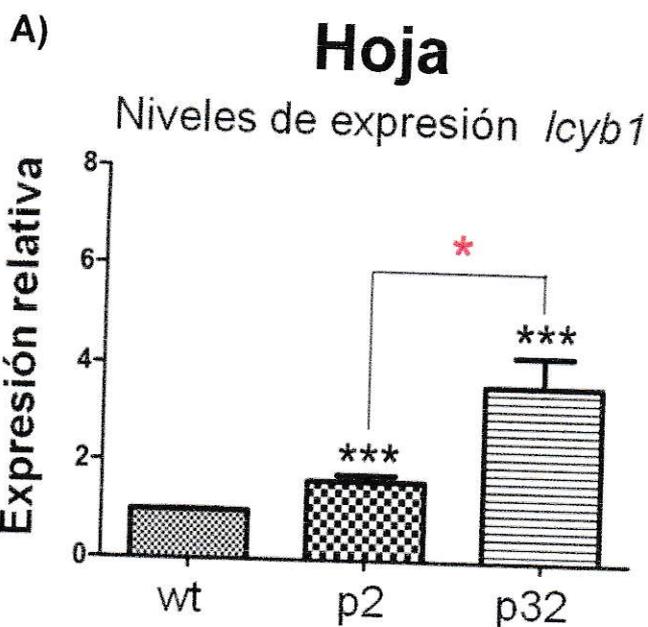
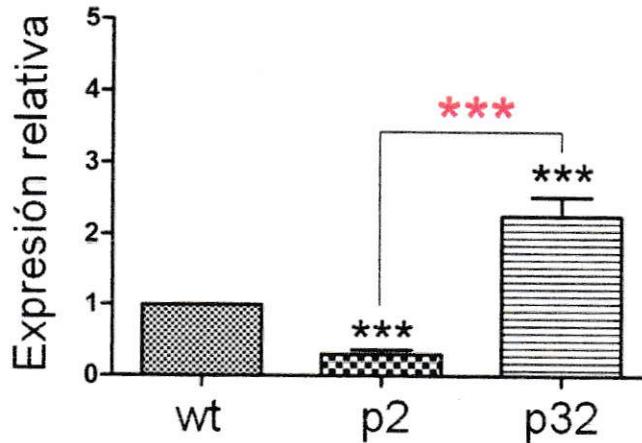


Figura 26. Niveles promedio de expresión y de carotenoides en hojas de las líneas transgénicas de zanahoria. **A)** Niveles de expresión del gen *Dclcyb1* obtenidos con los vectores de expresión pGWB2 y pMDC32 en las hojas de las plantas transgénicas de zanahoria. **B)** Niveles de carotenoides totales obtenidos con los vectores de expresión pGWB2 y pMDC32 en las hojas de las plantas transgénicas de zanahoria. **C)** Niveles de β-caroteno obtenidos con los vectores de expresión pGWB2 y pMDC32 en las hojas de las plantas transgénicas de zanahoria. Se seleccionaron las líneas de los vectores pGWB2 y pMDC32 que presentaron un patrón similar en los niveles de carotenoides totales para la obtención de los promedios de los niveles de expresión, de carotenoides totales y de β-caroteno. Los asteriscos (*) en color negro indican el nivel de significancia respecto a la planta silvestre de zanahoria, mientras que los asteriscos en color indican el nivel de significancia entre los distintos vectores empleados en cada experimento determinados por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

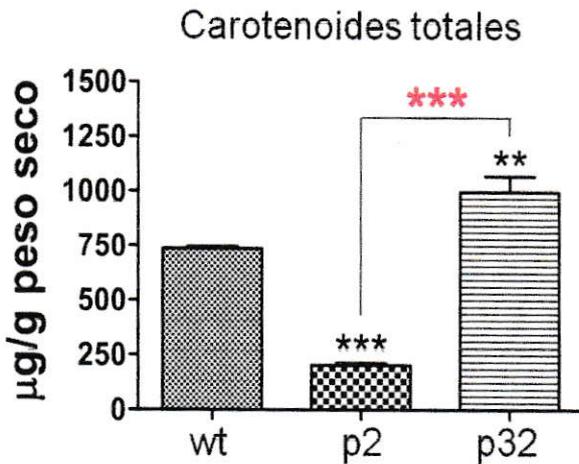
Por otra parte, en la raíz de la zanahoria se observaron efectos contrarios con cada vector empleado. Con el vector pGWB2 se obtuvo un silenciamiento del gen *Dclcyb1* con respecto a la expresión del gen en la planta silvestre de zanahoria (Figura 27 A). Sin embargo, con el vector pMDC32 se observó un aumento en la expresión de éste gen respecto de los niveles de expresión del gen en la raíz de la planta silvestre de zanahoria (Figura 27 A). Estos resultados se ven reflejados en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, donde los niveles de estos compuestos se correlacionan directamente con los niveles de expresión del gen obtenidos con cada vector (Figura 27 B y C), obteniéndose un aumento en los niveles de estos pigmentos en los casos en los que el gen *Dclcyb1* aumentó sus niveles de expresión (plantas transgénicas con el vector pMDC32) y una disminución de ellos cuando el gen se silenció (plantas transgénicas con el vector pGWB2).

Estos resultados indican que el gen *Dclcyb1* es funcional en la planta de zanahoria, reflejado en la directa correlación entre la expresión de este gen y los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno obtenidos.

A) Raíz
Niveles de expresión *Icyb1*



B)



C)

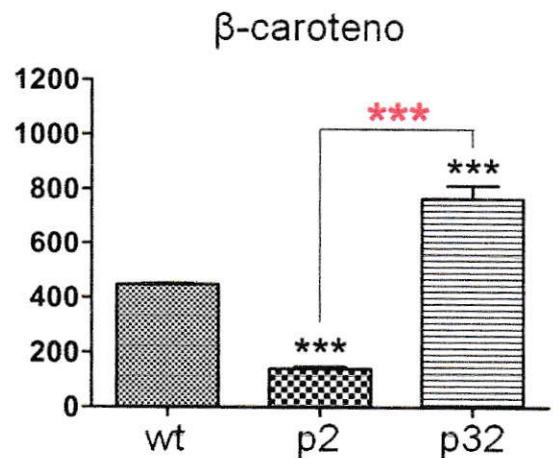


Figura 27. Niveles promedio de expresión y de carotenoides de las raíces de las líneas transgénicas de zanahoria. A) Niveles de expresión del gen *Dclcyb1* obtenidos con los vectores de expresión pGWB2 y pMDC32 en la raíz de las plantas transgénicas de zanahoria. B) Niveles de carotenoides totales obtenidos con los vectores de expresión pGWB2 y pMDC32 en la raíz de las plantas transgénicas de zanahoria. C) Niveles de β-caroteno obtenidos con los vectores de expresión pGWB2 y pMDC32 en la raíz de las plantas transgénicas de zanahoria. Se seleccionaron las líneas de los vectores pGWB2 y pMDC32 que presentaron un patrón similar en los niveles de carotenoides totales para la obtención de los promedios de los niveles de expresión, de carotenoides totales y de β-caroteno. Los asteriscos (*) en color negro indican el nivel de significancia respecto a la planta silvestre de zanahoria, mientras que los asteriscos en color rojo indican el nivel de significancia entre los distintos vectores empleados en cada experimento determinados por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.6.3.1 Análisis de expresión de genes aledaños claves en la ruta carotenogénica de la zanahoria mediante qRT-PCR

Al igual que en el sistema heterólogo de tabaco, y con el objetivo de determinar posibles alteraciones en la ruta carotenogénica de la zanahoria que pudieran dar cuenta de las distintas respuestas de las líneas transgénicas frente a la expresión del gen *Dclcyb1*, se realizó una cuantificación de los niveles de expresión, en las hojas y raíces de las zanahorias, de genes que han sido reportados como claves en la ruta carotenogénica de las plantas (*psy1*, *psy2* y *lcyb*) para así saber si estos están siendo reprimidos o activados (Figura 28). Para esto se seleccionaron 3 líneas (que presentaron respuestas opuestas entre sí en relación a sus niveles de expresión y sus respectivos niveles de carotenoides) de las plantas de zanahoria transgénicas para cada vector (*pGWB2//lcyb1* y *pMDC32//lcyb1*). Para el vector *pGWB2//lcyb1* se escogieron las líneas L1, L2, y L5, y las líneas L3, L8, y L9 para el vector *pMDC32//lcyb1*. Con el vector *pGWB2*, en las hojas de la zanahoria, las líneas L1, L2 y L5 presentaron niveles aumentados del gen *psy2*, presentando mayores niveles de éste la línea L1 (Figura 28 C). Por otra parte, estas tres líneas presentaron reducidos niveles tanto de los genes *psy1* como del gen *lcyb2* (Figura 28 A y E). Ahora, en la raíz de zanahoria se analizaron estas mismas tres líneas, L1, L2 y L5. Sin embargo, sólo la línea L1, presenta los mayores aumentos en los niveles del gen *psy1*, *psy2* y *lcyb2*, siendo estos de 4,5, 4,1 y 8 veces con respecto a la planta de zanahoria silvestre (Figura 29 A, C y E). Por otra parte las líneas L2 y L5 presentan una marcada disminución del gen *psy1*, la cual para la línea L2 va acompañada de un leve aumento en los niveles de expresión del gen *psy2* y *lcyb2*, sin embargo esto no es suficiente para verse reflejado en un aumento de los carotenoides. Además, tanto la línea L2

como la línea L5, siendo esta última la única de estas líneas que presenta una disminución en los niveles de expresión de los genes tres genes clave de la ruta (*psy1*, *psy2* y *lcyb2*), presentaron una disminución en los niveles de carotenoides (Figura 22 B, Tabla VI anexo). Más aún, a pesar de la inducción de los genes clave en la ruta carotenogénica en la línea L1, esta inducción no es suficiente para lograr un aumento en la acumulación de los carotenoides, la cual se mantiene semejante a los niveles de acumulación de la planta de zanahoria silvestre (Figura 22 B, Tabla VI anexo).

Con el vector pMDC32, se observó en la hoja de zanahoria, un aumento similar en los genes *psy1* y *psy2* para las líneas L8 y L9 (Figura 29 B y D), mientras que para la línea L3 aumentó la expresión del gen *psy1*, pero disminuyó la del gen *psy2* (Figura 29 B y D). Las líneas L3 y L9 presentaron una inducción del gen *lcyb2*, mientras que para la línea L8 se mantuvo constante (Figura 29 F). De esto observamos que en la línea L9 se inducen los tres genes clave en la ruta carotenogénica lo cual se correlaciona con que esta línea es la que presenta mayores niveles de carotenoides totales y en particular de β -caroteno (Figura 24 B, Tabla VII anexo).

El comportamiento en la hoja no es similar al observado en la raíz de la zanahoria, donde si bien se condicen los niveles de expresión del gen en la raíz con los niveles de carotenoides, estas tres líneas se comportan de manera distinta en los dos tejidos analizados (hoja y raíz). La línea L8 es la única línea que presentó una inducción en los genes carotenogénicos claves de la ruta (de 3, 1,35, y 2 veces para los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2*, respectivamente) lo cual se correlaciona con los mayores niveles de carotenoides presentados por esta línea en comparación con las otras dos líneas analizadas (Figura 29 B y F). La línea L3 presenta una disminución y una mantención en los niveles de expresión de los genes *psy1-psy2* y *lcyb2* (Figura 29 B, D

y F), respectivamente, lo cual evidenciaría la disminución en la acumulación de carotenoides por parte de esta línea (Figura 25 B, Tabla VII anexo). Por último la línea L9, presenta una mantención, una disminución y un aumento en los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2*, respectivamente (Figura 29 B, D y F) lo cual podría explicar la mayor acumulación de carotenoides por parte de esta línea, pero en menor cantidad que la línea L8 (Figura 25 B, Tabla VII anexo).

Tomando en conjunto los resultados anteriores, donde observamos un efecto inductor (en los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb*) por parte del gen *Dclcyb1* en la ruta carotenogénica en las hojas de las zanahorias transgénicas para los vectores pGWB2//*lcyb1* y pMDC32//*lcyb1* podemos corroborar la importancia del gen *Dclcyb1* en la regulación de esta ruta. Si bien en la raíz de las zanahorias transgénicas el patrón no fue el mismo para los dos vectores, en las líneas que presentaron mayores niveles de carotenoides se observó una clara inducción de al menos 2 genes claves en la ruta carotenogénica de la zanahoria, lo cual resalta la importante función que cumple este gen en la regulación de la ruta de este organismo vegetal.

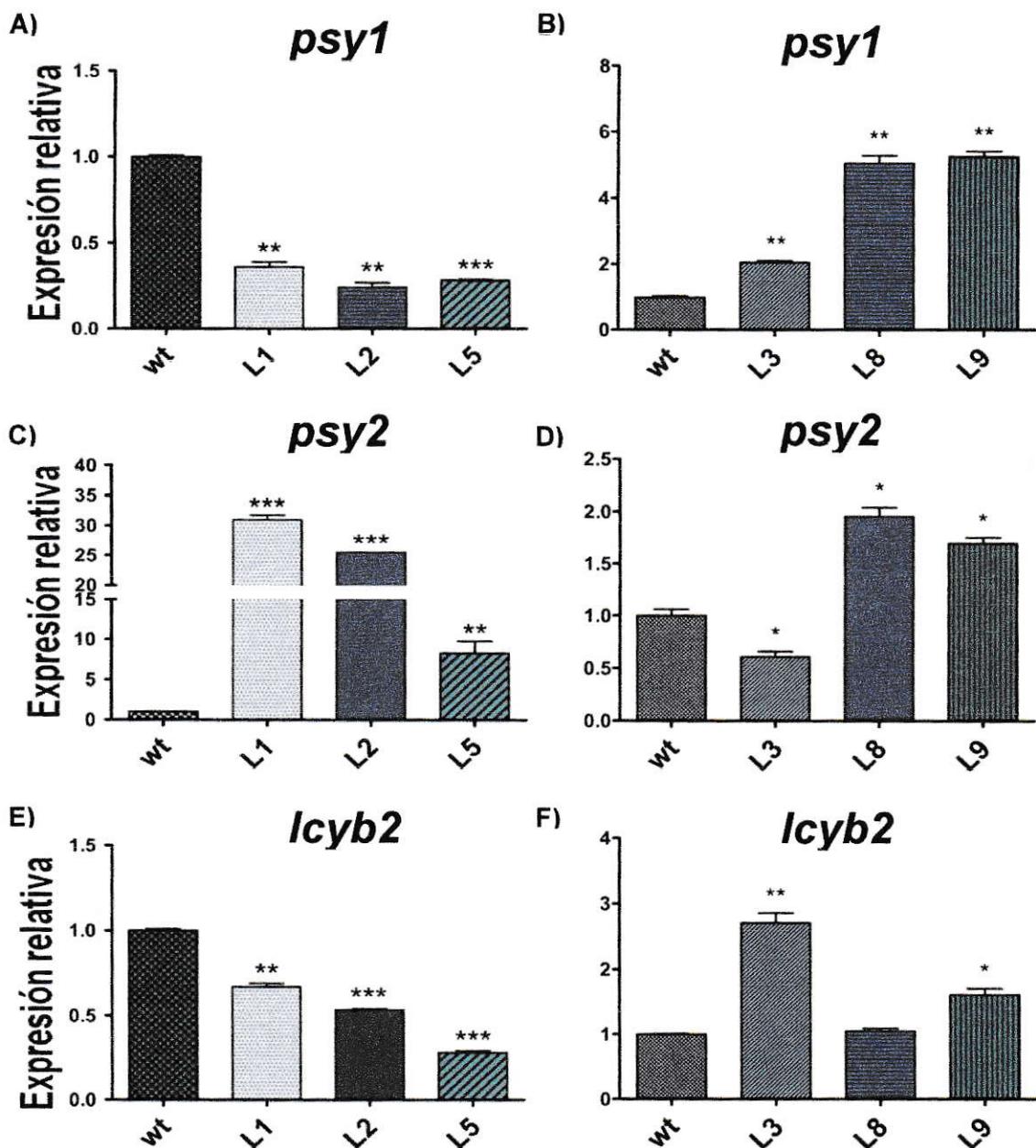


Figura 28. Análisis de qRT-PCR de genes clave en la ruta carotenogénica de la zanahoria. Se determinaron los niveles de abundancia relativa de los genes endógenos *psy1*, *psy2* y *lcyb2* en la hoja de la zanahoria. **A)** Amplificación del gen *psy1* en las líneas L1, L2 y L6 de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*lcyb1*. **B)** Amplificación del gen *psy1* en las líneas L3, L8 y L9 de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. **C)** Amplificación del gen *psy2* en las líneas L1, L2 y L6 de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*lcyb1*. **D)** Amplificación del gen *psy2* en las líneas L3, L8 y L9 de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. **E)** Amplificación del gen *lcyb2* en las líneas L1, L2 y L6 de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*lcyb1*. **F)** Amplificación del gen *lcyb2* en las líneas L3, L8 y L9 de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

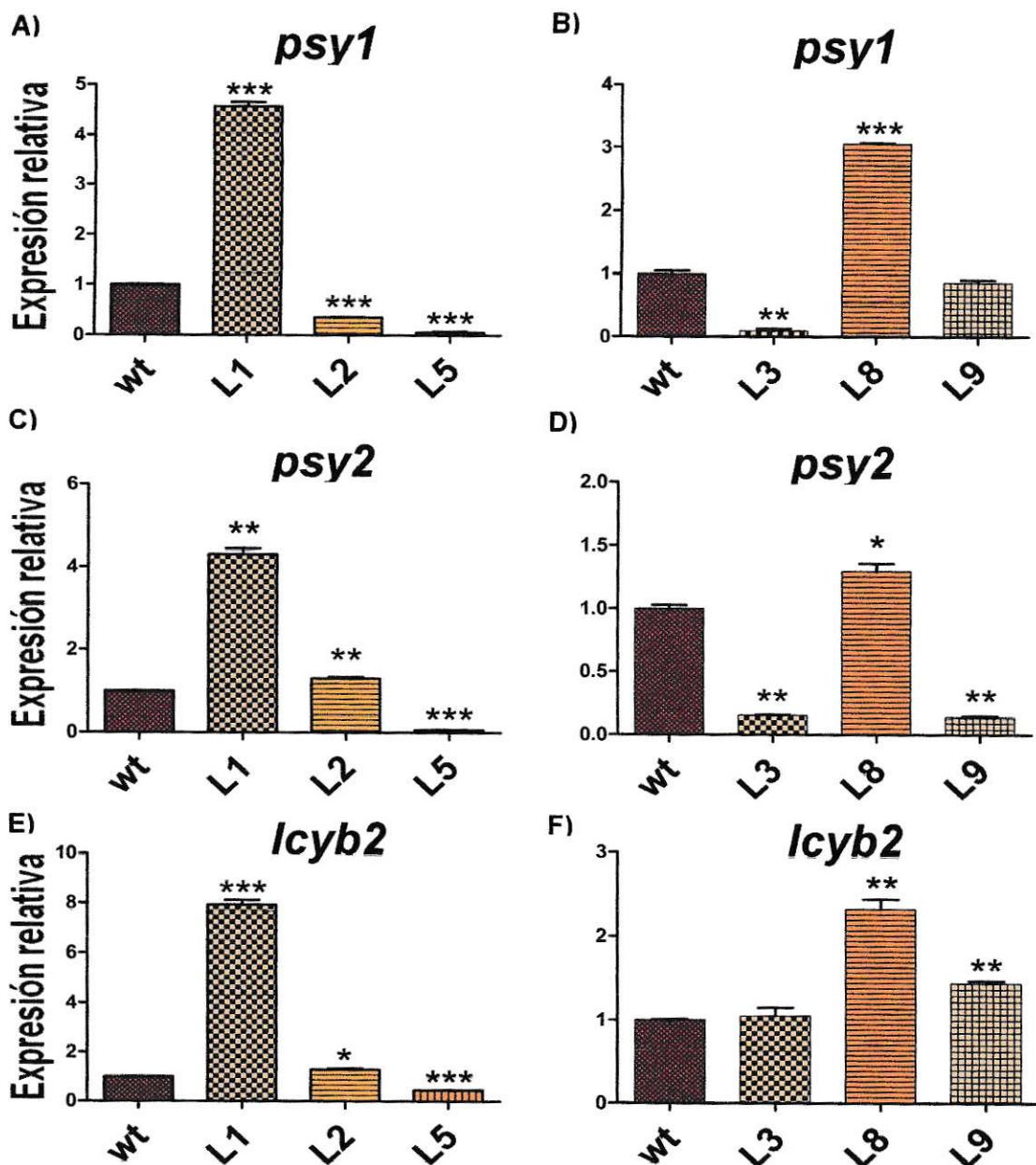


Figura 29. Análisis de qRT-PCR de genes clave en la ruta carotenogénica de la zanahoria. Se determinaron los niveles de abundancia relativa de los genes endógenos *psy1*, *psy2* y *lcyb2* en la raíz de la zanahoria. **A)** Amplificación del gen *psy1* en las líneas L1, L2 y L5 de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*lcyb1*. **B)** Amplificación del gen *psy1* en las líneas L3, L8 y L9 de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. **C)** Amplificación del gen *psy2* en las líneas L1, L2 y L5 de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*lcyb1*. **D)** Amplificación del gen *psy2* en las líneas L3, L8 y L9 de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. **E)** Amplificación del gen *lcyb2* en las líneas L1, L2 y L5 de zanahoria transgénicas para el vector pGWB2//*lcyb1*. **F)** Amplificación del gen *lcyb2* en las líneas L3, L8 y L9 de zanahoria transgénicas para el vector pMDC32//*lcyb1*. Asteriscos indican diferencias significativas entre cada valor y el control (wt) determinadas por un test de T de dos colas, no pareado. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

4.1 El tabaco y la zanahoria son modelos vegetales adecuados para la evaluación de la función de genes carotenogénicos.

Nicotiana tabacum (tabaco), junto con *Arabidopsis thaliana* son plantas modelo por excelencia en el estudio de genes en el área vegetal. En esta tesis, se decidió emplear el tabaco porque ha sido usado en numerosos trabajos donde aumentan los niveles de expresión de distintos genes carotenogénicos (Busch y col., 2002; Ralley y col., 2004; Zhu y col., 2007; Gerjets y col., 2007; Ji y col., 2009), su procedimiento de transformación ha sido empleado anteriormente en el laboratorio (Flores, 2009; Flores, 2010), se obtiene gran cantidad de material vegetal (hojas) para realizar los análisis moleculares y bioquímicos y los tiempos para la obtención de tabacos transgénicos son considerablemente menores (3 meses aprox.) a los tiempos para obtener plantas transgénicas con otros modelos vegetales, como *Solanum lycopersicum* (tomate). En paralelo se desarrolló el protocolo para transformar *Arabidopsis thaliana*, sin embargo hubo problemas de contaminación con larvas que eliminaron gran parte de las líneas transgénicas. Por otra parte, empleamos a la zanahoria en este trabajo debido a que es nuestro modelo de estudio y foco de investigación, y además se encuentra altamente estandarizado el protocolo de transformación en nuestro laboratorio (Pizarro, 2007; Pizarro, 2008; Flores, 2009; Flores, 2010).

La integración de la construcción en el genoma de la planta es un proceso limitante de la transformación cuya eficiencia depende del protocolo de transformación

utilizado y de la especie a transformar (Gelvin, 2000). Nosotros alcanzamos eficiencias superiores a 40% y 24% con los vectores utilizados en las transformaciones estables en este trabajo (para tabaco y zanahoria, respectivamente), lo que nos indica que el sistema de transformación empleado en ambos modelos vegetales fue adecuado y exitoso. Sin embargo, el proceso de inserción en el genoma sólo es uno de los puntos limitantes de la transformación de plantas, dado que la presencia de las construcciones no implica necesariamente que se encuentren funcionalmente activas, debido a que la expresión de las construcciones en organismos transformados es dependiente del lugar de inserción en el genoma (Gelvin, 2000; Gelvin y Kim, 2007). Mediante la transformación con *A. tumefaciens* la inserción de las construcciones en el genoma vegetal ocurre al azar aunque preferentemente en regiones de eucromatina del genoma nuclear. Por esto, aunque la probabilidad sea menor, es posible que la inserción ocurra en una región no activa del genoma, lo que implica que la construcción no sea funcional ya que no se expresaría. Por lo tanto, es posible tener líneas transformadas, pero que no expresen la construcción. Para evitar esto es importante contar con un adecuado sistema de selección de las plantas transformadas, de forma tal que solo se seleccionen las líneas transformadas cuyas construcciones se expresen. La obtención de falsos positivos puede deberse a que la planta se desarrolle donde la concentración del agente de selección está diluida por efecto de otras líneas resistentes o debido a la sensibilidad de la técnica usada para dicho análisis, o quizás por ambos factores. En nuestro caso, el sistema de selección durante la organogénesis y embriogénesis somática, de tabaco y zanahoria respectivamente, fue eficiente ya que en la mayoría de las líneas que fueron efectivamente transformadas y analizadas se detectó la presencia del gen *hptII* (resistencia a higromicina) mediante PCR para todas las construcciones empleadas tanto en tabaco como en zanahoria (Figura 14 B, D y F;

Figura 15 B y D). Además de la inserción de la construcción al azar en el genoma de la planta, otro factor que influye en la transformación de las plantas es el número de copias en que se inserta el gen en el genoma de la planta. Estos factores podrían contribuir a la aparición de diferencias en las plantas transgénicas obtenidas, teniendo en cuenta que el gen a expresar codifica para una proteína que cataliza la síntesis de β -caroteno un importante carotenoide involucrado en procesos vitales para la planta, como la foto-protección y fotosíntesis (Cunningham & Gantt, 1998). Estas diferencias fueron observadas a nivel fenotípico en las plantas de tabaco transformadas con el vector pGWB2//*cyb1* en donde 3 de las 6 líneas (L14, L15 y L16) analizadas presentaron un fenotipo con un crecimiento acelerado donde a los 2 meses en tierra ya presentaban estructuras florales en comparación con los 4-5 meses que tardan en aparecer las estructuras florales en una planta silvestre (crecida en nuestro invernadero). Además, estas tres líneas presentaron un crecimiento mayor respecto de la planta silvestre y respecto de las otras 3 líneas analizadas (L2, L3 y L11), el cual se vio reflejado en una mayor altura de estas líneas (sobre 70 cm) y en una mayor superficie presentada por las hojas (300 cm^2) en comparación con la altura y superficie de hojas de la planta silvestre (20 cm y 30 cm^2). Por otra parte, en las líneas restantes de este grupo de 6 líneas analizadas, la línea L2 presentó una mayor altura (40 cm) y también una mayor superficie de sus hojas (55 cm^2) que la planta silvestre pero mucho menor que las líneas L14, L15 y L16. Por último, las líneas L3 y L11, fueron dos casos especiales de este set de líneas ya que presentaron fenotipo enanos, con una altura (16 y 10 cm, respectivamente) y superficie de hojas menor a la planta silvestre (10 y 5 cm^2). Respecto a las zanahorias, a nivel fenotípico presentaron una coloración verde intensa en sus hojas en todas las líneas que fueron transformadas con los dos vectores (pGWB2 y pMDC32), ligeramente más intensa que la coloración de las hojas

presentada por la planta silvestre (Figura no mostrada). Sin embargo, en cuanto a la superficie de la hoja y tamaño de la planta es complejo realizar mediciones y hacer una estadística debido al tipo de hoja y tallo que presenta este organismo vegetal. Estas hojas, denominadas compuestas, presentan una superficie cóncava (ya que a simple vista pareciera estar compuesta por hojas más pequeñas) a diferencia de las hojas del tabaco las cuales son hojas enteras. Por otra parte, para considerar la longitud de la planta tampoco se realizaron mediciones de la longitud del tallo, ya que la zanahoria posee varios tallos de los cuales se originan las hojas y que son menos rígidos que el tallo del tabaco el cual es robusto y de un grosor mayor. Sin embargo, la parte aérea de las plantas transgénicas transformadas con estos dos vectores, presentó una gran cantidad de hojas con coloración verde intensa y de un aspecto saludable. Por otra parte, el fenotipo de las raíces obtenidas con el vector pGWB2 fue de un color anaranjado pálido en comparación con la planta silvestre (figura no mostrada). Además, las raíces de estas líneas presentaron un menor grosor y longitud que las raíces de la planta silvestre. Las raíces de las plantas obtenidas con el vector pMDC32 presentaron un color anaranjado intenso similar y en algunos casos mayores al presentado por la planta silvestre (Figura no mostrada). La mayoría de estas líneas presentaron grosores y longitudes de las raíces mayores a los de la raíz de la planta silvestre.

4.2 La proteína LCYB1 se localiza en los cloroplastos de las células vegetales

Para iniciar la caracterización funcional del gen *Dclcyb1* (y de su respectiva proteína DcLCYB1) evaluamos su localización sub-celular. Las enzimas carotenogénicas portan un péptido señal en el extremo amino terminal lo que las destina a plastidios (cloroplastos ó cromoplastos) de las células vegetales, organelo

donde son sintetizados los carotenoides (Cunningham & Gantt, 1998; Cunningham & Gantt, 2002; Dong y col., 2007). Es por esto que para corroborar la localización sub-celular de la proteína DcLCYB1 se utilizaron herramientas bioinformáticas para realizar el análisis "*in silico*" de la proteína (Tabla IV), y experimentos de expresión transitoria del gen *Dclcyb1* en hojas de tabaco para posteriormente mediante microscopía de fluorescencia conocer la localización de esta proteína. Con ambas aproximaciones experimentales logramos obtener una localización plastidial de DcLCYB1, lo cual aporta evidencias de su funcionalidad en zanahoria. Con la primera aproximación se determinó de acuerdo a la secuencia de la proteína DcLCYB1, que esta presenta una localización celular a cloroplastos en las células vegetales (Tabla IV). Esto se correlacionó con lo encontrado al usar la segunda aproximación, donde la fluorescencia observada en este experimento indica la localización sub-celular a cloroplastos presentada por parte de la proteína DcLCYB1 (Figura 11 B). Debido a que ésta proteína se encuentra involucrada en la síntesis de β -caroteno, un carotenoide bicíclico involucrado en procesos de fotosíntesis, entre otros (Cunningham & Gantt, 1998) es de vital importancia para la viabilidad de la planta que se encuentre en el compartimento celular correcto para cumplir su función.

4.3 La proteína LCYB1 está presente en las líneas transgénicas de tabaco

Para continuar con la caracterización funcional de este gen, se determinó la presencia de la proteína DcLCYB1 en las líneas transgénicas transformadas con el vector pGWB8//*cyb1*. Por medio de análisis bioinformáticos se determinó que esta proteína no posee dominios transmembrana, sin embargo se ha hipotetizado que esta proteína forma complejos con otras proteínas carotenogénicas y que está asociada a la membrana de los tilacoides (Kleinig & Briton, 1982; Bonk y col., 1997; Cunningham &

Gantt, 1998; Cunningham & Gantt, 2002). Más aún, se ha reportado que para tener una correcta actividad enzimática esta proteína debe estar unida a membrana (Beyer y col., 1991; Beyer y col., 1994; Al-Babili y col., 1996). Es por esto que en primera instancia se realizó la extracción de proteínas con un buffer de extracción apto para proteínas solubles (Buffer Na-P, Tao y col., 1995), con el cual no se detectó la presencia de la proteína en las líneas transgénicas de tabaco (datos no mostrados). Por otra parte, al usar el buffer Laemli (Laemmli, 1970), el cual contiene SDS y β -mercapto-etanol, se rompieron todas las interacciones y posibles uniones a la membrana que tuviera esta proteína y podría ser detectada con mayor facilidad usando los anticuerpos correspondientes. Al corroborar la calidad de la extracción de las proteínas en un gel de poliacrilamida (Figura 16, tinción con azul de Coomassie) no pudimos identificar la proteína DcLCYB1, la cual según predicciones bioinformáticas debería presentar un peso de aproximadamente 50 kDa, por lo cual probablemente estaba siendo enmascarada por la proteína Rubisco, presente en gran cantidad en todas las plantas y que presenta una migración semejante a la proteína DcLCYB1 (50 kDa, Kuchitsu y col., 1988). Sin embargo, al usar el anticuerpo comercial anti-HIS pudimos detectar la proteína DcLCYB1 en las seis líneas transgénicas de tabaco (Figura 17) presentando una migración de aproximadamente 50 kDa, incluyendo el péptido señal, lo cual ha sido reportado previamente para enzimas licopeno β -ciclasas de plantas (Bonk y col., 1997; Samba Mialoundama y col., 2010). Además de la presencia de la banda de 50 kDa, también se observó una banda de menor tamaño en todas las líneas transgénicas pero no en la planta silvestre (Figura 17). Esta banda, de aproximadamente 45 kDa, podría corresponder a un procesamiento post-traduccional de la proteína DcLCYB1 en el cual el péptido señal es cortado en el momento en que la proteína se internaliza en los cloroplastos, como ha sido reportado para un gran

número de proteínas que presentan una localización a cloroplastos (Schmidt & Mishkind, 1986; Flores, 2010, datos no publicados; Li & Chiu, 2010). Además si consideramos el tamaño del péptido señal del gen *Dclcyb1*, el cual tiene un tamaño de 69 aminoácidos (CholoroP® v1.1) lo cual equivaldría aproximadamente a 7 kDa que al restarlo del peso de la banda correspondiente a la DcLCYB1 sin procesar que es de alrededor de 52 kDa se obtendría un valor de 45 kDa que corresponde a la segunda banda observada en el western blot (DcLCYB1 procesada; Figura 17). Una tercera banda inespecífica es observada en todas las líneas transgénicas y en la planta silvestre (Figura 17), lo cual podría deberse a la detección de una secuencia similar a la de la secuencia de la histidina que podría estar presente en el genoma del tabaco. Con lo anterior podemos afirmar que efectivamente la proteína DcLCYB1 está presente y se está expresando en las líneas transgénicas de tabaco analizadas en este trabajo. Si bien esto no se realizó para las plantas de zanahoria, si se usó la misma estrategia que se empleó en el tabaco para aumentar la expresión de este gen por lo que esta proteína también debería estar presente en las plantas transgénicas de zanahoria obtenidas.

Este experimento se realizó para las líneas transgénicas obtenidas para el vector pGWB8//*cyb1* ya que éste contaba con la cola de histidina. Sin embargo, los experimentos posteriores de expresión del gen *Dclcyb1* y análisis de HPLC para determinar los niveles de carotenoides, se realizaron para las líneas transgénicas obtenidas con los vectores pGWB2//*cyb1* y pMDC32//*cyb1* debido a que se ha reportado previamente que al haber una proteína fusionada a la cola de histidina, en este caso LCYB1-His, puede verse afectada o disminuida la actividad de la proteína (Goel y col., 2000; Halliwell y col., 2001; Fonda y col., 2002; Chant y col., 2004). Lo

anterior fue corroborado en este trabajo, ya que de igual forma se realizó la cuantificación de los niveles de expresión del gen *lcyb1* y la extracción de pigmentos desde las plantas transformadas con el vector pGWB8//*lcyb1* (datos no mostrados). Efectivamente estos niveles se vieron disminuidos en comparación con los obtenidos por el vector pGWB2//*lcyb1* que presenta las mismas características del vector pGWB8//*lcyb1* a excepción de la fusión a la cola de histidina. Esto se traduce en un aumento de cuatro veces más en los niveles de carotenoides totales y de 1,8 veces más en cuanto a los niveles de β -caroteno para el vector que no presenta la fusión a la cola de histidina (Figura 20 B y C). Si bien no se ha determinado a nivel molecular el porqué de la disminución en la actividad de la proteína al presentar esta fusión a la cola de histidina, se ha hipotetizado que sería producto de un cambio mínimo en la estructura de la proteína y que podría estar afectando la interacción o sitios de unión con otras proteínas y/o organelos. En este caso podría estar afectando minimamente la unión a membrana que presenta la proteína DcLCYB1 y que es necesaria para la actividad de esta proteína.

4.4 El aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* provoca un aumento en los niveles de carotenoides en los dos modelos vegetales empleados

El aumento en los niveles de expresión de genes carotenogénicos con el fin de aumentar los niveles de carotenoides en distintos modelos vegetales mediante el uso de distintos vectores de expresión ha sido reportada previamente (Rosati y col., 2000; Dharmapuri y col., 2002; D'Ambrosio y col., 2003; Ji y col., 2008). Es por esto que en este trabajo se eligieron dos tipos de vectores de expresión (pGWB2 y pMDC32), los cuales presentan un promotor 35S simple y uno 35S doble, respectivamente. De este modo se asegura una expresión fuerte y constitutiva en el organismo vegetal

transformado genéticamente como ha sido demostrado para distintos modelos vegetales (Jayaraj y col., 2008; Wally y col., 2008).

4.4.1 El aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* causa un aumento en los niveles de carotenoides en plantas de tabaco

En las líneas transgénicas de tabaco para los vectores pGWB2 y pMDC32 se lograron obtener niveles de expresión del transgen entre 28-349 y 13-130 veces con respecto a la planta silvestre de tabaco. Esto evidenció que el gen *Dclcyb1* se estaba expresando en estas líneas. Los niveles de expresión obtenidos para este transgen causaron un incremento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno de las líneas transgénicas para el vector pGWB2 (Figura 18 A y B, Tabla VI anexo) pero no para el vector pMDC32, donde sólo dos de las seis líneas analizadas aumentaron sus niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 19 A y B, Tabla VI anexo). En el grupo de líneas transgénicas para el vector pGWB2 la tendencia general fue una correlación entre el nivel de expresión del transgen y los niveles de carotenoides presentados por estas líneas, lo cual ha sido reportado en trabajos anteriores donde emplean técnicas que aumentan los niveles de expresión de genes carotenogénicos (Maass, 2009; Ahn y col., 2011). Sin embargo, dos líneas (L3 y L11) que presentaron altos niveles de expresión, 190 y 349 veces con respecto a la planta silvestre, presentaron una disminución en los niveles de β -caroteno respecto a la planta silvestre de tabaco. Esto podría explicarse por qué tal vez la fuerte activación de la ruta en estas dos líneas direccionó el flujo metabólico hacia un producto final de la ruta como el Ácido Abscisico (ABA), de tal manera que los carotenoides producidos por la planta fueron utilizados en su mayoría para la obtención de los precursores de este compuesto (Figura 1). Por otra parte, las líneas L14, L15 y L16 que presentaron distinto

nivel de expresión del transgen, 28, 43 y 296 con respecto a la planta silvestre de tabaco, fueron las que presentaron mayores niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 18 B, Tabla VI anexo), siendo la línea L16 la que presentó los mayores niveles de estos compuestos aún cuando la línea L14 presentó mayores niveles de expresión del transgen, lo cual puede atribuirse al lugar del genoma donde se insertó el transgen. Para poder explicar de manera más clara algunos de los comportamientos presentados por las líneas mencionadas anteriormente (L3, L14 y L16) se observaron los niveles de expresión de genes endógenos que son clave en la ruta carotenogénica (*psy1*, *psy2* y *lcyb*). Para la línea L3 se observaron los mayores niveles de expresión para estos tres genes (Figura 21 A, C y E), lo cual respaldaría la hipótesis del ABA mencionada anteriormente, ya que al haber una mayor expresión de los genes clave habría un aumento en el flujo de la ruta y podría verse desembocado en la acumulación del producto final. Además, se ha reportado una regulación positiva entre el ABA y los genes *psy* (Lindgren y col, 2003), la cual puede observarse en este caso ya que los niveles de expresión del gen *psy2* son bastante altos en comparación con los niveles de este gen presentados por la planta silvestre de tabaco (Figura 21 C). Por otra parte, las líneas L14 y L16 presentaron niveles de expresión similares de los genes clave de la ruta, en donde se observó una activación de los tres genes clave en la ruta (*psy1*, *psy2* y *lcyb*), lo cual explicaría sus niveles similares de carotenoides totales y de β -caroteno (además de mayores niveles de estos compuestos en comparación con la planta silvestre de tabaco, Figura 18 B, Tabla VI anexo), ya que al haber mayor expresión de los genes *psy* se lograría aumentar la cantidad de precursores para la producción de β -caroteno. Más aún, estos precursores podrían ser metabolizados aún más efectivamente debido a que además de la alta expresión del gen *Dclcyb1* la expresión del gen *lcyb* endógeno también se ve aumentada, por lo que

la producción de β -caroteno por parte de éstas líneas es mucho mayor. Es importante resaltar la importancia del gen *Dclcyb1* en la regulación de la ruta carotenogénica, ya que como mencionamos anteriormente, la expresión de este gen aumenta los niveles de expresión de tres genes endógenos clave de la ruta carotenogénica, proponiendo de esta forma a éste gen como un inductor de la ruta carotenogénica. Esto se condice con experimentos realizados en plantas de zanahoria en nuestro laboratorio donde al obtener el silenciamiento del gen se reprime la expresión de estos tres genes endógenos clave de la ruta carotenogénica (Pizarro, 2008), lo cual corrobora la importancia de este gen en la regulación de la ruta carotenogénica en las plantas. Además, este comportamiento también podría sugerir que a nivel de la ruta carotenogénica podría estar ocurriendo una regulación por aumento de producto, ya sea por el β -caroteno o un compuesto río debajo de este, el cual regularía directa o indirectamente la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de precursores del β -caroteno.

Además cabe destacar, que las líneas L14, L15 y L16 presentaron niveles mayores de clorofila y luteína. Cabe recordar que LCYB1 participa en la síntesis de α -caroteno que es el precursor de la luteína y que éstos pigmentos están involucrados en la foto-protección y en la fotosíntesis, respectivamente, lo cual podría explicar el fenotipo de mayor altura, superficie y color verde oscuro de las hojas presentado por estas tres líneas (Datos no mostrados), lo que también podría estar relacionado directamente con el gran aumento en los niveles de clorofila presentado por estas líneas. Por otra parte, las líneas L3 y L11 no presentaron aumentos en los niveles de estos compuestos lo cual se correlaciona con su fenotipo de menor tamaño de la

planta y de las hojas, y el color verde claro de las hojas presentadas por estas dos líneas (Datos no mostrados).

En las líneas transgénicas para el vector pMDC32 no se obtuvo un cambio significativo en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, aún cuando se obtuvieron mayores niveles de expresión del transgen (Figura 19 A y B, Tabla VI anexo). Sin embargo, las líneas L6 y L15 que presentaron dos de los mayores niveles de expresión del transgen (64 y 131 veces con respecto a la planta silvestre de tabaco), también presentaron mayores niveles de carotenoides totales y de β -caroteno que el resto de líneas (L2, L3, L4 y L5), las cuales presentaron niveles de estos compuestos semejantes a los de la planta silvestre (Figura 19 B, Tabla VI anexo). Debido a que la mayoría de las líneas presentaron niveles de carotenoides similares a los de la planta silvestre, se seleccionaron tres líneas (L2, L6 y L15) para determinar los niveles de expresión de los tres genes clave en la ruta carotenogénica (*psy1*, *psy2* y *lcyb*) y de esta manera poder explicar el comportamiento de estas líneas (Figura 21 B, D y F). Para la línea L2 se observó una disminución en los niveles de expresión de estos tres genes, lo cual explicaría que sus niveles de carotenoides no hayan sido mayores a los de la planta silvestre de tabaco (Figura 19 B, Tabla VI anexo). Por otra parte, las líneas L6 y L15 presentaron niveles de expresión similares para los genes *psy1* y *psy2*, siendo estos mayores en la línea L15 (Figura 21 B y D). En la línea L6 se observaron niveles de expresión del gen *lcyb* menores a los de la planta silvestre, mientras que en la línea L15 estos niveles se mantuvieron constantes (Figura 21 F). El patrón observado anteriormente en los genes clave de la ruta explicaría la mayor acumulación de carotenoides totales y de β -caroteno presentados por la línea L6 y L15 en comparación con el resto de líneas analizadas y la planta silvestre de tabaco. Si

bien el efecto inductor del gen *Dclcyb1* no fue el mismo observado que para el vector pGWB2, en este caso se ven activados los genes *psy1* y *psy2* en estas dos líneas (L6 y L15) y no así el gen *lcyb*, lo cual explicaría los menores niveles de carotenoides presentados por estas dos líneas en comparación con las líneas L14, L15 y L16 obtenidas con el vector pGWB2. Este patrón corrobora el efecto inductor del gen *Dclcyb1* logrado sobre la ruta carotenogénica del tabaco.

Con la finalidad de presentar y discutir de manera más precisa los resultados discutidos anteriormente se determinó un promedio de los niveles de expresión, de carotenoides totales y de β -caroteno para los vectores empleados en la transformación del tabaco (pGWB2, pMDC32 y pGWB8, Figura 20 A, B y C), y de esta manera graficar la tendencia de las líneas transgénicas obtenidas para cada vector. A partir de esto podemos observar que los mayores niveles de expresión del gen *Dclcyb1* son conseguidos con el vector pGWB2 que presenta solo un promotor 35S, seguido del vector pMDC32 que presenta un promotor 35S doble y por último el vector pGWB8 que presenta un promotor 35S (éste vector presenta el gen *lcyb1* fusionado a una cola de histidina, Figura 20 A). Esto se correlacionó con la acumulación de carotenoides totales y de β -caroteno para el vector pGWB2 que fue el que presentó los mayores niveles de estos compuestos, seguidos del vector pGWB8 (Figura 20 B y C). A pesar del aumento en los niveles de expresión conseguidos con el vector pMDC32, esto no se tradujo en un aumento significativo en los niveles de carotenoides totales ni de β -caroteno en estas plantas transgénicas (Figura 20 B y C). Si bien el vector pMDC32 presenta un promotor 35S doble y por lo tanto debería obtener niveles de expresión mayores a los del vector pGWB2 que presenta un promotor 35S simple, esto no fue así en este caso y sería el primer reporte en el que un promotor 35S produjera mayores niveles de

expresión de un transgen que un promotor 35S doble. Sin embargo esto no siempre ocurre de esta manera, ya que en el caso de la zanahoria el promotor 2x35S aumenta significativamente en comparación con el promotor 35S simple como es discutido más adelante.

Con lo anterior podemos sugerir que el vector pGWB2 (35S) es el más adecuado para conseguir un aumento en los niveles de carotenoides totales y sobre todo en los niveles de β -caroteno en plantas de tabaco, además de corroborar la funcionalidad *in vivo* del gen *Dclcyb1* en este sistema heterólogo. Más aún, el gen *Dclcyb1* es el gen que más ha conseguido aumentos en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno en comparación con otros genes carotenogénicos de distintas especies vegetales que han sido empleados para aumentar estos compuestos en el tabaco (Tabla V) lo que respalda el uso de este gen con fines biotecnológicos para aumentar el contenido de carotenoides en plantas de interés comercial.

Tabla V. Genes carotenogénicos empleados para la transformación de *tabaco*.

Gen expresado	Organismo dador	Organismo receptor	Aumento de carot. totales	Aumento de β -caroteno	Referencia
<i>psy1</i>	<i>D. Carota*</i>	<i>N. tabacum</i>	-1,75	-1,75	Acevedo, 2011
<i>psy1</i>	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>	1,3	inalterado	Busch, 2002
<i>psy</i>	<i>L. barbarum</i>	<i>N. tabacum</i>	n.r.	2,1	Chen, 2011
<i>zds</i>	<i>G. lutea</i>	<i>N. tabacum</i>	n.r.	1,9	Chen, 2011
<i>zds1</i>	<i>D. Carota*</i>	<i>N. tabacum</i>	1,95	inalterado	Flores, 2011
<i>lcyb</i>	<i>L. barbarum</i>	<i>N. tabacum</i>	n.r.	1,5	Chen, 2011
<i>lcye</i>	<i>G. lutea</i>	<i>N. tabacum</i>	n.r.	1,45	Chen, 2011
<i>lcyb2</i>	<i>D. Carota*</i>	<i>N. tabacum</i>	1,6	1,6	Rosas, 2012
<i>lcyb1</i>	<i>D. carota*</i>	<i>N. tabacum</i>	7,7	3,6	Este trabajo

n. r.: no reportado. *: realizados en nuestro laboratorio.

4.4.2 El aumento en los niveles de expresión del gen *Ddicyb1* causa un aumento en los niveles de carotenoides en hojas de zanahoria

En las plantas de zanahoria transgénicas para los vectores pGWB2 y pMDC32 los niveles de expresión en las hojas variaron entre 28%-120% y 16%-666%, respectivamente en comparación con la planta silvestre de zanahoria (Figura 22 A, Tabla VII, anexo). Esto corroboró la mayor expresión del gen *Ddicyb1* en las plantas transgénicas para estos dos vectores. Además, los niveles de expresión de este gen se correlacionaron con los niveles de carotenoides presentados por las hojas de las líneas transgénicas para los vectores analizados (Figura 22 A y B, Tabla VII anexo), como ha sido reportado en trabajos previos (Maass y col., 2009; Ahn y col., 2011). De las líneas transgénicas para el vector pGWB2 se analizaron los niveles de expresión para cuatro de ellas (L1, L2, L3 y L5) ya que la calidad del cDNA de las líneas L4 y L6 no fue la adecuada. En las hojas de las cuatro líneas analizadas se observó un aumento en los niveles de expresión acompañado de un aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, siendo las líneas L3 y L5 las que presentaron mayores niveles de expresión y mayores niveles de carotenoides (Figura 22 A y B, Tabla VII, anexo). Si bien no se obtuvieron los niveles de expresión para el gen *lcyb1* de las líneas L4 y L6, si se observó un aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno por parte de estas líneas (Figura 22 B, Tabla VII anexo) por lo que se espera que presenten niveles de expresión similares a los observados para las demás líneas (Figura 22 A, Tabla VII anexo). Además, las líneas L1 y L2 mantuvieron sus niveles de α -caroteno constantes en comparación con las hojas de zanahoria silvestre pero aumentaron los niveles de β -caroteno, evidenciando el direccionamiento del flujo metabólico de la ruta hacia la ramificación del β -caroteno (Figura 22 B, Tabla VII

anexo). Por otra parte, el resto de las líneas (L3, L4, L5 y L6) además de aumentar los niveles de α -caroteno también aumentaron los niveles de β -caroteno (Figura 22 B, Tabla VII anexo) evidenciando la activación de las dos ramificaciones de la ruta en estas líneas, lo cual puede explicarse por la participación de la enzima LCYB1 en la síntesis de α -caroteno y de β -caroteno. Para complementar el patrón presentado por éstas líneas se midieron los niveles de expresión de tres genes clave en la ruta carotenogénica en la zanahoria (*psy1*, *psy2* y *lcyb2*) y de esta forma explicar el comportamiento presentado por las líneas transgénicas. Las líneas L1, L2 y L5 presentaron una disminución en los niveles de expresión de los genes *psy1* y *lcyb2*, y un aumento en *psy2* (Figura 28 A y E) pero presentaron un aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno. Este fenómeno se puede explicar si se le atribuye una función protagonista a los genes *psy2* y *lcyb1* en generar un aumento en los carotenoides precursores del β -caroteno (Shewmaker y col., 1999; Lindgren y col., 2003). Con esto evidenciamos que para lograr un aumento considerable en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno es necesaria al menos la inducción del gen *psy* endógeno, el cual ha sido reportado como el gen clave en la regulación de la ruta carotenogénica (Burkhardt y col., 1997, Hirschberg, 2001, Bramley, 2002).

Cabe destacar que además del aumento en los carotenoides éstas líneas presentaron un aumento en los niveles de luteína y clorofila, compuestos involucrados en procesos de foto-protección de la planta y procesos de fotosíntesis los cuales son imprescindibles para la viabilidad de las plantas. Aunque las hojas presentaron un color verde oscuro y tenían un aspecto robusto, debido a la forma de hoja compuesta que presenta la zanahoria no fue posible hacer las mediciones de superficie para comparar con la planta silvestre de zanahoria.

Las hojas de las líneas transgénicas para el vector pMDC32 también presentaron una correlación entre los niveles de expresión y los niveles de carotenoides, sin embargo en algunas líneas esta correlación no fue tan evidente (Figura 24 A y B, Tabla VIII anexo). Las líneas L8 y L9 presentaron los mayores niveles de expresión y también los mayores niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 24 A y B, Tabla VIII anexo). El resto de las líneas analizadas presentaron similares niveles de expresión del gen *Ddicyb1* y de niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, a excepción de las líneas L3 y L5 que mantuvieron constante su nivel de β -caroteno (Figura 24 A y B, Tabla VIII anexo). Para explicar de mejor manera el comportamiento de algunas líneas que no presentaron una correlación evidente entre los niveles de expresión del gen y los niveles de carotenoides (L3, L8 y L9) se analizaron los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2* (Figura 28 B, D y F). La línea L3 presentó un aumento en los niveles de expresión de los genes *psy1* y *lcyb2*, y una disminución en el nivel de expresión del gen *psy2*, lo cual podría responder a que el nivel de β -caroteno sea similar a la planta silvestre. Este resultado avalaría la funcionalidad preferente de *psy2*, por sobre *psy1*, en la síntesis de carotenoides en *D. carota*. La línea L8 presentó un aumento en el nivel de expresión de los genes *psy1* y *psy2*, y una mantención del nivel de expresión del gen *lcyb2*, lo cual resultó en una mayor producción de carotenoides disponibles para la síntesis de β -caroteno. Por otra parte, la línea L9 presentó un aumento en los niveles de expresión de todos los genes clave, lo cual podría explicar el mayor aumento en los niveles de carotenoides presentados por esta línea en comparación con el resto de las líneas, ya que posiblemente además de contar con mayor cantidad de carotenoides precursores del β -caroteno (debido al aumento de expresión de los genes *psy1* y *psy2*), también presenta mayor nivel de expresión del gen endógeno *lcyb2* con lo que puede aumentar la cantidad de β -

caroteno producido en las hojas. Más aún, la línea L9 presentó un nivel de β -caroteno sobre los 600 $\mu\text{g/g}$ de peso seco en hoja de zanahoria (Tabla VIII anexo), valor que ha sido reportado para la raíz de plantas de zanahoria silvestres desarrolladas en condiciones óptimas de campo (Pizarro, 2008) y 2,5 veces superior a lo observado para los niveles de hojas de plantas silvestres (Tabla VIII anexo). Además, las líneas L3 y L5 presentaron un aumento en el nivel de α -caroteno pero no de β -caroteno, lo que evidenciaría el direccionamiento del flujo metabólico de la ruta hacia la rama de la luteína. Sería interesante evaluar la expresión de los genes que codifican para las enzimas C β Hx o C ϵ Hx en las plantas que aumentan los niveles de expresión del gen *Dclcyb1*, ya que están directamente implicadas en la síntesis de luteína a partir de α -caroteno (Figura 1). Por el contrario, las líneas L8 y L9 presentaron una disminución en los niveles de α -caroteno y un aumento en los de β -caroteno, evidenciando en este caso un direccionamiento del flujo metabólico hacia la ramificación del β -caroteno. Cabe destacar, que al igual que con el vector pGWB2, las líneas que más aumentaron los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno fueron aquellas en donde además del aumento en la expresión del gen *Dclcyb1*, aumentaron los niveles de expresión del gen *psy2*, y como era de esperarse las líneas que presentaron una activación general de los tres genes clave fueron las que más produjeron carotenoides. Esto indica que el gen *Dclcyb1* presenta gran importancia a nivel de regulación de la ruta carotenogénica en *D. carota* ya que su expresión causa la activación de genes carotenogénicos clave.

Al igual que en tabaco, y para presentar de manera más clara los resultados discutidos anteriormente se promediaron los niveles de expresión, los carotenoides totales y de β -caroteno para los vectores empleados en la transformación de la zanahoria (pGWB2 y pMDC32; Figura 26 A, B y C), y de esta manera se graficó la

tendencia de las líneas transgénicas obtenidas para cada vector. De esto podemos observar claramente que los mayores niveles de expresión del gen *Dclcyb1* son obtenidos con el vector pMDC32 (Figura 26 A) que presenta un doble promotor 35S e induce en zanahoria con más fuerza la expresión del gen *Dclcyb1*, lo cual se correlaciona con lo reportado en un trabajo previo donde comparan la fuerza del promotor 35S doble con el 35S simple en hojas de zanahoria por medio de la expresión del gen de la β -glucoronidasa (Wally y col., 2008).

4.4.3 El aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* causa un aumento en los niveles de carotenoides en raíz de zanahoria

Los niveles de expresión obtenidos con el vector pGWB2 en la raíz de plantas transgénicas de zanahoria variaron entre -80,4 y 136,7%, presentando una disminución significativa en cuatro de las seis líneas obtenidas (L3, L4, L5 y L6), mientras que sólo 2 líneas, L1 y L2, presentaron un leve aumento en el nivel de expresión (Figura 23 A). Esto puede deberse a que en la planta transgénica se está silenciando el gen endógeno, para lo cual se ha reportado que basta con un 81% de identidad nucleotídica entre el transgen y el gen endógeno para que esto suceda (Burton y col, 2000, Ingelbrecht y col, 1999; Mueller y cols, 1995; Shweizer y col, 2000), por lo que en este experimento existía una probabilidad de que se silenciara el gen que se está expresando. Además, la clara tendencia de silenciamiento del gen en estas líneas se ve reflejado en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno los cuales se ven reducidos drásticamente en éstas líneas (Figura 23 B, Tabla VII anexo). Esto se condice con trabajos previos realizados en nuestro laboratorio donde al silenciar explícitamente el gen *Dclcyb1* se obtuvieron disminuciones de más del 50% en los niveles de carotenoides (Pizarro, 2008). Además, las seis líneas presentaron un color

anaranjado pálido, mucho menos intenso que el color presentado por la zanahoria silvestre, además de un menor tamaño y grosor de la raíz modificada (Figura no mostrada). A pesar de las disminuciones en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, y de los cambios fenotípicos mostrados por la raíz modificada, éstas plantas fueron viables y no presentaron ningún problema a nivel fisiológico, con lo cual podríamos concluir que los bajos niveles de transcripción del gen son suficientes para suplir los niveles requeridos de carotenoides por la planta, o que existe otro gen que suple los requerimientos basales, lo cual ha sido reportado previamente (Pizarro, 2008). Para explicar de mejor manera el comportamiento de éstas líneas se eligieron tres de éstas (L1, L2 y L5) para medir los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2* (Figura 29). La línea L1 (pGWB2//*lcyb1*), a pesar de que presentó mayores niveles de expresión del transgen en la raíz respecto a la planta silvestre y las otras líneas transgénicas (Figura 23B), y un aumento en los niveles de expresión de los tres genes clave *psy1*, *psy2* y *lcyb2* (Figura 29 A, Tabla VII anexo), no presentó cambios significativos en los niveles de carotenoides respecto a la planta silvestre. Sin embargo, es la línea que produjo más carotenoides que el resto de las líneas obtenidas (Figura 23 B, Tabla VII anexo). Al parecer el aumento de la expresión de los genes endógenos no fue suficiente para generar un incremento en los niveles de carotenoides en esta línea. La línea L2, a pesar de presentar un leve aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1*, este aumento no fue lo suficientemente alto para producir un aumento en los carotenoides (Figura 23 A y B). Más aún, en esta línea disminuyeron drásticamente los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (Figura 23 B, Tabla VII anexo). A esto se suma el leve aumento en los niveles de expresión de los genes *psy2* y *lcyb2* (Figura 29 C y E), el cual no fue suficiente para lograr un aumento en los niveles de carotenoides en esta línea. Además, esta línea presentó niveles de

expresión disminuidos del gen *psy1* (Figura 29 A), por lo cual tampoco podría haber suplido o actuado de manera sinérgica con el gen *psy2* y de esa forma aumentar los precursores necesarios para la producción de β -caroteno. Por último, la línea L5 presentó los niveles de expresión más bajos de los tres genes clave analizados, en comparación con las líneas L1 y L2, lo cual se correlaciona directamente con la disminución por sobre el 65% en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno presentados por esta línea.

Si bien en las hojas de las plantas transgénicas de la líneas L3, L4, L5 y L6 generadas con el vector pGWB2 hubo un aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* (Figura 22 A) en la raíz de estas mismas plantas transgénicas hubo silenciamiento de este gen (Figura 23 A). Por lo general el silenciamiento génico es un proceso sistémico por lo cual se espera un silenciamiento homogéneo en toda la planta. Sin embargo, esto no ocurrió en las plantas de zanahoria transgénicas obtenidas al expresar *Dclcyb1* con el vector pGWB2. Esto podría deberse a que los análisis de las hojas fueron realizados 4 meses antes que los de la raíz, es decir a 2 meses y medio de edad de las zanahorias (10 semanas). Además se ha reportado que el aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* se da a las 12 semanas de desarrollo de la planta aumentando sus niveles de transcrito en 16 veces en hoja y 12 veces en raíz. Si tenemos en cuenta que para producir silenciamiento génico por co-supresión se necesita que los niveles de expresión sobrepasen un nivel umbral podría ser que a las 10 semanas (tiempo en que fueron analizadas las muestras) este umbral no haya sido sobrepasado ya que la expresión del gen todavía ni presentaba su mayor aumento, el cual es a las 12 semanas. Por otra parte, las raíces fueron analizadas cuando este umbral ya fue superado (alrededor de 24 semanas) y por lo tanto pudo

gatillarse el silenciamiento en las raíces de estas líneas. Por lo general los análisis de las raíces de la zanahoria se hacen una vez que se evaluaron molecular y bioquímicamente las hojas ya que para ello es necesario sacar la planta de zanahoria de la tierra, la cual es una etapa irreversible. Cabe destacar que este sería el primer reporte en donde se produce un aumento en la expresión del transgen en un tejido de la planta, en este caso en las hojas, y silenciamiento génico en otro tejido de la misma planta (raíz).

El silenciamiento génico de *Dclcyb1* en estas líneas nos aporta en afirmar la funcionalidad del gen *Dclcyb1*, ya que observamos una correlación entre la expresión del gen y los niveles de carotenoides, tal como fue descrito en nuestro laboratorio anteriormente donde se concluyó que el gen *Dclcyb1* es necesario para la síntesis de β -caroteno tanto en hojas como en la raíz modificada de la zanahoria (Pizarro, 2008).

Por otra parte, en las raíces de las líneas transgénicas para el vector pMDC32 la correlación entre los niveles de expresión y los niveles de carotenoides no fue tan evidente, aunque si hubo un aumento general en los niveles de expresión y los niveles de carotenoides (Figura 25 A y B, Tabla VIII anexo). El nivel de expresión del gen *Dclcyb1* en las líneas L1, L5, L6, L8 y L9 aumentó significativamente mientras que el nivel de expresión en la línea L3 disminuyó significativamente. El aumento en los niveles de expresión de estas líneas se ve reflejado en el aumento de los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno en la mayoría de las líneas (Figura 25 A y B, Tabla VIII anexo). La línea L3, que es la única línea en que disminuyen los niveles de expresión del gen, presenta niveles de carotenoides totales y de α -caroteno semejantes a los de la raíz de la zanahoria silvestre (Figura 25 B, Tabla VIII anexo), mientras que sus niveles de β -caroteno disminuyen alrededor de un 35%, lo cual

podría explicarse porque la enzima DcLCYB1 está directamente implicada en la conversión de licopeno a β -caroteno, por lo que al disminuir los niveles de expresión de este gen se vieron afectados los niveles de β -caroteno en esta línea. La línea L5 en cambio, no presenta un cambio significativo en los niveles de carotenoides totales, pero sí en los niveles de α -caroteno, que disminuyen, y en los niveles de β -caroteno que aumentan (Figura 25 B, Tabla VIII anexo), lo cual se explica en gran parte porque al aumentar la expresión del gen *Dclcyb1*, el flujo metabólico se direccionó hacia el β -caroteno aumentando sus niveles y disminuyendo los niveles del α -caroteno, compuesto que se encuentra en la ramificación opuesta de la ruta. Las líneas L1, L6, L8 y L9 presentaron niveles de expresión y niveles de carotenoides totales y de β -caroteno similares, y la diferencia entre éstos está dada principalmente por la expresión de los genes clave de la ruta, por lo que se escogieron tres líneas L3, L8 y L9 para explicar de mejor forma el comportamiento de estas líneas. La línea L3, la cual presentó niveles de transcrito del gen *Dclcyb1* disminuidos, también presentó disminución en los niveles de expresión de los genes *psy1* y *psy2*, y una mantención en los niveles del gen *lcyb2* (Figura 29 B, D y F), lo cual explicaría la disminución en los carotenoides presentada por esta línea, principalmente por la falta de carotenoides precursores del β -caroteno. Por otra parte, la línea L9 presentó una mantención, disminución y aumento en los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2*, respectivamente (Figura 29 B, D y F), lo cual podría explicar en parte el aumento en los carotenoides presentado por esta línea, porque aunque los niveles de *psy2* están disminuidos, el gen *psy1* podría estar supliendo su función y aportando la cantidad necesaria de carotenoides precursores del β -caroteno los cuales podrán ser ciclados por las enzimas LCYB1 y LCYB2. Por último, la línea L8 presenta una activación

general de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2*, claves en la ruta carotenogénica lo cual explica el gran aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno conseguidos por ésta línea (Figura 25 B, Tabla VIII anexo). Cabe destacar que todas las líneas obtenidas, a excepción de la línea L3, presentaron raíces de un fenotipo de color anaranjado semejante al de la zanahoria silvestre y en algunos casos más intensos que ésta. Más aún, la línea L6 fue la línea que presentó el mayor aumento en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno (además del color anaranjado más intenso entre las líneas analizadas), alcanzando niveles de carotenoides totales y de β -caroteno de alrededor de un 76% y de un 101%, respectivamente, en comparación con la raíz de una planta silvestre.

Finalmente, para explicar y discutir de manera más clara los resultados presentados anteriormente se determinó un promedio de los niveles de expresión, de los carotenoides totales y de β -caroteno para los vectores empleados en la transformación de la zanahoria (pGWB2 y pMDC32; Figura 27 A, B y C), y de esta manera se graficó la tendencia de las líneas transgénicas obtenidas para cada vector. Con esto pudimos corroborar que los mayores niveles de expresión del gen *Dclcyb1* fueron obtenidos con el vector pMDC32 (Figura 27 A, Tabla VIII anexo), el que al tener un promotor 35S doble dirige con más fuerza la expresión de éste gen, lo cual ha sido reportado previamente para este promotor 35S doble en comparación con el promotor 35S simple al observar la expresión de la β -glucoronidasa en la raíz de la zanahoria (Wally y col., 2008). Estos niveles de expresión se correlacionan directamente con los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno, los cuales son mucho mayores en las líneas obtenidas con el vector pMDC32 que con el vector pGWB2, los que incluso son menores que los niveles de la raíz silvestre de zanahoria (Figura 27 B y C). Es

importante mencionar que cada evento de transformación es independiente y cada línea representa un organismo individual, por lo que pueden presentarse comportamientos diferentes en cada una de las líneas analizadas a lo largo de los experimentos llevados a cabo en esta tesis.

Si comparamos los resultados obtenidos tanto en las hojas como en las raíces de las zanahorias podemos observar que se alcanzaron niveles de expresión del gen mucho mayores en las hojas que en la raíz, al igual que los aumentos porcentuales en los carotenoides totales y β -caroteno. Esto puede explicarse por que a pesar de que el promotor 35S es fuerte y constitutivo, su expresión no es la misma en todos los órganos de la planta, por ejemplo en hojas de zanahoria la expresión de un transgen dirigido por el promotor 35S doble es mucho mayor que la expresión de este mismo transgen pero en la raíz de la misma planta de zanahoria (Wally y col., 2008). Además, esto podría relacionarse a que el nivel de carotenoides en los tejidos está dado por el equilibrio entre la síntesis y la degradación constante ejercida por la luz mediante el proceso de foto-oxidación (Simkin y col, 2003). En los cromoplastos de la raíz modificada los carotenoides están siendo acumulados en complejos lipo-proteicos que les otorgan mayor estabilidad a los pigmentos, lo que se traduce en una baja tasa de degradación metabólica (Deruere y col., 1994, Maass 2009), y por lo tanto una mayor acumulación de estos compuestos en este tejido.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el gen *Dclcyb1* es funcional tanto en hoja como en raíz de zanahoria, y que al aumentar la expresión de este gen se logra elevar la tasa de carotenoides totales y de β -caroteno en ambos tejidos de la zanahoria. Como se mencionó anteriormente, los efectos del aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* son más marcados en las hojas debido principalmente a

que el qRT-PCR evalúa la expresión del transgen y el gen endógeno, por lo que se ve afectado por la regulación endógena del gen que se diferencia notablemente en hoja en condiciones de exposición a luz, y en la raíz modificada que se desarrolla en condiciones de oscuridad. En órganos fotosintéticos los niveles de expresión son mayores que en la raíz, por lo tanto, tendría una regulación positiva por efecto de la luz. Esto se correlaciona directamente con las cajas de respuesta a luz que han sido encontradas en el promotor parcial caracterizado en nuestro laboratorio para el gen *lcyb1* de *D. carota* (Fuentes, 2011) y como ha sido reportado también para algunos genes *lcyb*, *psy* y otros genes carotenogénicos de distintos modelos vegetales (Welsch y col, 2000; Simkin y col, 2003; Welsch y col, 2003; Woitsh y Römer, 2003; Römer y col, 2005).

Otro punto importante es la función reguladora que cumple el gen *Dclcyb1* tanto en hojas como en raíz de zanahoria, al inducir la expresión de genes clave de la ruta carotenogénica de este organismo (*psy1*, *psy2* y *lcyb2*). Esto pudo comprobarse en plantas que expresan el gen como también en zanahorias silenciadas para *Dclcyb1*. Este resultado también fue obtenido previamente en nuestro laboratorio al silenciar explícitamente el gen *Dclcyb1* (Pizarro, 2008). Además, al aumentar la expresión del gen *Dclcyb1*, aumentan los niveles de β -caroteno y aumentan los niveles de expresión de los genes *psy1*, *psy2* y *lcyb2* (como fue observado en la mayoría de las líneas que presentaron aumentos significativos tanto en hoja como en raíz de zanahoria), lo cual indicaría que el β -caroteno o una molécula río abajo de ésta podría regular de manera positiva la expresión de estos genes carotenogénicos en una planta silvestre. Un buen candidato para este efecto es la hormona vegetal ácido abscísico, ABA. Esta fitohormona regula la expresión de muchos genes en las plantas, entre ellos genes

relacionados con procesos de protección a estrés oxidativo (Leung y Giraudt, 1998), y como se ha mencionado, ésta es una de las funciones que cumplen los carotenoides. Se ha descrito que en arroz y maíz el gen *psy3* es regulado a nivel transcripcional por el ABA, los que poseen en su región promotora los elementos ABRE de respuesta a ABA, mostrando una regulación positiva de la vía de síntesis de carotenoides (Welsch y col, 2008; Li y col, 2008). En estudios realizados en el laboratorio también encontramos elementos tipo ABRE en las regiones promotoras de los genes *psy2* y *lcyb1* de *D. carota* las cuales responden a ABA en plántulas de zanahoria y en tabaco transgénico (Fuentes, 2011). Por lo tanto, el aumento de la expresión del gen *Dclcyb1* puede aumentar el flujo metabólico hacia la síntesis de ABA, y esto aumentaría la expresión de genes carotenogénicos como *psy1*, *psy2* y *lcyb2* aumentando el flujo de síntesis del precursor fitoeno y la ruta de síntesis de carotenoides. Todo esto sugiere que existiría una regulación positiva por efecto del ABA sobre la ruta de síntesis de carotenoides, a través de una regulación transcripcional concertada de los genes carotenogénicos, y que un importante punto de esta regulación ocurre a nivel de los genes *psy* (Lindgren y col, 2003) y *lcyb* (Pizarro, 2008; y en ésta tesis).

Si bien a lo largo del trabajo se logró demostrar la caracterización funcional del gen *Dclcyb1* de zanahoria en un sistema heterólogo (tabaco) y en nuestro modelo de estudio la zanahoria, también hay limitaciones y factores externos que no podemos controlar y que de manera directa o indirecta influyen en la obtención y explicación de nuestros resultados. En primer lugar, uno de estos factores es la inserción al azar del gen *Dclcyb1* en el genoma de los modelos vegetales empleados, la cual puede dar cuenta de los distintos niveles de expresión del gen en las distintas líneas analizadas. En segundo lugar, no se puede explicar completamente el comportamiento en el

aumento de los niveles de carotenoides totales y β -caroteno, ya que en este trabajo no se midió la acumulación de proteína en cada una de las líneas ni la actividad de la enzima. Por otra parte, si bien se cuantificaron los niveles de clorofila por medio de HPLC, no se cuantificó la tasa fotosintética de las líneas obtenidas lo cual podría contribuir a entender el comportamiento que presentaron las líneas de mayor tamaño y de mayor superficie de las hojas. Finalmente, tampoco se cuantificaron los niveles de ácido abscísico por lo cual no se puede responder rotundamente si alguna de las líneas presenta la regulación positiva dada por este compuesto como ha sido reportado para otros modelos vegetales. Todas estas limitaciones impiden dar una explicación adecuada para cada uno de los comportamientos de todas las líneas generadas con cada vector en los modelos del tabaco y la zanahoria. Sin embargo, parte de estas limitaciones pueden ser resueltas al transformar los plastidios de las células de tabaco con el gen *Dclcyb1* a partir de la cual se obtienen líneas con comportamientos más homogéneos (Apel & Bock, 2009), en vez de utilizar la transformación nuclear clásica mediada por *A. tumefaciens*. Para lo anterior también se podrían obtener las semillas de los modelos vegetales empleados y trabajar con la descendencia homocigota, pero esto tardaría alrededor de 1 año para realizar análisis del tabaco y alrededor de 2-3 años para realizar los análisis de las zanahorias homocigotas. Respecto a los niveles de carotenoides sintetizados por la planta se podrían realizar experimentos de purificación de la enzima *Dclcyb1* y de esta manera conocer la actividad de la enzima y a su vez cuantificar esta proteína en cada una de las líneas analizadas para poder explicar mejor la relación entre los niveles de expresión de este gen y los niveles de carotenoides totales y β -caroteno. Por otra parte, la cuantificación de los niveles de clorofila podría ser complementada con mediciones de la tasa de fotosíntesis de cada línea de manera de poder explicar el mayor crecimiento y el mayor tamaño de las hojas

presentado por varias líneas y relacionarlo con una mayor tasa fotosintética. Por último, los niveles de ácido abscísico pueden ser cuantificados generando un anticuerpo específico para este compuesto con lo cual se tendría una medición directa del mismo, ó tal vez para tener una respuesta a más corto plazo se podrían cuantificar genes que están directamente relacionados con el aumento en los niveles de este compuesto como por ejemplo el gen osmotin en tabaco o los genes *nced* y *zep* en zanahoria.

Con lo expuesto anteriormente acerca de los resultados obtenidos en este trabajo (y teniendo en cuenta las limitaciones de nuestro diseño experimental) respecto a los dos modelos vegetales del tabaco y la zanahoria, podemos constatar la funcionalidad del gen *Dclcyb1* en plantas. Si bien, no en todos los experimentos donde se aumentaron los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* hubo un aumento en los niveles de expresión de este gen (lo que en cierta parte apoyaría la contra hipótesis formulada en este trabajo) y a su vez en los niveles de carotenoides totales y/o β -caroteno, en todos los experimentos se obtuvo un comportamiento general de aumento en los niveles de expresión y los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno para al menos cuatro de seis líneas analizadas (el número de líneas que mostraron esta tendencia varió entre 4 y 6, de un total de 6 líneas en todos los experimentos realizados).

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. Los vectores pGWB2//*lcyb1*, pMDC32//*lcyb1*, pGWB8//*lcyb1* y pMDC85//*lcyb1*, diseñados en este trabajo son funcionales y suficientes para lograr una inserción estable o transitoria del gen *lcyb1* (y sus secuencias de expresión) en el genoma de *N. tabacum* y *D. carota*.
2. Las líneas transgénicas expresaron el gen *Dclcyb1* y presentaron cambios en los niveles de carotenoides.
3. El gen *Dclcyb1* codifica para una enzima DcLCYB1 que se localiza en los cloroplastos de las células vegetales, y además se encuentra presente en las líneas de tabaco transformadas de manera estable con el vector pGWB8//*lcyb1*.
4. En tabaco, se obtuvo una correlación directa entre el promedio del nivel de expresión del gen *Dclcyb1* y el promedio de los niveles de carotenoides al usar los vectores que poseen solo un promotor 35S (pGWB2 y pGWB8). Particularmente con el vector pGWB2 se obtuvo el mayor aumento en el promedio del nivel de expresión del gen *Dclcyb1* y del promedio del nivel de carotenoides totales y β -caroteno.
5. En las hojas de zanahoria, los mayores niveles de expresión y sobre todo los mayores niveles de β -caroteno fueron obtenidos en las líneas transgénicas para el vector pMDC32 (2x35S).

6. En la raíz de zanahoria, el vector pMDC32 (2x35S) es el que produce el mayor aumento en el nivel de expresión del gen *Dclcyb1* y con el que se consiguen los mayores niveles de carotenoides totales y de β -caroteno.
7. Tanto en tabaco como en zanahoria el aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1* causa una alteración en la expresión de genes clave de la ruta carotenogénica en estos modelos vegetales lo cual se correlaciona con los niveles de carotenoides observados.
8. El gen *Dclcyb1* puede emplearse como una gran herramienta biotecnológica para la generación de plantas con mayor contenido de carotenoides totales y especialmente de β -caroteno.
9. En términos generales y teniendo en cuenta que en cada experimento realizado en esta tesis entre 4 y 6 líneas presentaron un aumento considerable en los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno producto del aumento en los niveles de expresión del gen *Dclcyb1*, aunque algunas líneas no presentaron esta correlación. Debido a esto los resultados de esta tesis apoyan las dos hipótesis formuladas. Sin embargo, el comportamiento general obtenido para las líneas analizadas tanto en tabaco (11 de 18) como en zanahoria (10 de 12) muestran que hay un aumento en los niveles los niveles de carotenoides totales y de β -caroteno cuando hay un aumento en la expresión del gen *Dclcyb1*.

Bibliografía

- Ahn, M., Ah Noh, S., Ha, S., Back, K., Lee, S. W., y Bae, J. M. 2011. Production of ketocarotenoids in transgenic carrot plants with an enhanced level of b-carotene. Plant Biotechnology Report.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Castillo López, R. y Gómez-Gómez L. 2010. The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. Journal of Experimental Botany, Vol. 61, No. 1, pp. 105–119.
- Al-Babili, S. y Beyer, P. 2005. Golden Rice – five years on the road – five years to go?. TRENDS in Plant Science Vol.10 No.12.
- Al-Babili, S., V. Lintig, J., Haubruck, H. y Beyer, P. 1996. A novel, soluble form of phytoene desaturase from *Narcissus pseudonarcissus* chromoplasts is HSP70-complexed and competent for flavinylation, membrane association and enzymatic activation. Plant J. 9, 601 -612.
- Alquezar B. 2007. Caracterización bioquímica y molecular de la carotenogénesis en frutos cítricos. Tesis doctoral para optar al grado de Doctor. Universidad de Valencia.
- Alquézar, B., Zacarías, L. y Rodrigo, M. J. 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β -cyclase from *Citrus* and its relation to lycopene accumulation. J Exp Bot 60: 1783-1797.
- Ampomah-Dwamena, C., McGhie, T., Wibisono, R., Montefiori, M., Hellens, R. P. y Allan, A. C. 2009. The kiwifruit lycopene beta-cyclase plays a significant role in carotenoid accumulation in fruit. Journal of Experimental Botany, Vol. 60, No. 13, pp. 3765–3779.
- Armstrong, G. y Hearst, J. 1996. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis". Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 10: 228-237.
- Apel, W. y Bock, R. 2009. Enhancement of Carotenoid Biosynthesis in Transplastomic Tomatoes by Induced Lycopene-to-Provitamin A Conversion. Plant Physiology, Vol. 151, pp. 59–66.
- Baranska, M., Baranski, R., Schulz, H. y Nothnagel, T. 2006. Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. Planta 224: 1028–1037.
- Bartley, E. y Scolnik, P. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. The Plant Cell, Vol. 7: 1027-1038.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. y Marquardt, J. 1993. Carotenoidbinding proteins of photosystem II. European Journal of Biochemistry 212: 297-303.

- Beisel, K.G., Jahnke, S., Hofmann, D., Köppchen, S., Schurr U. y Matsubara, S. 2010. Continuous turnover of carotenes and chlorophyll a in mature leaves of *Arabidopsis thaliana* revealed by $^{14}\text{CO}_2$ pulse-chase labeling. *Plant Physiol.* 152 (4): 2188–2199.
- Beyer, P., Kroncke, U. y Nievelstein, V. 1991. On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplasts. *J. Biol. Chem.* 266, 17072-17078.
- Beyer, P., Nievelstein, V., Al-Babili, S., Bonk, M. y Kleinig, H. 1994. Biochemical aspects of carotene desaturation and cyclization in chromoplasts membranes from *Narcissus pseudonarcissu*. *Pure Appl. Chem.* 66, 1047-1056.
- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H., y 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.
- Bouvier, F., Hugueney, P., d'Harlingue, A., Kuntz, M. y Camara, B. 1994. Xanthophyll biosynthesis in chromoplasts: isolation and molecular cloning of an enzyme catalyzing the conversion of 5,6- epoxy-carotenoids into ketocarotenoid. *Plant Journal* 6: 45–54.
- Bouvier, F., d'Harlingue, A., Hugueney, P., Marin, E., Marion-Poll, A., y Camara, B. 1996. Xanthophyll biosynthesis: cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of *betacyclohexenyl* carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Biology Chemistry* 271: 28861-67.
- Bouvier, F., Rahier, A., y Camara, B. 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du CNRS (UPR2357) et Université Louis Pasteur.
- Bramley, P. M. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53:2107-2113.
- Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 9: 1551-58.
- Botella-Pavía, P., y Rodríguez-Concepción, M. 2006. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods.
- Burkhardt, P. K., Beyer, P., Wunn, J., Kloti, A., Armstrong, G. A., Schledz, M., von Lintig, J., y Potrykus I. 1997. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J* 11: 1071–1078.
- Busch, M., Seuter, A., y Hain, R. 2002. Functional Analysis of the Early Steps of Carotenoid Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology*, February 2002, Vol. 128, pp. 439–453.

- Camara, B., Huueney, P., Bouvier, F., Kuntz, M., y Monéger, R. 1995. *Biochemistry and molecular biology of chromoplast development*. International Review of Cytology. 163: 175-247.
- Chant, A., Kraemer-Pecorec, C., Watkinb, R., y Kneale, G. G. 2004. Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expression and Purification* 39 (2005) 152–159.
- Chen, W. P., y Punja, Z. K. 2002. Transgenic herbicide- and disease-tolerant carrot (*Daucus carota* L.) plants obtained through *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Cell Rep* 20:929-935.
- Chen, X., Han, H., Jiang, P., Nie, L., Bao, H., Fan, P., Lv, S., Feng, J., y Li, Y. 2011. Transformation of b-Lycopene Cyclase Genes from *Salicornia europaea* and *Arabidopsis* Conferred Salt Tolerance in *Arabidopsis* and Tobacco. *Plant Cell Physiol.* 52(5): 909–921.
- Conti, A., Pancaldi, S., Fambrini, M., Michelotti, V., Bonora, A., Salvini, M., y Pugliesi, C. 2004. A deficiency at the gene coding for zeta-carotene desaturase characterizes the sunflower *non dormant-1* mutant. *Plant Cell Physiol* 45:445-55.
- Cunningham, F., y Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology* 49: 557-583.
- Cunningham, F., y Gantt E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene-cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 2908-2910.
- Cunningham, F. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 8, pp. 1409–1417.
- D'Ambrosio, C., Giorio, G., Marino, I., Merendino, A., Petrozza, A., Salfi, L., Stigliani, A., y Cellini, F. 2004. Virtually complete conversion of lycopene into β -carotene in fruits of tomato plants transformed with the tomato *lycopene β -cyclase (lcy-b)* cDNA. *Plant Science* 166: 207–214.
- Demmig-Adams, B., Gilmore, A., y Adams W. III 1996. Carotenoids 3: *in vivo* function of carotenoids in higher plants. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 10: 403–12.
- Demmig-Adams, B., y Adams W. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298: 2149-53.
- Deruere, J., Romer, S., d'Harlingue, A., Backhaus, R. A., Kuntz, M. y Camara, B. 1994. Fibril assembly and carotenoid overaccumulation in chromoplasts: a model for supramolecular lipoprotein structures. *Plant Cell.* 6: 119–133.

- Devitt, L., Fanning, K., Dietzgen, R., y Holton T. 2010. Isolation and functional characterization of a lycopene beta-cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). *Journal Exp Bot* 61:33-39.
- Dharmapuri, S., Rosati, C., Pallara, P., Aquilani, R., Bouvier, F., Camara, B., y Giuliano, G. 2002. Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Letters* 519 (2002) 30-34.
- Dong, H., Deng, Y., Mu, J., Lu, Q., Wang, Y., Xu, Y., Chu, C., Chong, K., Lu, C., y Zuo, J. 2007. The *Arabidopsis Spontaneous Cell Death1* gene, encoding a z-carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signaling. *Cell Research* (2007) 17:458-470.
- 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 Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Flores, C. 2010. Estudio de la función de los genes z-caroteno desaturasa (*zds1* y *2*) de *Daucus carota* (zanahoria). Tesis de Magister para optar al título de Magister en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fonda, I., Keig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P., y Menart V. 2002. Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties, *Sci. World J.* 2: 1312–1325.
- Frank, H., y Cogdell, R. 1996. Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.* 63: 257-64.
- Fraser, P., Hedden, P., Cooke, D., Bird, C., Schuch, W., y Bramley, P. 1995. The effect of reduced activity of phytoene synthase on isoprenoid levels in tomato pericarp during fruit development and ripening. *Planta* 196: 321–26.
- Fraser, P., y Bramley, P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Program of Lipid Research* 43: 228-265.
- Fujisawa, M., Watanabe, M., Choi, S., Teramoto, M., Ohyama, K., y Misawa, N. 2008. Enrichment of carotenoids in Flaxseed (*Linum usitatissimum*) by metabolic engineering with introduction of bacterial phytoene synthase gene *crtB*. *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 105, No. 6, 636-641.
- 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 Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Fuentes, P. 2011. Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos *psy2* y *lcyb1* de *Daucus carota*. Tesis de Magister para optar al título de Magister en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

- Gelvin, S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review in Plant Physiology and Molecular Biology*. 52: 233-256.
- Gelvin S., Kim S. 2007. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1769: 410-421.
- Gerjets, T., Sandmann, M., Zhu, C., y Sandmann, G. 2007. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in leaves and flowers of tobacco species. *Biotechnol J* 2: 1263-1269.
- Giorio, G., Stigliani, A., y D'Ambrosio, C. 2007. Agronomic performance and transcriptional analysis of carotenoid biosynthesis in fruits of transgenic HighCaro and control tomato lines under field conditions. *Transgenic Research* 16: 15-28.
- Goel, A., Colcher, D., Koo, J. S., Booth, B. J., Pavlinkova, G., y Batra S. K. 2000. Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct, *Biochim. Biophys. Acta* 1523: 13–20.
- Goodwin, T. 1980. *The Biochemistry of the Carotenoids*, Vol. 1. London: Annual Revision Plant Physiology Plant Molecular Biology 49: 557-583.
- Halliwell, C. M., Morgan, G., Ou, C., y Cass, E. G. 2001. Introduction of a (Poly)histidine Tag in L-Lactate Dehydrogenase Produces a Mixture of Active and Inactive Molecules. *Analytical Biochemistry* 295, 257–261.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 210-218.
- Howitt, C., y Pogson, B. 2006. Carotenoid accumulation and functions in seeds and non-green tissues. *Plant, Cell and Environment* 29: 435-445.
- Hornero, D., y Briton, G. 2002. Involvement of NADPH in the cyclization reaction of carotenoid byosynthesis. *European Journal of Biochemistry letters* 515 (1-3): 133-136.
- Horvitz, M., Simon, P., y Tanumihardjo S. 2004. Lycopene and b-carotene are bioavailable from lycopene red carrots in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 58: 803–811.
- Huguene, P., Badillo, A., Chen, H., Klein, A., y Hirschberg, J. 1995. Metabolism of cyclic carotenoids: a model for the alteration of this biosynthetic pathway in *Capsicum annuum* chromoplasts. *Plant Journal* 8: 417-24.
- Huguene, P., Bouvier, F., Badillo, A., Quennemet, J., d'Harlingue, A., y Camara, B. 1996. Developmental and stress regulation of gene expression for plastid and cytosolic isoprenoid pathways in pepper fruits. *Plant Physiology*. 111: 619-626.
- Jayaraj, J., Devlin, R., y Punja, Z. 2008. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. *Transgenic Research* 17: 489-501.

- Ji, J., Wang, G., Wang, J., y Wang, P. 2008. Functional analysis of multiple carotenogenic genes from *Lycium barbarum* and *Gentiana lutea* L. for their effects on *b*-carotene production in transgenic tobacco. *Biotechnol Lett* (2009) 31:305–312.
- Just, B. J., Santos, C. A., Fonseca, M. E., Boiteux, L. S., Oloizia, B. B., y Simon, P. W. 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.
- Kirk, J., y Tilney-Bassett, R. 1978. *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd edn, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Kleinig, H., y Britton, G. 1982. Carotenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Veg.* 20:735–55.
- Krubasic P., y Sandmann G. 2000. Molecular evolution of lycopene cyclases involved in the formation of carotenoids with ionone end groups. *Biochemical Society Transactions* Volume 28, part 6.
- Kuchitsu, K., Tsuzuki, M., y Miyachi, S. 1988. Characterization of the Pyrenoid Isolated from Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*: Particulate Form of RuBisCO Protein. *Protoplasma* 144: 17-24.
- Kuhlbrandt, W., Wang, D., y Fujiyoshi, Y. 1994. Atomic model of light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367: 614-621.
- Kumagai, M. H., Keller, Y., Bouvier, F., Clary, D., y 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.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leung, J., y Giraudat, J. 1998. *Abscisic Acid Signal Transduction*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 199-222.
- Li, F., Vallabhaneni, R., y Wurtzel, L. 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiology*. 146: 1333-1345.
- Li, H., y Chiu C. 2010. Protein Transport into Chloroplasts. *Annual Review Plant Biology* 61: 157–80.
- Lindgren, O., Stalberg, K., y Höglund, A. 2003. Seed-specific overexpression of an endogenous arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiology* 132: 779-785 (2003).

- Lorenzo, Y., Azqueta, A., Luna, L., Bonilla, F., Domínguez, G., y Collins A. 2009. The carotenoid b-cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis* 30 (2): 308-314.
- Maass, D., Arango, J., Wüst, F., Beyer, P., y Welsch, R. 2009. Carotenoid Crystal Formation in *Arabidopsis* and Carrot Roots Caused by Increased Phytoene Synthase Protein Levels. *PLoS ONE* 4(7): e6373.
- Merril, C. R. 1990. Gel-staining techniques. In Deutscher MP (Ed) *Guide to protein purification. Methods in Enzymology*. Academic press Inc. volume 182: 50–68.
- Merzlyak, M. N. y Solovchenko, A.E. 2002. Photostability of pigments in ripening apple fruit: a possible photoprotective role of carotenoids during plant senescence. *Plant Sci.* 163: 881–888.
- Milborrow, B. 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 52 (359): 1145-1164.
- Moreno, J. C. 2010. Evaluación de la funcionalidad de la licopeno β -ciclase de *Daucus carota* L. (zanahoria) mediante complementación heteróloga. Seminario de título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Murashige, T, y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Nambara, E., y Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Revision in Plant Biology* 56: 165-185.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: 45.
- Pecker, I., Gabbay, R., Cunningham, F., y Hirschberg, J. 1996. Cloning and characterization of the cDNA for lycopene-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology* 30: 807–19.
- Peter G., Thornber J. 1991. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem I1 light-harvesting pigment proteins. *Journal of Biology Chemistry*. 266: 16745-16754.
- Pizarro, L., y Stange C. 2009. Light dependent regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Ciencia e Invest Agr* 36: 143-162.
- Ralley, L., Enfissi, E. M., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P.M., y Fraser P. D. 2004. Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *Plant J* 39:477-486.

- Rock, C., y Zeevart, J. 1991. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7496–7499.
- Rodríguez-Villalón, A., Gas, E., y 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.
- Römer, S., y Fraser, P. 2005. *Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation*. *Planta* 221: 305-308.
- Ronen, G., Carmel, G., Zamir, D., y Hirschberg J. 2000. An alternative pathway in the β -carotene formation in plants chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato. *Prot. Natl. Acad. Sci.*, 97 (20): 11102-11107.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B., y Guiliano G. 2000. Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant Journal*, 24 (3): 413-419.
- Samba Mialoundama, A., Heintz, D., Jadid, N., Nkeng, P., Rahier, A., Deli, J., Camara, B., y Bouvier, F. 2010. Characterization of Plant Carotenoid Cyclases as Members of the Flavoprotein Family Functioning with No Net Redox Change. *Plant Physiology*, July 2010, Vol. 153, pp. 970–979.
- Schmidt, G. W., y Mishkindl, M. L. 1986. The transport of proteins into chloroplasts. *Ann. Rev. Biochem.* 1986. 55:879-912.
- Schnurr, G., Misawa, N., y Sandmann, G. 1996. Expression, purification and properties of lycopene cyclase from *Erwinia uredovora*. *Biochem. J.* 315, 869-874.
- Schofield, A., y Paliyath, G. 2005. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiol Biochem* 43:1052-1060.
- Shewmaker, C. K., Sheehy, J. A., Daley, M., Colburn, S., y Yang Ke, D. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20, 401-412.
- Simkin, A. J., Zhu, C., Kuntz, M., y Sandmann, G. 2003. *Light-dark regulation of carotenoid biosynthesis en pepper (Capsicum annuum) leaves*. *Journal of Plant Physiology* 160, 439-443.
- Simon, P., y Wolff, X. 1987. Carotenes in Typical and Dark Orange Carrots. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 35, No. 6.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A., y Hawes, C. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols.* 1 (4): 2019-2025.

- Steinmuller, D., y Tevini, M. 1985. Composition and function of plastoglobuli. *Planta* 163: 201–207.
- Stange, C., Fuentes, P., Handford, M., y Pizarro, L. 2008. *Daucus carota* as a novel model to evaluate the effect of light on carotenogenic gene expression. *Biol. Res.* 41: 289-301.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., y Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal* 54: 733-749.
- Tao, R., Uratsu, S. L., y Dandekar, A. M. 1995. Sorbitol Synthesis in Transgenic Tobacco with Apple cDNA Encoding NADP-Dependent Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 36(3): 525-532.
- Vishnevetsky, M., Ovadis, M., y Vainstein, A. 1999. Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid associated proteins. *Trends in Perspectives.* 4: 232-235.
- Von Lintig, J., Welsch, R., Bonk, M., Giuliano, G., Batschauer, A., y 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.
- Yamamoto, H., y Bassi, R. 1996. Carotenoids: localization and function in Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, ed. DR Ort, CF Yocum, 539-563.
- Young, A. 1993. In *Carotenoids in Photosynthesis* A. J. Young and G. Britton (Eds.), 161-205, Chapman and Hall, London (1993).
- Wally, O., Jayaraj, J., y Punja, Z. K. 2008. Comparative expression of *b*-glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Rep* (2008) 27:279–287.
- Welsch, R., Wüst, F., Bär, C., Al-Babili, S., y Beyer, P. 2008. A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology.* 147: 367-380
- Woitsch, S., y Römer, S. 2003. Expression of xanthophylls biosynthetic genes during light-dependent chloroplast differentiation. *Plant Physiology.* 132: 1508-1517.
- Zhu, C., Gerjets, T., y 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

Tabla VI. Cuantificación de pigmentos de las líneas transgénicas de tabaco transformadas con las construcciones pGWB2/*lcyb1* y pMDC32/*lcyb1*.

Hoja pGWB2 <i>lcyb1</i>	Expresión relativa <i>lcyb1</i>	Concentración carotenoides (µg/g PS)	Aumento carotenoides (%)	Concentración β-caroteno (µg/g PS)	Aumento β-caroteno (%)
wt	1 ± 0,01	337,4 ± 14,6	-----	286,9 ± 12,3	-----
L2	246,5 ± 27*	847,4 ± 303,2	151,14*	289,2 ± 140,7	0,8
L3	190,4 ± 17*	222,1 ± 58,4	-34,16*	84,8 ± 28,8	-70,4*
L11	349,4 ± 70*	347,5 ± 147,5	3	121,2 ± 54,2	-57,7*
L14	296,3 ± 3*	2314,2 ± 47,5	585,4*	803,6 ± 58,3	180,1*
L15	27,7 ± 0,7*	2081,5 ± 235,4	516,87*	808 ± 80,1	181,6*
L16	42,8 ± 2,2*	2588,8 ± 250	667,20*	1030,5 ± 61,8	259,1*
Hoja pMDC32 <i>lcyb1</i>	Expresión relativa <i>lcyb1</i>	Concentración carotenoides (µg/g PS)	Aumento carotenoides (%)	Concentración β-caroteno (µg/g PS)	Aumento β-caroteno (%)
wt	1 ± 0,03	337,4 ± 14,6	-----	286,9 ± 12,3	-----
L2	26,9 ± 0,13*	355,90 ± 81	5,5	306,64 ± 70,2	6,9
L3	105,4 ± 32*	362,32 ± 32,8	7,4	289,64 ± 37,9	0,9
L4	46,5 ± 5,9*	375,96 ± 99,9	11,4	356,5 ± 110,1	24,2
L5	13,4 ± 3,2*	365,65 ± 21,3	8,4	287,67 ± 12,34	0,25
L6	64 ± 4,3*	1012,6 ± 213,3	226,2*	893,78 ± 201,2	211,5*
L15	130,7 ± 18*	445,78 ± 33,3	32,1*	367,89 ± 7,67	28,2*

*: Indican si el aumento (o disminución) producido es significativo.

Tabla VII. Cuantificación de los niveles de expresión, carotenoides totales y β -caroteno en hojas y raíces de las líneas transgénicas de zanahoria transformadas con la construcción pGWB2//*lcyb1*.

Hoja p2 <i>lcyb1</i>	Expresión relativa <i>lcyb1</i>	Expresión (%)	Niveles carotenoides ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento carotenoides (%)	Niveles β -caroteno ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento β -caroteno (%)
wt	1,0 \pm 0,03	-----	381,4 \pm 35,2	-----	239,6 \pm 23,8	-----
L1	1,3 \pm 0,07	28*	532,1 \pm 35,4	39,5*	344,9 \pm 19,6	44*
L2	1,4 \pm 0,06	44,5*	532,9 \pm 68,1	39,7*	329,3 \pm 44	37,5*
L3	2,2 \pm 0,02	119,5*	599,9 \pm 42,8	57,3*	363,2 \pm 43,2	51,8*
L4	-----	-----	588,4 \pm 85,3	54,3*	299,4 \pm 22,2	25*
L5	1,6 \pm 0,13	59,5*	685,2 \pm 50,1	79,7*	402,7 \pm 41,3	68,1*
L6	-----	-----	584 \pm 29,6	53,1*	342,8 \pm 26,6	43,11*
Raíz p2 <i>lcyb1</i>	Expresión relativa <i>lcyb1</i>	Expresión (%)	Niveles carotenoides ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento carotenoides (%)	Niveles β -caroteno ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento β -caroteno (%)
wt	1,0 \pm 0,01	-----	737,1 \pm 37,1	-----	448,4 \pm 13,1	-----
L1	2,4 \pm 0,15	136,7*	591,2 \pm 127	-19,8	392,8 \pm 87,8	-12,4
L2	1,1 \pm 0,01	7,0*	396,8 \pm 61,1	-46,2*	278,1 \pm 24,5	-38,1*
L3	0,6 \pm 0,01	-41,2*	197,6 \pm 9,8	-73,2*	141,1 \pm 8,3	-68,5*
L4	0,2 \pm 0,01	-75,4*	210,6 \pm 54,8	-71,4*	148,4 \pm 34,1	-66,9*
L5	0,2 \pm 0,01	-81,9*	184,6 \pm 36,3	-74,9*	142,1 \pm 23,7	-68,3*
L6	0,2 \pm 0,02	-80,4*	225,9 \pm 23,9	-69,3*	132,1 \pm 39,4	-70,5*

*: Indican si el aumento (o disminución) producido es significativo.

Tabla VIII. Cuantificación de los niveles de expresión, carotenoides totales y β -caroteno en hojas y raíces de las líneas transgénicas de zanahoria transformadas con la construcción pMDC32//*lcyb1*.

Hoja p32 <i>lcyb1</i>	Expresión relativa <i>lcyb1</i>	Expresión (%)	Niveles carotenoides ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento carotenoides (%)	Niveles β -caroteno ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento β -caroteno (%)
wt	1,0 \pm 0,03	-----	381,4 \pm 35,2	-----	239,6 \pm 23,8	-----
L1	1,2 \pm 0,03	16*	604,2 \pm 77,2	58,4*	427,1 \pm 84	78,3*
L3	3,7 \pm 0,04	273*	539,4 \pm 67,2	41,4*	243,2 \pm 37,2	1,5
L5	3,3 \pm 0,24	234*	582,2 \pm 78,5	52,7*	283,9 \pm 38,1	18,5
L6	2 \pm 0,33	101,5*	606,2 \pm 105	77,7*	538,7 \pm 82,1	124*
L8	3,8 \pm 0,70	276,5*	677,6 \pm 131	58,9*	536,6 \pm 96,4	124,9*
L9	7,7 \pm 0,40	665,5*	690,8 \pm 120	81,1*	604,8 \pm 111	152,5*
Raíz p32 <i>lcyb1</i>	Expresión relativa <i>lcyb1</i>	Expresión (%)	Niveles carotenoides ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento carotenoides (%)	Niveles β -caroteno ($\mu\text{g/g PS}$)	Aumento β -caroteno (%)
wt	1,0 \pm 0,01	-----	737,1 \pm 37,1	-----	448,4 \pm 13,1	-----
L1	1,9 \pm 0,04	89,9*	838,1 \pm 32,1	13,7*	608,8 \pm 18,7	35,8*
L3	0,4 \pm 0,06	-61,8*	491,6 \pm 165,4	-33,3	293,7 \pm 75,5	-34,5
L5	3,5 \pm 0,10	246,7*	721,6 \pm 8,8	-2,1	474,9 \pm 9,8	6,0*
L6	1,6 \pm 0,02	56,3*	1299 \pm 273,2	76,3*	901,9 \pm 201	101,1*
L8	2,2 \pm 0,07	116,1*	1040 \pm 160,4	41,2*	878,1 \pm 135	95,8*
L9	1,1 \pm 0,02	12,1*	822,1 \pm 33,1	11,5*	673,3 \pm 38,9	50,1*

*: Indican si el aumento (o disminución) producido es significativo.