

UCH-FC
MAG-B
A. 174
C. 1



Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

"Evaluación de la funcionalidad del gen fitoeno sintasa 2 (*DcPsy2*) de *Daucus carota* y su participación en la tolerancia al estrés salino en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*"

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Orlando Andrés Acevedo Acevedo

Marzo, 2014

Director de Tesis: Dra. Claudia Stange Klein

Co-Director de Tesis: Dr. Michael Handford



Facultad de Ciencias Universidad de Chile

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

Orlando Andrés Acevedo Acevedo

Ha sido aprobada por la comisión evaluadora de la Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de defensa Privada de Tesis rendido el 5 de Noviembre del 2013.

Director de Tesis

Dr. Claudia Renate Stange Klein

Codirector de Tesis

Dr. Michael Handford

Comisión de evaluación de la Tesis

Dr. Madeleine Lamborot

Dr. Marcelo Baeza



"Dedicada a mi familia y amigos de quienes recibí constante apoyo durante este importante proceso de desarrollo personal y científico. Un saludo muy especial para todos ellos".



Nací el día 3 de Julio de 1987 en la ciudad de Santiago. Mis estudios de enseñanza Media los realicé en el Instituto Nacional José Miguel Carrera en donde conocí a excelentes personas y amigos. En el año 2006 ingresé a la carrera de Biotecnología dado mi alto interés por el área científica. Luego de graduarme, comencé el desarrollo de esta tesis de Magíster logrando concretar importantes metas tanto a nivel personal como científico. Espero que en el futuro tales conocimientos y experiencias sigan creciendo y de esta manera realizar importantes aportes en el mundo de la Biología Vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a todo los integrantes de mi team CSK, en especial a la Doctora Claudia Stange, por su constante apoyo, consejos y reuniones con las cuales se logró aclarar aspectos fundamentales para el correcto desarrollo de esta Tesis de Magister. Además, agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio por su buena disposición y ayuda en diferentes tareas. Por otra parte, dar las gracias de manera particular a Daniel Laporte por su colaboración en la realización de algunos experimentos incluidos en este trabajo.

Gracias también a los profesores Michael Handford, Lorena Norambuena y Liliana Cardemil, por tener siempre la mejor disposición para ayudarme en lo que lo necesité. Muchas gracias también a la Ange y al Seba, por su esfuerzo y trabajo fundamental para el funcionamiento del laboratorio.

Por último, quiero agradecer en conjunto a todos los integrantes del laboratorio, pues considero que fueron un pilar fundamental en mi formación científica. Muchas gracias por su ayuda, compañerismo y simpatía y hacer que fuera un gusto trabajar en el laboratorio.

ÍNDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	1
1.1. Carotenoides: Estructura, función y principales características.....	1
1.2. Biosíntesis de carotenoides	4
1.3. Regulación de la síntesis de carotenoides.	7
1.3.1. Regulación de la expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo.	7
1.3.2. Regulación de la expresión de genes carotenogénicos por luz.....	8
1.3.3. Regulación de la expresión de genes carotenogénicos por estrés abiótico...	9
1.4. Participación del gen fitoeno sintasa (<i>Psy</i>) en la síntesis de carotenoides	10
1.5. Participación del gen <i>Psy</i> en la tolerancia al estrés abiótico	13
1.6. Importancia del gen <i>DcPsy2</i> en la ruta carotenogénica de <i>Daucus carota</i>	15
1.7. Estrategia a utilizar	17
1.8. Hipótesis	19
1.9. Objetivos.....	20
1.9.1. Objetivo General.	20
1.9.2. Objetivos Específicos.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Reactivos	21
2.2. Material biológico y condiciones de cultivo.....	21
2.3. Métodos de biología molecular	22
2.3.1. Extracción del DNA genómico de las plantas de tabaco transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	22
2.3.2. Determinación de la transgénesis de las plantas de tabaco transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	23
2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	23
2.3.4. Purificación del ARN vegetal.....	24
2.3.5. Pureza y calidad del ARN vegetal	25
2.3.6. Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	26
2.3.7. PCR en Tiempo Real	27

2.4.	Determinación de la cantidad y composición de carotenoides	29
2.4.1.	Extracción de carotenoides de las plantas de tabaco transgénicas	29
2.4.2.	Cuantificación de pigmentos totales mediante espectrofotometría.	31
2.4.3.	Determinación de la composición de carotenoides mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	31
2.5.	Tratamiento de plántulas transgénicas con el herbicida norflurazon (NFZ).	32
2.6.	Evaluación de la tolerancia a estrés salino de plantas transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	33
2.7.	Evaluación de los niveles de ABA en las plantas de <i>N. tabacum</i> transformadas con <i>DcPsy2</i> bajo tratamientos con NaCl.	33
RESULTADOS		36
3.1.	Determinación de la transgénesis de las líneas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	36
3.2.	Determinación de la expresión del gen <i>DcPsy2</i> en las plantas de <i>N. tabacum</i> transgénicas.	38
3.3.	Evaluación de la funcionalidad del gen <i>DcPsy2</i> mediante análisis bioquímico de las líneas transformadas.	40
3.4.	Determinación de los niveles de expresión del gen <i>DcPsy2</i> y genes carotenogénicos endógenos en las líneas transgénicas.....	43
3.5.	Determinación del contenido de fitoeno en plantas de tabaco transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	45
3.6.	Evaluación de la participación del gen <i>DcPsy2</i> en la tolerancia a estrés salino de plantas de <i>N. tabacum</i> transgénicas.....	50
3.7.	Determinación de los niveles de ABA en las plántulas de tabaco transgénicas en respuesta al tratamiento con NaCl.....	54
DISCUSIÓN		56
4.1.	Determinación de la transgénesis de las plantas de tabaco transformadas con el vector pGWB2/ <i>DcPsy2</i>	56
4.2.	Determinación de la expresión del gen <i>DcPsy2</i> en las plantas de tabaco transgénicas y su participación en la síntesis de carotenoides.	56
4.3.	Determinación de los niveles de expresión de genes carotenogénicos endógenos en las plantas de tabaco transgénicas.	61
4.4.	Determinación de la participación del gen <i>DcPsy2</i> en la síntesis de fitoeno.....	62
4.5.	Determinación de la participación del gen <i>DcPsy2</i> en la tolerancia al estrés por sal y la síntesis de ABA.....	65

CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	71
ANEXO	79
7.1. Programas de PCR y RT-PCR convencional empleados en este trabajo.....	79
7.2. Partidores utilizados en el presente trabajo.....	81
7.3. Determinación de los niveles de expresión del gen <i>DcPsy2</i> mediante RT-PCR semi-cuantitativo.....	83
7.4. Determinación de los niveles de clorofila en la generación T ₀ de plantas transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	84
7.5. Determinación del contenido de carotenoides en la generación T ₁ de plántulas transgénicas seleccionadas.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Cuantificación de fitoeno en las líneas de <i>N. tabacum</i> que expresan el gen <i>DcPsy2</i>	47
Tabla II. Programa de PCR convencional para amplificar el gen <i>18S</i>	79
Tabla III. Programa de PCR convencional para amplificar el gen <i>HptII</i>	79
Tabla IV. Programa de PCR convencional para amplificar el gen <i>DcPsy2</i>	79
Tabla V. Programa de RT-PCR convencional para la síntesis de ADNc.....	80
Tabla VI. Programa de RT-PCR en tiempo real	80
Tabla VII. Partidores empleados para la amplificación de los genes de interés mediante PCR y RT-PCR convencional.....	81
Tabla VIII. Partidores usados para la amplificación de fragmentos por RT-PCR cuantitativo en esta Tesis	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la biosíntesis de carotenoides en plantas	6
Figura 2. Amplificación de los genes, <i>HptII</i> , <i>DcPsy2</i> , y <i>18S</i> a partir del ADNg de las líneas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8 y S/I	37
Figura 3. RT-PCR del gen <i>18S</i> a partir del ADNc obtenido de las líneas transgénicas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8 y S/I	39
Figura 4. RT-PCR del gen <i>DcPsy2</i> de <i>D. carota</i> en las líneas transgénicas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8.....	40
Figura 5. Determinación del contenido de carotenoides en plantas transgénicas transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	42
Figura 6. Amplificación mediante PCR en tiempo real de genes carotenogénicos endógenos y del transgen <i>DcPsy2</i> en líneas de tabaco transformadas con el vector pGWB2 (S/I) y el vector <i>pGWB2/DcPsy2</i> (L3, L6 y L4).....	44
Figura 7. Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas sujetas a tratamiento con NaCl <i>in vitro</i>	51
Figura 8. Determinación de la sobrevivencia de plántulas transgénicas después de ser sometidas a estrés por sal con NaCl 250 mM	53
Figura 9. Determinación de los niveles de ABA en plantas de <i>N. tabacum</i> transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	55
Figura 10. Representación de la conexión entre la ruta carotenogénica y otras rutas metabólicas que tienen como precursor al GGPP.....	60
Figura S1. Determinación de los niveles de transcrito del gen <i>DcPsy2</i> en las plantas transformadas el vector pGWB2/ <i>DcPsy2</i> mediante RT-PCR semi-cuantitativo	83

Figura S2. Cuantificación de los niveles de clorofila en las plantas de tabaco transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	84
Figura S3. Determinación del contenido de carotenoides en la generación T ₁ de las plántulas transformadas con el gen <i>DcPsy2</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	:	Ácido abscísico
ADNc	:	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNg	:	ADN genómico
ADNp	:	ADN plasmidial
ARNm	:	Ácido ribonucleico mensajero
BLAST	:	Herramienta de alineamiento básico local
BSA	:	Proteína Seroalbúmina Bovina
C_t	:	Ciclo umbral por sobre la fluorescencia basal
CTAB	:	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DEPC	:	Dietil pirocarbonato
DNasa	:	Desoxi-ribonucleasa
dNTP	:	Desoxinucleótido trifosfato
EDC	:	1-Etill-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida
ELISA	:	Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas
GGPP	:	Geranil-geranil pirofosfato
h	:	horas
Kb	:	kilobase
MES	:	Acido 2-(<i>N</i> -morfolino)etanosulfónico

mg	:	miligramo
min	:	minutos
mL	:	mililitro
ng	:	nanogramos
NFZ	:	norflurazon
NHS	:	N-hidroxisulfosuccinimida
pb	:	pares de bases
PBS	:	Tampón fosfato salino
PCR	:	Reacción en cadena de la Polimerasa
pg	:	picogramos
pNPP	:	p-nitrofenil fosfato
PSY	:	Fitoeno Sintasa
RNAsa	:	Ribonucleasa
RT	:	Transcripción Reversa o transcriptasa reversa
μL	:	microlitro

RESUMEN

Los carotenoides son un grupo de compuestos lipídicos isoprenoides que derivan del metabolismo secundario y se caracterizan por otorgar atractivos colores a flores y frutos. Los carotenoides son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos y además por algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. En plantas los carotenoides participan en la captación de luz durante la fotosíntesis y también en la prevención del daño oxidativo generado bajo condiciones de estrés ambiental en paralelo a su función como precursores para la síntesis de ácido abscísico (ABA). En animales en tanto, a pesar de no existir síntesis de tales compuestos, los carotenoides cumplen un importante rol a nivel nutricional actuando como precursores de la vitamina A y como moléculas antioxidantes siendo esta última, una propiedad determinada por su particular estructura de dobles enlaces conjugados.

En plantas superiores la síntesis de carotenoides comienza con la generación de fitoeno a partir de 2 moléculas de geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) proceso realizado por la enzima fitoeno sintasa (PSY) cuya actividad representa un punto clave de regulación de la ruta. En *Daucus carota* (zanahoria), nuestro modelo de estudio, se han descrito dos genes *Psy* (*DcPsy1* y *DcPsy2*) ambos caracterizados por mostrar una expresión diferencial en hojas y raíz durante el desarrollo. Particularmente, para el caso del gen *DcPsy2* nuestros estudios realizados muestran una mayor expresión de dicho gen en el tejido fotosintético de plántulas de 4 semanas de edad; así como también un aumento significativo de su expresión durante el desarrollo de la raíz modificada caracterizado por un aumento significativo del contenido de carotenoides

totales. Además, observamos que la expresión de este gen carotenogénico es inducida frente a tratamientos con ABA, hecho que lo vincula probablemente con la respuesta a condiciones de sequía y salinidad. No obstante, a pesar de tener indicios acerca de la participación de este gen en la síntesis de carotenoides y el estrés abiótico, hasta la fecha no tenemos ninguna prueba de su funcionalidad. Con el propósito de iniciar la caracterización funcional del gen *DcPsy2* en organismos vegetales, desarrollamos el presente trabajo enfocado a comprobar la participación de este gen en la síntesis de carotenoides y la tolerancia a condiciones de salinidad. Para ello, se realizó el análisis bioquímico y molecular de un conjunto de líneas de *Nicotiana tabacum* que expresaban constitutivamente el gen *DcPsy2*, estrategia con la cual logramos establecer su funcionalidad en cuanto a la biosíntesis de carotenoides entre ellos fitoeno su producto directo. Paralelamente, algunas líneas transgénicas seleccionadas fueron sometidas a un ensayo de tolerancia a condiciones de salinidad encontrándose entre 2 a 3,6 veces más de sobrevivida en aquellas plántulas transformadas con *DcPsy2* en una directa correlación con la expresión del transgen y los niveles de la fitohormona ABA bajo tales condiciones. En consecuencia, los resultados obtenidos en el presente trabajo, indicaron que el gen *DcPsy2* es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum* contribuyendo tanto a la síntesis de carotenoides como al aumento de la tolerancia al estrés por salinidad lo que se relaciona, entre otros factores, con su participación en la síntesis de ABA.

ABSTRACT

Carotenoids are a group of lipidic isoprenoids compounds derived from secondary metabolism and distinguished by giving attractive colors to flowers and fruits. Carotenoids are synthesized by all photosynthetic organisms and some non-photosynthetic bacteria and fungi. In plants carotenoids participates in light harvesting during photosynthesis and in the prevention from oxidative damage under abiotic stress conditions in parallel with their function of serving as precursors for abscisic acid (ABA) biogenesis. In animals as well, although no synthesis of these compounds were achieved, carotenoids plays an important nutritional role by acting as a source of vitamin A and antioxidants molecules with the latter being a property governed by its characteristic conjugated double bond structure.

In higher plants carotenoid biosynthesis begins with the generation of phytoene from two molecules of geranylgeranyl pyrophosphate a process catalyzed by the phytoene synthase (PSY) enzyme, which activity represents a key regulatory point in the pathway. In *Daucus carota*, our study model system, there has been described two *Psy* genes (*DcPsy1* and *DcPsy2*) each one being characterized by its differential expression pattern during leaves and root development. In particular, for the case of *DcPsy2* gene, our previous work showed that there is a high expression of this gene in leaves of carrots seedlings at 4 weeks of development and also a significant increase in its expression during modified root development, a process distinguished by a significant increase in the total carotenoid content. Moreover, we observed that *DcPsy2* gene expression is induced after ABA treatment, a fact that probably links its gene with

the response to drought and salinity conditions. However, despite of having some indications about *DcPsy2* gene function in carotenoid biosynthesis and abiotic stress response; to date no evidence about its functionality has been reported. Therefore, with the purpose of begin with the functional characterization of *DcPsy2* gene we have developed the present work focused in demonstrate the *DcPsy2* gene involvement in carotenoid biosynthesis as well as in salt tolerance. In order to meet our purpose, we perform a suitable strategy concerning the biochemical and molecular analysis of several *N. tabacum* lines showing constitutive expression of *DcPsy2* gene which bring us an evidence about the participation of *DcPsy2* gene in synthesis of coloured carotenoids and phytoene its direct product. In parallel, some selected transgenic lines were subjected to a salinity tolerance assay in which we found between 2 and 3,6 fold increases on survival rates of *DcPsy2* transformed lines over control ones after salt treatment, in a direct correlation with transgen expression and ABA levels accumulated under these conditions. In conclusion, the results of the present work showed that *DcPsy2* gene is functional in the model system *N. tabacum* by playing an important role in carotenoid biosynthesis as well as in enhancing the tolerance under salt stress, a behavior related, among other possible reasons, with their involvement in ABA synthesis.

INTRODUCCIÓN

1.1. Carotenoides: Estructura, función y principales características

Los carotenoides son una clase de pigmentos isoprenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza (Cazzonelli y *cols.*, 2010; Christaki y *cols.*, 2012). Estas moléculas están formadas por una cadena de polieno constituida por 40 átomos de carbono y hasta 15 enlaces conjugados (Isaacson y *cols.*, 2002). La presencia de estas numerosas insaturaciones confiere a los carotenoides la capacidad de actuar como cromóforos, es decir como moléculas capaces de absorber luz y generar color (Christensen y *cols.*, 2004; Polli y *cols.*, 2004).

De acuerdo a su estructura química, los carotenoides se dividen en 2 grupos: Los carotenos, formados solo por átomos de carbono e hidrógeno, y las xantófilas que además poseen sustituyentes oxigenados. Algunos ejemplos de la primera clasificación son las moléculas de α y β -caroteno de gran interés comercial debido a sus propiedades antioxidantes y su participación como precursores de la vitamina A en animales (Young y *cols.*, 2001; Nagao, 2009). En relación a las xantófilas, algunos de los ejemplos son la luteína, zeaxantina y anteraxantina que cumplen un importante rol biológico en la disipación del exceso de energía lumínica durante la fotosíntesis (Siefermann-Harms, 1990; Golovko y *cols.*, 2012).

Los carotenoides son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas y cianobacterias) y algunas bacterias y hongos no fotosintéticos. En plantas y algas los carotenoides son sintetizados en los plastidios, principalmente en cloroplastos y cromoplastos. En los cloroplastos, presentes en tejido fotosintético, los

carotenoides en conjunto con otros pigmentos tales como la clorofila *a* y *b*, se localizan y acumulan en las membranas tilacoidales (Apel *y cols.*, 2009; Guo *y cols.*, 2009), situándose tanto en los centros de reacción de los fotosistemas I y II como en los complejos captadores de luz (CCL) (Ruban *y cols.*, 1994; Lee *y cols.*, 1995). En ambos lugares los carotenoides actúan como pigmentos accesorios absorbiendo luz en un amplio rango del espectro azul (400-500 nm) para luego transferir la energía absorbida a la clorofila *a* durante la fotosíntesis (Dall'Osto *y cols.*, 2007; Bode *y cols.*, 2009). Además, los carotenoides desempeñan un papel fotoprotector en condiciones de exceso de luz a través del denominado ciclo de las xantófilas (Siefermann-Harms, 1990; Havaux *y cols.*, 1997; Ruban *y cols.*, 2002). Asimismo, los carotenoides son capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno producidas durante diversos clases de estrés abiótico tales como salinidad y luz ultravioleta (UV) (Gotz *y cols.*, 2002; Borghesi *y cols.*, 2011; Cidade *y cols.*, 2012).

En relación a los tejidos no fotosintéticos, se ha reportado que los carotenos y xantófilas se acumulan en cuerpos lipídicos o en estructuras cristalinas presentes en los cromoplastos de flores y frutas (Ampomah-Dwamena *y cols.*, 2009; Kopsell *y cols.*, 2009). En esta clase de órganos, los carotenoides cumplen un importante función biológica pues brindan atractivos colores a flores y frutos haciéndolos llamativos para organismos polinizadores (Bouvier *y cols.*, 2005; Tanaka *y cols.*, 2008).

Por otro lado, los carotenoides son precursores de la fitohormona ácido abscísico (ABA) involucrada en diversos procesos del desarrollo y respuestas al estrés ambiental (Rock *y cols.*, 1991; Barrero *y cols.*, 2008; Galpaz *y cols.*, 2008; Welsch *y cols.*, 2008). Procesos biológicos tales como la dormancia de semillas, maduración y diferenciación de células vegetales embrionarias y la respuesta adaptativa a distintas clases de estrés

abiótico están regulados por esta hormona (Verslues y cols., 2006; Galpaz y cols., 2008; Khandelwal y cols., 2010).

En el caso de los animales, los carotenoides están involucrados en la pigmentación y nutrición. Por ejemplo, el cetocarotenoide astaxantina es responsable del color anaranjado de la carne de salmón y los caparazones de la langosta (McGraw y cols., 2004; Wade y cols., 2009). En la nutrición humana algunos pigmentos carotenoides (por ejemplo β -caroteno, α -caroteno o criptoxantina) son convertidos a vitamina A después de ser clivados y reducidos. Además, funcionan como poderosos antioxidantes y su consumo ha sido asociado a una reducción en las probabilidades de desarrollar ciertos tipo de cáncer, enfermedades vasculares y trastornos visuales (Krinsky y cols., 2005)

Sin embargo, salvo algunas excepciones (Moran y cols., 2010), los animales no pueden sintetizar carotenoides, los cuales son una fuente esencial de retinoides y vitamina A, debiendo ser incorporados en la dieta a través de las frutas y verduras (Fierce y cols., 2008; Rehak y cols., 2008).

Dada la importancia de los carotenoides para la salud animal y vegetal, la regulación de la biosíntesis de carotenoides ha sido estudiada por los últimos 40 años tanto a nivel básico como aplicado y la mayoría de los genes carotenogénicos, en diversas especies de plantas, han sido identificados y caracterizados (Cunningham y cols., 1998). El conocimiento adquirido por estos estudios ha sido utilizado para aumentar el valor nutricional de múltiples organismos vegetales a través del incremento en el contenido de carotenoides basado en la manipulación de los niveles de transcrito

de algunos genes carotenogénicos (Shewmaker y cols., 1999; Diretto y cols., 2007; Fraser y cols., 2007; Aluru y cols., 2008).

1.2. Biosíntesis de carotenoides

La ruta de biosíntesis de carotenoides se encuentra altamente conservada y la mayoría de los genes involucrados en este proceso han sido descritos (Cunningham y cols., 1998; Zhu y cols., 2004).

Los genes carotenogénicos se localizan en el genoma nuclear y una vez que los productos génicos son sintetizados, las proteínas traducidas son destinadas a los plastidios como pre-proteínas, lugar en que se modifican post-traduccionalmente a través del corte proteolítico de su extremo amino-terminal que funciona como una señal de destinación e importación a estos organelos (Soll y cols., 2004). La biosíntesis de carotenoides ocurre en los plastidios y comienza con la unión cola-cola de dos moléculas de GGPP que dan origen al fitoeno un compuesto incoloro de 40 carbonos. Este paso es catalizado por la enzima fitoeno sintasa (PSY) cuya actividad ha sido descrita como un punto clave de regulación en la ruta carotenogénica (von Lintig y cols., 1997; Lois y cols., 2000; Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Rodriguez-Villalon y cols., 2009). La síntesis continúa con una serie de desaturaciones e isomerizaciones sobre la molécula de fitoeno para producir el pigmento licopeno de color rojo. Estas reacciones son catalizadas por la fitoeno desaturasa (PDS) que forma ζ -caroteno a partir de fitoeno, ζ -caroteno desaturasa (ZDS) la cual sintetiza pro-licopeno a partir de ζ -caroteno y la caroteno isomerasa (CRTISO) que transforma el pro-licopeno en licopeno. A continuación, el licopeno es transformado en diferentes moléculas bicíclicas. La enzima licopeno β -ciclaza (LCYB), convierte el licopeno en β -caroteno y la acción conjunta de las enzimas licopeno ϵ -ciclaza (LCYE) y LCYB dan origen al α -

caroteno. El β -caroteno es utilizado como sustrato por la enzima β -caroteno hidroxilasa ($C\beta Hx$) para producir zeaxantina, mientras que la hidroxilación del α -caroteno por la ϵ -caroteno hidroxilasa ($C\epsilon Hx$) y $C\beta Hx$ resulta en la formación de luteína. Posteriormente, la zeaxantina es convertida en violaxantina por acción de la zeaxantina epoxidasa (ZEP) y esta última es la molécula precursora para la síntesis de ABA, que ocurre en el citoplasma (Seo y cols., 2002; Zhu y cols., 2010). En las plantas, esta hormona deriva de precursores carotenogénicos del tipo 9-*cis* epoxicarotenoides al cual pertenecen los compuestos 9-*cis* violaxantina y 9-*cis* neoxantina (Figura 1). Estas moléculas de 40 carbonos son clivadas por las enzimas 9-*cis* epoxicarotenoides-dioxigenasas (NCEDs) dando origen a la xantoxina que posteriormente es convertida en ABA a través de 2 pasos de oxidación (Seo y cols., 2002; Nambara y cols., 2005).

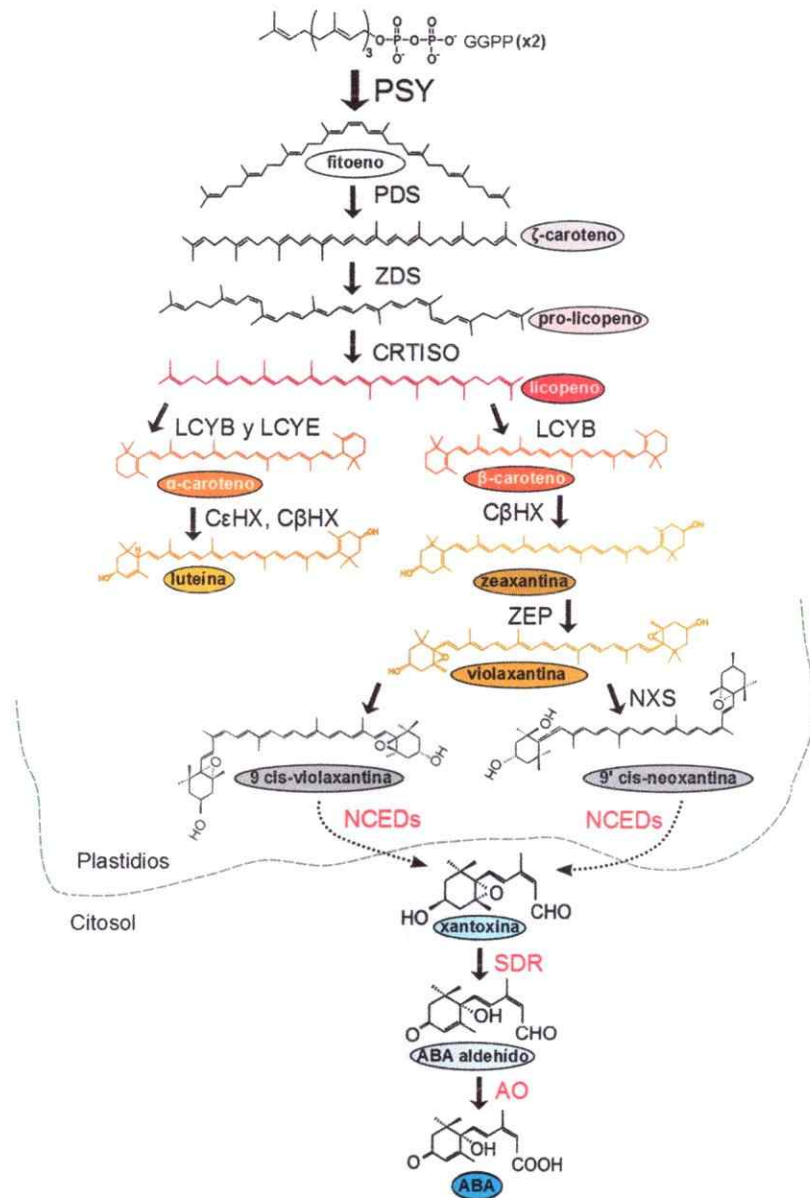


Figura 1. Representación de la biosíntesis de carotenoides en plantas. En color negro se muestran las enzimas y principales productos de la ruta carotenogénica. Las enzimas que participan en la biosíntesis de carotenoides son: PSY: fitoeno sintasa, PDS: fitoeno desaturasa, ZDS: ζ-caroteno desaturasa, CRTISO: caroteno isomerasa, LCYE: licopeno ε-ciclaza, LCYB: licopeno β-ciclaza, CβHx: β-caroteno hidroxilasa, CεHx: ε-caroteno hidroxilasa ZEP: zeaxantina epoxidasa y NXS: Neoxantina sintasa. En rojo se indican las enzimas que participan en la biosíntesis de ABA; NCEDs: 9-cis epoxicarotenoides dioxigenasas, SDR: Dehidrogenasa/Reductasa de cadenas isoprenoides cortas, AO: Aldehído oxidasa. Extraído y modificado de Mitsunori Seo y cols, 2002; Changfu Zhu y cols, 2010.

1.3. Regulación de la síntesis de carotenoides.

La regulación a nivel transcripcional ha sido propuesta como el principal punto de control de la ruta carotenogénica. Entre los factores más estudiados, capaces de regular la expresión de los genes carotenogénicos, se encuentra el proceso de desarrollo, la luz y el estrés abiótico. (Bramley, 2002; Howitt y cols., 2006; Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Tanaka y cols., 2008; Welsch y cols., 2008; Ito y cols., 2009). Asimismo, algunos reportes recientes también han sugerido que algunos productos de la ruta carotenogénica y enzimas modificadoras de la cromatina tienen la capacidad de modular dicha expresión (Cazzonelli y cols., 2009; Kachanovsky y cols., 2012)

1.3.1. Regulación de la expresión de genes carotenogénicos durante el desarrollo.

El desarrollo de órganos vegetales tales como flores y frutos se caracteriza por presentar un cambio de morfología, tamaño y coloración a lo largo de su maduración. Al respecto, existe una correlación directa entre la expresión de los genes carotenogénicos *Psy* y *Lcyb* y la síntesis de carotenoides en las variedades de color naranja de damascos (Kita y cols., 2007) y cítricos (Kato y cols., 2004). En frutos de tomate, el aumento masivo de licopeno que ocurre durante su desarrollo se correlaciona con el perfil de expresión diferencial de algunos genes carotenogénicos. A lo largo de este proceso, los niveles de transcrito de los genes *Psy1*, *Pds*, *Zds*, y *Crtiso* aumentan de manera significativa (Fraser y cols., 1994) mientras que los genes *Lcyb* y *Lcye* dejan de transcribirse (Ronen y cols., 1999). Este perfil de expresión origina una disminución de las actividades licopeno β y ϵ -ciclasa que favorecen la acumulación del respectivo precursor, licopeno.

1.3.2. Regulación de la expresión de genes carotenogénicos por luz.

En relación a la regulación por luz, se ha descrito que durante el proceso de de-etiolación, que ocurre cuando las plantas emergen del suelo luego de germinar, ocurre un incremento significativo de los niveles de transcrito del gen *Psy* que se correlaciona directamente con el aumento en los niveles de carotenoides y clorofila, fundamentales para el desarrollo de un metabolismo fotosintético (Rodríguez-Villalón y cols., 2009; Toledo-Ortiz y cols., 2010; Ruiz-Sola y cols., 2012). Este dramático cambio en los niveles de carotenoides va acompañado por la diferenciación de los etioplastos (la clase de plastidios presentes en oscuridad) en cloroplastos. A nivel molecular, esta regulación está integrada por factores de transcripción del tipo PIF (por sus siglas en inglés Phytochrome Interacting Factors) que se unen directamente a elementos en *cis* presentes en el promotor de *Psy* denominados G-BOX. En ausencia de luz, los altos niveles de PIFs reprimen la expresión del gen *Psy* lo cual se traduce en bajos niveles de carotenoides y la prevención del desarrollo fotomorfogénico (Toledo-Ortiz y cols., 2010). Adicionalmente, los estudios realizados sugieren que la acumulación de estos factores de transcripción en condiciones de oscuridad podría participar en la reducción de los niveles de transcrito de otros genes carotenogénicos y algunos involucrados en la síntesis de clorofila y el desarrollo de los cloroplastos (Moon y cols., 2008; Stephenson y cols., 2009; Toledo-Ortiz y cols., 2010). Cuando ocurre la transición de oscuridad a luz los niveles de PIFs se reducen drásticamente tras su degradación al interactuar con moléculas de fitocromos fotoactivados (Castillon y cols., 2007; Bae y cols., 2008; Leivar y cols., 2008). Esto desencadena la biosíntesis coordinada de carotenoides y clorofila en paralelo con la producción de los componentes del aparato fotosintético y la diferenciación de los plastidios (Ruiz-Sola y cols., 2012).

1.3.3. Regulación de la expresión de genes carotenogénicos por estrés abiótico.

En relación al estrés abiótico, se ha descrito que la expresión de uno de los parálogos del gen *Psy* de plantas monocotiledóneas (arroz y maíz), específicamente el gen *Psy3*, puede ser inducido en respuesta a condiciones tales como la salinidad y el déficit hídrico (Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch y cols., 2008) que actualmente se consideran como algunas de las principales causas que limitan el crecimiento y desarrollo vegetal (Tuteja, 2007). El incremento en los niveles de *Psy3* bajo estas condiciones de estrés ambiental conduce a un aumento considerable en los niveles de la fitohormona ABA caracterizada por integrar una compleja red de transducción de señales que permite la inducción de genes involucrados con el cierre estomático y la síntesis de enzimas con capacidad antioxidante (Finkelstein y cols., 2002). Considerando que esta fitohormona cumple un importante papel en la tolerancia al estrés abiótico, la caracterización de los mecanismos que regulan su biosíntesis y acumulación han sido un foco central de estudio. Los estudios realizados indican que el incremento en los niveles de transcrito de *Psy3* de plantas monocotiledóneas en respuesta a estrés por sal estaría mediado por un mecanismo de retroalimentación positiva regulado por ABA (Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch y cols., 2008). De esta manera el control del flujo metabólico hacia la síntesis de carotenoides podría ser capaz de regular también los niveles de ABA producidos en respuesta a una condición de estrés abiótico. Este hecho ha motivado el desarrollo de diferentes estrategias para incrementar los niveles de ABA en plantas y de esta manera aumentar la tolerancia a éstos (Luchi y cols., 2001; Qin y cols., 2002; Zhang y cols., 2009; Cidade y cols., 2012).

1.4. Participación del gen fitoeno sintasa (*Psy*) en la síntesis de carotenoides

La primera reacción involucrada directamente con la síntesis de carotenoides comprende la participación de la enzima fitoeno sintasa (PSY) y ha sido propuesta como una enzima clave en la ruta carotenogénica (Hirschberg, 2001; Giuliano y cols., 2008; Cazzonelli y cols., 2010).

En plantas, la enzima fitoeno sintasa fue purificada por primera vez desde cromoplastos de *Capsicum annuum* (Dogbo y cols., 1988). Posteriormente, en frutos de tomate, se identificó una fitoeno sintasa funcional mediante complementación heteróloga en bacterias (Bartley y cols., 1992). Un año después, se identificó y caracterizó el transcrito de un segundo gen *Psy*: *Psy2* en hojas de tomate (Bartley y cols., 1993).

A través de los años, el gen *Psy* ha sido estudiado y caracterizado en distintas especies tales como *Arabidopsis thaliana* (Scolnik y cols., 1994), maíz (Buckner y cols., 1996), melón (Karvouni y cols., 1995), narciso (Schledz y cols., 1996), pimentón (Romer y cols., 1993), tomate (Bartley y cols., 1992; Bartley y cols., 1993) entre otras plantas superiores. Interesantemente, los diversos estudios realizados han indicado que en múltiples especies vegetales existe más de un gen *Psy*, como es el caso de *N. tabacum* (tabaco) *Solanum lycopersicum* (tomate) *Zea mays* (maíz) y *Oryza sativa* (arroz), entre otras (Bartley y cols., 1993; Busch y cols., 2002; Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch y cols., 2008). En el caso del tomate por ejemplo, se han descrito 2 genes *Psy*: *SIPsy1* y *SIPsy2*. Ambos se caracterizan por mostrar una expresión diferencial en los distintos órganos. El gen *SIPsy1*, se expresa principalmente en frutos, mientras que su parálogo *SIPsy2* lo hace preferentemente en hojas y flores. (Bartley y cols., 1993; Fraser y cols., 1999; Giorio y cols., 2008). Una

situación similar ocurre en las especies vegetales de arroz y maíz en donde se han descrito 3 parálogos de *Psy*. En ambas especies, los genes *Psy1* y *Psy2* son inducidos por luz en tejido fotosintético mientras que *Psy3* aumenta su expresión bajo condiciones de estrés hídrico y tratamientos con ABA (Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch y cols., 2008). Esta característica de los genes *Psy* ha sugerido una diversidad funcional de los distintos genes presentes en algunas especies vegetales.

Considerando que la actividad de la enzima PSY es capaz de controlar y dirigir el flujo metabólico de carbono hacia la síntesis de carotenoides desde otras rutas metabólicas (Fray y cols., 1995; Burkhardt y cols., 1997), la manipulación de los niveles de transcrito de los genes que la codifican ha sido una de las estrategias empleadas con el fin de aumentar el contenido de carotenoides en organismos vegetales. Al respecto, se ha reportado que un aumento en los niveles de transcrito del gen *Psy* puede conducir a un incremento en los niveles de carotenoides en órganos que se caracterizan por presentar mayoritariamente cromoplastos, como es el caso de flores y frutos, o bien en aquellos que no están expuestos de manera natural a la luz solar tal como ocurre con las semillas o las raíces. En particular, se ha postulado y descrito que una mayor capacidad de síntesis de carotenoides en esta clase de órganos (que eventualmente tiene lugar cuando se incrementan los niveles de transcrito del gen *Psy*) conduce a su mayor acumulación debido al secuestro de estos particulares productos de la ruta carotenogénica en estructuras de tipo cristalino y cuerpos lipídicos lo cual favorece su estabilidad (Maass y cols., 2009). De esta manera, en *Brassica napus* por ejemplo, la expresión heteróloga y semilla-específica del gen *CrtB* (homólogo de *Psy* en bacterias) logró aumentar hasta en 50 veces el contenido de carotenoides totales que normalmente se acumula en las semillas (Shewmaker y cols., 1999). De manera

similar, la expresión semilla-específica del gen *AtPsy* en *A. thaliana* consiguió aumentar hasta en 43 veces el contenido de β -caroteno de dicho órgano (Lindgren y cols., 2003) mientras que su expresión constitutiva condujo a un aumento de hasta 100 veces en el contenido de carotenoides observado en las raíces (Maass y cols., 2009).

Sin embargo, en tejidos fotosintéticos en donde la principal clase de plastidios corresponde a cloroplastos, se ha reportado que un incremento en los niveles de transcrito del gen *Psy* no va siempre acompañado con un incremento en los niveles de carotenoides. Tal es el caso de *N. tabacum* en donde la expresión aumentada y constitutiva de los genes endógenos *NtPsy1* o *NtPsy2*, cuya funcionalidad fue también confirmada mediante la estrategia de silenciamiento génico, ocasionó un aumento en los niveles de carotenoides, en la mayoría de los casos, sólo en aquellas líneas que presentaron un aumento en los niveles de clorofila. (Busch y cols., 2002). En contraste, aquellas líneas en las que la acumulación de este pigmento se mantuvo o bien disminuyó respecto a plantas silvestres (manteniéndose siempre por sobre un nivel crítico) registraron niveles de carotenoides inalterados respecto a plantas silvestres. Por último, aquellas líneas que presentaron una disminución significativa del contenido de clorofila (por debajo del nivel crítico antes mencionado) se caracterizaron por presentar menores niveles de carotenoides totales que plantas control. Esto último, está en acuerdo con reportes previos en los que se ha postulado que la síntesis y acumulación de carotenoides y clorofilas en las hojas son procesos co-regulados (Hartel y cols., 1997; Härtel y cols., 1998; Cheminant y cols., 2011; Meier y cols., 2011).

Por otro lado, estudios previos realizados en el laboratorio respecto a la funcionalidad del gen carotenogénico *DcPsy1* en plantas, cuya funcionalidad fue demostrada en un modelo bacteriano (Carvajal, 2010) mostraron que la expresión

constitutiva de este gen en *N. tabacum* condujo a niveles aumentados de carotenoides solo en las líneas transgénicas que presentaron la más baja expresión del transgen y adicionalmente niveles significativamente aumentados de clorofila. Por el contrario, aquellas líneas con un nivel intermedio de expresión y un contenido inalterado o incluso mayor de clorofila, mostraron menores niveles de carotenoides totales, mientras que aquellas con una alta expresión y una considerable disminución en los niveles de este pigmento se caracterizaron por presentar un menor contenido de carotenoides totales respecto a plantas silvestres (Acevedo, 2011). En consecuencia, los antecedentes disponibles sugieren que la acumulación de carotenoides en el tejido fotosintético es un proceso que está modulado, entre otros factores, tanto por la acumulación de clorofila como por el nivel de expresión del gen *Psy*.

1.5. Participación del gen *Psy* en la tolerancia al estrés abiótico

Diversos estudios han señalado el importante rol de la ruta carotenogénica en la respuesta adaptativa a condiciones de estrés ambiental (Qin y cols., 2002; Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch y cols., 2008; Zhang y cols., 2008). Particularmente, la atención se ha centrado en la condición de salinidad pues es considerada una de las principales causas de pérdida en la productividad de la industria agrícola (Jakab y cols., 2005; Mittler, 2006; Tuteja, 2007). Desde un punto de vista biofísico se ha descrito que una célula vegetal puede expandirse a una tasa reducida bajo condiciones de estrés salino debido a una menor captación de agua y minerales en conjunto con la toxicidad que ejercen los iones presentes en la sal (Cosgrove, 1993). En relación con lo anterior, cabe mencionar que se distinguen múltiples mecanismos por los cuales se manifiesta el efecto adverso de esta clase de estrés abiótico. En primer lugar, la salinidad ejerce un efecto osmótico que disminuye la



disponibilidad de agua en el suelo, y que es necesaria para el crecimiento celular, a través de una disminución del potencial hídrico (Fricke y cols., 2002; Munns, 2002). En segundo lugar, disminuye la absorción de algunos minerales requeridos para el normal desarrollo debido al efecto competitivo que ejercen los iones presentes en la sal (Hasegawa y cols., 2000). Por último, se ha descrito que los iones Na^+ y Cl^- , presentes de manera importante en suelos salinos, pueden ocasionar efectos tóxicos en las células vegetales mediante la inhibición de enzimas esenciales para el metabolismo, la disrupción de componentes de la membrana plasmática y la generación de estrés oxidativo a causa de un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jacoby, 1994; Dat y cols., 2000). En conjunto, los diferentes efectos perjudiciales de la salinidad conducen a un menor crecimiento y sobrevivencia de los organismos vegetales lo cual disminuye de manera significativa su productividad (Maas y cols., 1989; Romero-Aranda y cols., 2001).

Actualmente, se sabe que la expresión de algunos genes carotenogénicos *Psy*, es inducida bajo esta condición desfavorable generando un gran aumento en los niveles de la hormona ABA mediante un mecanismo de retroalimentación positiva (Li, Vallabhaneni y Wurtzel, 2008; Welsch y cols., 2008; Arango y cols., 2010). La vital importancia de esta hormona en la respuesta a la salinidad, está dada por su capacidad de inducir el cierre de los estomas minimizando la pérdida de agua por transpiración (Davies y cols., 1991). Además el ABA induce la expresión de genes relacionados con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno contribuyendo a disminuir el daño oxidativo generado por la deficiencia de agua (Zhang y cols., 2007).

Las múltiples evidencias de la participación central de *Psy* en la síntesis de carotenoides y ABA han situado este gen como uno de los blancos biotecnológicos

para aumentar la tolerancia a estrés salino de algunos organismos vegetales. De esta manera por ejemplo, se demostró que la expresión constitutiva de uno de los genes *Psy* del alga halófila *Salicornia europaea* en *A. thaliana* fue capaz de aumentar la tolerancia al estrés salino (Han y cols., 2008). En este caso, se sugirió que la mayor tolerancia de las líneas obtenidas se debía a la mayor actividad de algunas enzimas capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS) que fue favorecida por la expresión del transgen. Paralelamente, se hipotetizó que un aumento en el contenido de carotenoides producto de la expresión constitutiva de *Psy*, neutralizaría significativamente el daño oxidativo que ocurre frente a esta clase de estrés.

Por otro lado, un estudio reciente indicó que la expresión constitutiva de un gen *Psy* obtenido desde *Citrus paradisi* fue capaz de aumentar la tolerancia al estrés salino en plantas de tabaco transgénicas (Cidade y cols., 2012). Interesantemente, se encontró que las plantas obtenidas presentaban niveles aumentados de ABA lo cual fue relacionado con su mayor tolerancia.

En consecuencia, los actuales antecedentes sugieren un rol central de *Psy* en la respuesta al estrés por sal. Asimismo, una mayor síntesis de ABA y el poder antioxidante de los carotenoides podrían ser los mecanismos moleculares asociados a dicho incremento.

1.6. Importancia del gen *DcPsy2* en la ruta carotenogénica de *Daucus carota*

Daucus carota (zanahoria) es una planta dicotiledónea bienal que sintetiza carotenoides tanto en su raíz modificada como en las hojas. La zanahoria es una de las mejores fuentes de carotenoides, en particular β -caroteno, contribuyendo aproximadamente el 17% de su ingesta en nuestra dieta (Alasalvar y cols., 2001).

Estudios realizados en el laboratorio indican que los niveles de carotenoides aumentan en paralelo al estadio de desarrollo de la raíz modificada de *D. carota*, desde 16,6 µg/g de peso a las 4 semanas hasta 968 µg/g de peso seco a las 12 semanas (Fuentes y cols., 2012). Esta característica la hace un interesante modelo de estudio pues la mayoría de las especies vegetales no acumulan cantidades comparables de carotenoides en la raíz crecida de manera natural en ausencia de luz.

En *D. carota* existen dos genes para varias de las enzimas carotenogénicas, entre ellas PSY. En la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information) se encuentran disponibles dos marcos de lectura abiertos para *Psy*: *DcPsy1* (DQ192186) y *DcPsy2* (DQ192187). Para comenzar a estudiar la regulación de la síntesis de carotenoides en esta especie vegetal, en el laboratorio se determinó la expresión de varios genes carotenogénicos en distintas etapas del desarrollo de *D. carota*. Interesantemente, se encontró que el gen *DcPsy2* presenta una mayor expresión en el tejido fotosintético de plantas de 4 semanas de edad, respecto al gen parálogo *DcPsy1* (Fuentes y cols., 2012). Adicionalmente, este gen presentó un aumento de expresión en la raíz de 12 semanas que se caracterizó por registrar el nivel más alto de carotenoides. Este comportamiento resultó ser interesante pues se correlaciona de manera directa con el aumento progresivo del contenido de carotenoides en la raíz (Fuentes y cols., 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se sugiere que el gen *DcPsy2* cumple una importante función en la síntesis de carotenoides tanto en el tejido fotosintético de zanahorias juveniles como en el desarrollo de la raíz modificada.

Por otra parte, estudios recientes realizados en el laboratorio indicaron que la expresión de *DcPsy2* es inducida por ABA en plántulas de zanahoria, sugiriendo una

participación de este gen en la respuesta adaptativa al déficit hídrico y la salinidad tal como ha sido reportado en otras especies vegetales (Li, Vallabhaneni, Yu, y cols., 2008; Welsch y cols., 2008; Fuentes, 2011).

Sin embargo, a pesar de tener algunas evidencias que sugieren la participación del gen *DcPsy2* en la síntesis de carotenoides, hasta la fecha no existe ninguna prueba de su funcionalidad en plantas. Estudios previos han mostrado que en una de las variedades de zanahoria de color blanco (Blanche) existe una activa expresión de los genes carotenogénicos no conducente a una acumulación de carotenoides en la raíz (Clotault y cols., 2008). Por lo tanto, aun cuando los genes de esta ruta se transcriban, existe la posibilidad de que sus productos proteicos no sean funcionales .

En consecuencia y considerando la posible importancia del gen *DcPsy2* en la síntesis de carotenoides y su vinculación con la respuesta al estrés por sal, el objetivo del presente trabajo se enmarca en obtener algunas pruebas de la funcionalidad del gen *DcPsy2* en relación a la síntesis de carotenoides y su participación en la tolerancia al estrés salino con lo cual podría adjudicarse como un interesante candidato a nivel biotecnológico.

1.7. Estrategia a utilizar

Para cumplir el objetivo general del presente trabajo, se analizó un conjunto de líneas de *N. tabacum* transformadas con el gen *DcPsy2* durante el seminario de título (Acevedo, 2011) las cuales fueron sometidas a un análisis molecular para determinar, en primer lugar, la integración y expresión del transgen. Posteriormente, aquellas líneas que mostraron expresión del gen *DcPsy2* fueron sujetas a un análisis bioquímico

para determinar la participación de este gen carotenogénico en la síntesis de carotenoides coloreados. A continuación, algunas de las plantas transgénicas obtenidas fueron seleccionadas y estudiadas en mayor detalle; tanto a nivel bioquímico como molecular, con el fin de caracterizar la participación del gen *DcPsy2* en la síntesis de fitoeno, producto directo de la acción de PSY. Paralelamente, estas líneas fueron sometidas a un ensayo de tolerancia al estrés por sal en el cual se cuantificaron parámetros tales como el crecimiento, sobrevivencia y niveles de ABA bajo tratamientos con NaCl.

1.8. Hipótesis

H₁: La expresión constitutiva del gen *DcPsy2* de *D. carota* en *N. tabacum* conduce a un aumento en el contenido de: carotenoides coloreados, fitoeno y aumento de la sobrevida y de los niveles de ABA de las plántulas transgénicas sometidas a condiciones de salinidad.

No obstante, existe la posibilidad de que esta hipótesis no sea correcta por lo cual se enuncia la siguiente hipótesis nula:

H₀: El gen *DcPsy2* de *D. carota* no es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum* y su expresión constitutiva en tal organismo no genera cambios significativos en los niveles de carotenoides, ni en la sobrevida o niveles de ABA de plántulas transgénicas sometidas a condiciones de salinidad.

1.9. Objetivos.

1.9.1. Objetivo General.

Determinar la participación del gen fitoeno sintasa 2 (*DcPsy2*) de *Daucus carota* en la síntesis de carotenoides y en la tolerancia a estrés salino en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*.

1.9.2. Objetivos Específicos.

- 1) Realizar el análisis molecular de líneas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2*.
- 2) Determinar el contenido de carotenoides coloreados y fitoeno en las plantas de tabaco transgénicas con la construcción pGWB2/*DcPsy2*.
- 3) Evaluar la tolerancia a estrés salino de plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2*.
- 4) Determinar el contenido de ácido abscísico en plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2* en respuesta al estrés por sal.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron reactivos de calidad adecuada para las técnicas de biología molecular desarrolladas. Estos productos fueron obtenidos de empresas y marcas registradas tales como Fermentas[®], Promega[®], Axygen[®], Invitrogen[®], New England Biolabs[®], Biorad[®], Merck[®], US Biological[®], Phyto Technology Laboratories[®] y Sigma-Aldrich[®].

2.2. Material biológico y condiciones de cultivo

Se utilizaron plantas de la generación T₀ y T₁ de *Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi NN transformadas en el seminario de título con la construcción pGWB2/DcPsy2 (Acevedo, 2011). Como control de la transformación se incluyó el análisis de 2 plantas de tabaco transformadas con el vector pGWB2. Cada una de las líneas T₀ fue crecida en condiciones de invernadero controladas (24° C, fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad). Posteriormente, se obtuvo las semillas de algunas plantas seleccionadas en base a su contenido de carotenoides, para un análisis destinado a determinar la participación de DcPsy2 en la síntesis de fitoeno, la tolerancia al estrés por sal y la formación de ABA en respuesta a dicha condición. Las semillas de plantas elegidas fueron sembradas en placas Petri con 25 mL de medio de germinación que contenía 1X de mezcla de sales basales de Murashige y Skoog suplementado con vitaminas B5 y 0,7% agar-agar. Posteriormente, éstas fueron estratificadas mediante su incubación a 4 °C por 2 días en oscuridad (con el fin de sincronizar su germinación)

y finalmente fueron crecidas en condiciones *in vitro* por los tiempos requeridos de acuerdo al protocolo aplicado (24 °C, fotoperíodo 16:8 h luz:oscuridad). Como agente de selección de plántulas transgénicas se utilizó el antibiótico kanamicina a una concentración final de 100 mg/L.

2.3. Métodos de biología molecular

2.3.1. Extracción del DNA genómico de las plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2*

Para realizar la extracción de ADN genómico de plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2* y el vector pGWB2, se tomaron 100 mg de hojas los cuales fueron congelados en presencia de N₂ líquido y guardados a -80°C para su posterior uso. El material vegetal congelado fue macerado manteniendo la cadena de frío y luego se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía una mezcla de 600 µL de tampón CTAB y 4 µL de β-mercaptoetanol precalentado a 60 °C. A continuación el homogeneizado fue incubado a 60° C por 30 min. Posteriormente, se añadió 400 µL de tampón CTAB y se incubó a 70 °C por 15 min. Luego, se agregó 400 µL de una mezcla cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión 3 veces. La mezcla fue centrifugada a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C. El 50% de la fase superior fue recuperada en tubos Eppendorf estériles. Se agregó 700 µL de isopropanol mantenido a 4 °C y se dejó por 30 min a -20 °C para favorecer la precipitación del ADN. Luego se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió 700 µL de etanol 70 %. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min y a continuación se secaron las muestras a temperatura ambiente por 20 min. El ADNg fue resuspendido en 20 µL

de agua mili-Q libre de nucleasas. Este protocolo fue aplicado para 8 líneas transformadas con el gen *DcPsy2*, 2 plantas de tabaco transformadas con el vector pGWB2 y una planta silvestre.

2.3.2. Determinación de la transgénesis de las plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2*

La calidad del ADN extraído fue verificada mediante la amplificación del gen constitutivo *18S* (Tabla II , anexo). Posteriormente, se determinó la transgénesis de las líneas obtenidas mediante la amplificación del gen *HptII* (Tabla III, anexo). Finalmente, la integración del transgen fue determinada mediante la amplificación del gen *DcPsy2* a partir del ADN genómico de cada una de las líneas transgénicas (Tabla IV, anexo). Las reacciones de PCR fueron realizadas como se describe a continuación: se mezclaron 2,5 µL del tampón correspondiente a la enzima Taq polimerasa, 1 µL de MgCl₂ 50 mM (Bioline®), 0,5 µL de dNTPs 10 mM, 0,5 µL partidor sentido y antisentido 10 µM, 1U de la enzima ADN polimerasa además de ADN (30 a 50 ng) y agua libre de nucleasas suficiente para completar 25 µL de reacción. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador MyCycler™ de BIORAD®. Los partidores empleados para amplificar cada uno de los genes mencionados se detallan en la sección correspondiente (Tabla VII, anexo)

2.3.3. Electroforesis en geles de agarosa

Los ácidos nucleicos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y 1,5% (dependiendo del tamaño de las bandas que deseaban ser observadas) en tampón de

corrida TAE 1X (ácido acético glacial 19 mM, Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM) y posteriormente teñidos en una solución de bromuro de etidio (BrEt) 20 mg/L, agente que se intercala en el ADN, por 20 min. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25% y glicerol 80%) previo a ser cargadas en el gel. Para la migración electroforética se utilizó 5 V/cm durante 45 min para separar moléculas de ADN y 3,5 V/cm durante 35 min para ARN. Las bandas de ácidos nucleicos fueron visualizadas por la fluorescencia emitida por el BrEt al ser expuesto a luz UV. Las imágenes fueron capturadas con el equipo Dark Room Multigenius Syngene® a través del programa Gene Snap® de Syngene®. La fluorescencia fue cuantificada utilizando el programa ImageJ®.

2.3.4. Purificación del ARN vegetal

La extracción de ARN total de *N. tabacum* fue realizada empleando el reactivo Trizol® de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se extrajo ARN de 8 plantas T₀ transformadas con el gen *DcPsy2* y paralelamente desde un *pool* de 2 plantas control transformadas con el vector pGWB2; protocolo que posteriormente fue extendido a un conjunto de plántulas T₁ seleccionadas. El tejido para realizar la extracción fue obtenido desde 3 hojas distintas de similar edad para cada una de las líneas analizadas en el caso de la generación T₀ y desde un *pool* de 15 plántulas cuando se realizó el respectivo análisis en la generación T₁. Cada una de las muestras fue congelada inmediatamente en presencia de N₂ líquido y almacenada a -80 °C para su posterior uso. A continuación, el tejido recolectado fue homogeneizado en presencia de este último en morteros previamente esterilizados y fríos. Luego, se añadió 1 mL del reactivo Trizol® mezclando inmediatamente con cada una de las muestras

pulverizadas. El homogeneizado se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de complejos nucleoproteicos y luego se añadió 0,2 mL de cloroformo mantenido a 4 °C. La mezcla se agitó manualmente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000xg por 15 min a 4 °C y se traspasó el 60 % de la fase acuosa, a tubos Eppendorf estériles. Se agregó 0,5 mL de isopropanol y luego se resuspendió por inversión 3 veces. La solución resultante se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000xg por 10 min a 4 °C para precipitar el ARN. El sobrenadante se eliminó y se añadió 1 mL de etanol 75 % v/v disuelto en agua tratada con DEPC. Se agitó en vortex y luego se centrifugó a 7000xg por 5 min a 4° C. Posteriormente, el ARN fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 20 µL de agua tratada con DEPC. Con el fin de determinar la concentración y pureza de las muestras obtenidas éstas fueron cuantificadas en un espectrofotómetro NanoDrop™ en el cual paralelamente se determinaron las razones de absorbancia 260/280 y 260/230 (medidas en nm) indicativas de la pureza del ARN en relación a proteínas, sales y solventes respectivamente.

Con el fin de determinar la integridad de las muestras de ARN se cargaron 500 ng en un gel de agarosa y se realizó la electroforesis previamente descrita (sección 2.3.3).

2.3.5. Pureza y calidad del ARN vegetal

En aquellos casos en que las razones 260/280 y 260/230 observadas en el NanoDrop™ fueron insuficientes para considerar el ARN extraído con una pureza adecuada para la síntesis del ADNc (razones < 1,8), el ARN fue sometido a un

protocolo de limpieza para el cual se agregó un volumen de cloroformo frío y posteriormente se agitó en vortex durante 5 min. Luego de centrifugar a 10.000xg durante 5 min a 4°C, la fase acuosa superior (que contiene el ARN) 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 ARN 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 su integridad y calidad como fue previamente descrito.

2.3.6. Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

El primer paso para la obtención del ADNc consistió en incubar cada uno de los ARN previamente extraídos (sección 2.3.4) con la enzima DNasa I y de esta manera degradar posibles remanentes de DNA genómico producto de la extracción. Para esto, 7 µg de ARN de alta pureza se incubaron con 50 U de DNasa I (Fermentas[®]), 40 U de Inhibidor de RNasa (Ribolock[®], Fermentas[®]) y 1x de tampón de la DNasa I (Fermentas[®]), en agua tratada con DEPC en un volumen de 20 µL. La reacción fue mantenida durante 35 min en un baño termostático a 37°C. Finalmente se añadieron 2 µL de EDTA 25 mM y luego se incubó a 65°C durante 10 min. con el fin de inactivar la DNasa I.

Para la síntesis del ADNc, 9,5 µL del ARN tratado con DNasa I (3,5 µg) se incubaron con 3 µL de oligo AP 10 mM (5'-CGCCACGCGTCGACTAGTAC TTTTTTTTTTTTTTTTTT -3') en tubos de 0,2 mL durante 5 min a 70°C. Luego los tubos se incubaron durante 5 min. en hielo, tras lo cual se les agregó a cada uno 37,5 µL de

una mezcla de RT en agua libre de nucleasas (3 μ L de RT Improm II (Promega[®]), 40 U de Inhibidor de RNAsa (Ribolock[®], Fermentas[®]), dNTPs 600 nM, MgCl₂ 6,6 mM, 10 μ L de tampón 5X de la enzima RT Improm II y se continuó con el programa de RT-PCR convencional (Tabla V, anexo) obteniéndose finalmente 50 μ L de cada ADNc. Los partidores usados para RT-PCR convencional se muestran en la tabla correspondiente (Tabla VII, anexo).

2.3.7. PCR en Tiempo Real

Se utilizó el programa *AmpliX* para diseñar partidores destinados a amplificar una región interna de la secuencia codificante del gen *DcPsy2* de *D. carota*. Posteriormente, éstos fueron analizados con la Herramienta de Búsqueda y Alineamiento Local Básica, BLAST (por sus siglas en inglés) para confirmar *in silico* su especificidad. Además, se utilizó un conjunto de oligonucleótidos previamente diseñados y caracterizados (Busch y cols, 2002; Moreno, 2011) para amplificar mediante RT-PCR en tiempo real los genes endógenos de tabaco *NtPsy1*, *NtPsy2* y *NtLcyb*. La cuantificación de los niveles de transcrito se realizó de manera relativa a la expresión de los genes normalizadores *18S* y actina cuyos partidores también se encontraban disponibles en el laboratorio (Tabla VIII, anexo). Para los experimentos de RT-PCR cuantitativo se utilizó un termociclador Mx300P[™] (Stratagene[®]) y la sonda fluorescente SYBR green, contenida en el SensiMixPlus SYBR[™] kit (Quantace[®]).

En primer lugar se determinó la eficiencia de los partidores diseñados para amplificar una región del gen carotenógeno *DcPsy2*. Para ello, se utilizó un producto de PCR de dicho gen que fue sometido a 6 diluciones seriadas desde 1/10 hasta

1/1.000.000. Para cada una de estas diluciones, se graficó el valor de ciclo umbral (C_t) en función del logaritmo de la concentración inicial de ADN. Una vez obtenidos los respectivos datos experimentales se aplicó la siguiente ecuación para obtener el valor de eficiencia:

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

En donde m es la pendiente de la recta obtenida al graficar el valor de C_t v/s el logaritmo de la concentración inicial de ADN.

Una vez obtenido este valor (en conjunto con el resto de eficiencias previamente caracterizadas) la expresión relativa (E.R) de cada gen de interés fue calculada usando la siguiente relación (Rutledge y cols., 2003)

$$E.R = \frac{(1 + E_i)^{-C_{ti}}}{(1 + E_n)^{-C_{tn}}} \quad (\text{Ec. 2})$$

En donde E_i y E_n son las eficiencias de los partidores que amplifican cada uno de los genes de interés y normalizadores respectivamente, mientras que C_{ti} y C_{tn} son los valores de ciclo umbral para cada uno de éstos. Cabe mencionar que los valores de expresión, obtenidos para los distintos genes de interés, fue calibrado respecto al valor de expresión del gen *DcPsy2* en un *pool* de hojas obtenido desde 2 líneas transformadas con el vector pGWB2. Sin embargo, como estas plantas en particular no mostraron expresión del transgen (pues este último no estaba presente en el vector empleado para su transformación) se asignó manualmente un valor de $C_t = 40$ en estas líneas en específico (es decir un valor máximo de C_t cuando no existe expresión,

considerando que las reacciones de PCR en tiempo Real constaron de 40 ciclos de amplificación). De esta manera, como cada uno de los datos fue dividido por este valor (que tiende a cero, según la ecuación 2) se obtuvo un valor de 1 en la expresión de *DcPsy2* en plantas que no expresan el transgen quedando el resto de las expresiones calibradas respecto a este control. Esta metodología de cuantificación de los datos fue realizada en base a reportes previos y siguiendo la estrategia de estudios anteriores (Pfaffl, 2001; Fuentes y cols., 2012; Moreno y cols., 2013).

A continuación, con el fin de evaluar una correcta amplificación de los genes de interés durante el desarrollo de esta metodología, se evaluó que las curvas de amplificación tuvieran la forma sigmoídea característica de una reacción de PCR y que cada uno de los genes estudiados presentara un único máximo en la curva de disociación (lo cual indica la obtención de un único producto por cada set de partidores empleados). Además se verificó la consistencia entre réplicas técnicas de una misma medición.

El programa de amplificación para las reacciones de PCR en tiempo real se detalla en la tabla respectiva (Tabla VI, anexo) en conjunto con la curva de disociación realizada.

2.4. Determinación de la cantidad y composición de carotenoides

2.4.1. Extracción de carotenoides de las plantas de tabaco transgénicas

La extracción de carotenoides se realizó a partir de aproximadamente 100 mg de hojas. Como control se realizó la extracción de 100 mg tejido vegetal proveniente de un *pool* de plantas transformadas con el vector pGWB2 (2 plantas control para el caso

de la generación T₀ y 15 plántulas T₁ cuando se realizó el experimento en dicha generación). El tejido recolectado fue inmediatamente congelado en presencia de N₂ líquido y posteriormente macerado en un mortero previamente esterilizado manteniendo la cadena de frío. Posteriormente, se agregó 4 mL de una mezcla de hexano/acetona/etanol (2/1/1 v/v) para luego homogeneizar. La solución resultante se traspasó a tubos Eppendorf, se agitó en vortex durante 2 min y se mantuvo en hielo y oscuridad por otros 2 min. Luego, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. Los carotenoides se recuperaron de la fase superior, recolectándolos en un tubo Falcon de 15 mL.

Durante todo el proceso de extracción el homogeneizado y extracto se mantuvieron en oscuridad y hielo. Finalmente, la solución que contenía los carotenoides extraídos fue secada en un rotor speed-vac® y almacenado a -80° C para su posterior cuantificación.

2.4.2. Cuantificación de pigmentos totales mediante espectrofotometría.

La extracción de carotenoides almacenada a -80 ° C se resuspendió en 1 mL de eter de petróleo. Para determinar la cantidad de pigmentos totales (carotenoides y clorofila) se midió la absorbancia a 474 nm. Finalmente la concentración de pigmentos totales expresada en µg/g de peso seco se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$P. \text{ totales} = \frac{V. R. * (mL) \times A_{474nm} \times 100}{21 \times \text{Peso seco} ** (g)} \times d \quad (\text{Ec. 3})$$

*El volumen de resuspensión (V.R.) fue de 0,5 mL de una dilución (*d*) 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 cuociente entre el peso después y antes de la deshidratación de 3 muestras de tejido para las distintas condiciones y/o estadios de desarrollo evaluados.

2.4.3. Determinación de la composición de carotenoides mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El extracto de pigmentos totales fue resuspendido en 1 mL de acetona (MERCK®). A continuación la solución resultante fue centrifugada a 1000xg por 2 min con el fin de precipitar posibles partículas de material vegetal remanentes de la extracción. 300 µL del sobrenadante fueron inyectados con la jeringa adecuada en una columna Hipersy C₁₈ de fase reversa de 15 cm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/metanol/isopropanol (85/10/5 v/v), con un flujo isocrático de 1,5 mL/min. Los principales carotenoides coloreados registrados tales como luteína y β-caroteno fueron detectados a 474 nm en conjunto con las clorofilas *a* y *b*. El fitoeno por su parte fue detectado a una longitud de onda de 285 nm. Para cuantificar los carotenoides totales se determinó el porcentaje de clorofilas *a* y *b* en la muestra inicial mediante la

integración de los cromatogramas resultantes. Una vez determinada la concentración de clorofila (utilizando la ecuación 3 ponderada por las respectivas abundancias relativas de clorofila *a* y *b*), el contenido de carotenoides totales fue calculado como la diferencia entre el contenido de pigmentos totales (ecuación 3) y clorofila. A continuación se calculó el contenido individual de carotenoides que absorben a 474 nm multiplicando su abundancia relativa por el contenido de carotenoides totales. Debido a que el compuesto fitoeno no absorbe luz a 474 nm como el resto de pigmentos coloreados, su concentración se calculó mediante la integración del *peak* observado a 285 nm y fue relativizado a la concentración de β -caroteno que se obtendría con un área de esa magnitud.

2.5. Tratamiento de plántulas transgénicas con el herbicida norflurazon (NFZ).

En 3 placas de Petri individuales se sembraron homogéneamente 45 semillas T_1 de las líneas L3, L6 y S/I (plantas control T_0 transformadas con el vector pGWB2 sin inserto) en medio de germinación. Luego de 13 días de cultivo *in vitro* la mitad de las plántulas crecidas en condición normal fue traspasada a un medio de germinación suplementado con NFZ a una concentración final de 100 μ M (Li y cols., 2006). El resto fue colocado en medio fresco sin suplementar a modo de control. Luego de 7 días de tratamiento, período en el que se hizo evidente el blanqueamiento de las hojas, se determinaron los niveles de expresión del transgen y genes endógenos *Psy* ((Li y cols., 2006), sección 2.3.7) en ambas condiciones. Paralelamente se determinó el contenido de fitoeno y otros carotenoides mediante HPLC (sección 2.4.3).

2.6. Evaluación de la tolerancia a estrés salino de plantas transformadas con el gen *DcPsy2*

Para realizar los experimentos de tolerancia a estrés salino se utilizaron las semillas T_1 de las líneas L3 y L6 transformadas con el gen *DcPsy2* y seleccionadas en base al contenido aumentado de carotenoides que presentaron en la generación T_0 . Estas plántulas fueron sembradas en medio de germinación (sección 2.2) y crecidas *in vitro* por 13 días. Tal como se mencionó en la sección anterior, se realizó un control del experimento para lo cual se sembró las semillas de una planta T_1 transformada con el vector pGWB2. El tamaño muestral utilizado fue inicialmente de $n=30$ semillas por placa aumentándose luego a $n=45$ (realizando las réplicas necesarias para obtener los tamaños muestrales descritos más adelante). A continuación, la mitad de las plántulas obtenidas fueron traspasadas a medio de germinación suplementado con NaCl 250 mM mientras que la otra mitad fue traspasado a medio fresco sin NaCl en ambos casos sin añadir el antibiótico kanamicina. El tratamiento se extendió por 16 días y al cabo de este período los diferentes grupos de plantas fueron traspasados a condiciones de invernadero. Luego de 21 días de recuperación, se midió el porcentaje de sobrevivida. El experimento fue realizado en triplicado. Inicialmente se usó un $n=10$ plántulas de cada línea T_1 para cada condición evaluada y luego este número se elevó a $n=15$ y $n=30$ en las siguientes réplicas biológicas.

2.7. Evaluación de los niveles de ABA en las plantas de *N. tabacum* transformadas con *DcPsy2* bajo tratamientos con NaCl.

Los niveles de ABA fueron determinados a partir de 100 mg de hojas, procedentes de las plántulas T_1 de las líneas L3, L6 y S/I, luego de ser cultivadas por 20 días en

medio de germinación (Sección 2.2) y tratadas durante 0, 24 y 48 horas en dicho medio (sin agente de selección) suplementado con NaCl 250 mM. A continuación el tejido fue recolectado e inmediatamente congelado y pulverizado en presencia N₂ líquido. Posteriormente, se añadieron 4 mL de H₂O milli-Q para finalmente traspasar el homogeneizado a tubos Falcon de 15 mL. El extracto se incubó durante la noche a 4 °C. Las alícuotas obtenidas fueron cuantificadas mediante un ensayo de ELISA competitivo indirecto usando el anticuerpo monoclonal DBPA1 (Sigma[®], USA). Para el desarrollo de esta estrategia fue necesaria la síntesis de un conjugado ABA-BSA (es decir, la hormona ABA unida a la proteína seroalbúmina bovina) que fue empleado para el bloqueo inicial de las placas utilizadas para la cuantificación. La síntesis de este conjugado fue realizada en el laboratorio en base a la adaptación de un protocolo previamente descrito (Grabarek y *co/s.*, 1990). Para ello, se hizo reaccionar 2 mM de EDC y 5 mM de Sulfo-NHS con 1 mL de solución que contenía 1 mg/mL de ABA disuelto en tampón de activación compuesto por MES 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 6,0. La reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregó 1,4 µL de β-mercaptoetanol a una concentración final de 20 mM para inactivar el EDC. Luego, se descartó el exceso de agente reductor (β-mercaptoetanol) y entrecruzador (EDC) usando una columna de desalinización equilibrada con tampón de activación. Posteriormente, se añadió una cantidad equimolar (a la cantidad de ABA) de la proteína BSA. Esta reacción se mantuvo por 2 horas y luego fue inactivada mediante la adición de hidroxilamina 10 mM. Finalmente, el exceso de hidroxilamina fue removido a través de filtración en gel usando las columnas de desalinización previamente descritas. Una vez sintetizado el conjugado, se procedió a la cuantificación de las muestras mediante el ensayo de ELISA competitivo indirecto. En primer lugar, se realizó el bloqueo de las placas para lo cual se añadió en cada pocillo 200 µL de una

solución inicial compuesta por 20 mL de conjugado ABA-BSA disuelto en tampón NaHCO_3 0,05 M. Se incubó durante la noche a 4 °C y luego se lavó 3 veces con tampón PBS 1X para eliminar el conjugado no unido. A continuación, se cargaron 100 μL de estándares de ABA (desde 62,5-2000 pg) en cada pocillo y 100 μL de cada una de las muestras obtenidas desde el tejido vegetal. Paralelamente, se incluyeron los controles B_{max} y B_{min} para determinar la cantidad máxima y mínima de señal posible de obtener en el experimento respectivamente. Posteriormente, se añadió 100 μL del anticuerpo primario DBPA1 diluido 1/5000 en cada uno de los pocillos, excepto al de B_{min} . Se incubó por 3 h a 4 °C y se lavó 3 veces con tampón PBS 1X. Luego, se añadió 200 μL de anticuerpo secundario diluido en proporción 1/1000 (Anti IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina) y se incubó a 37 °C por 1 h. La placa fue lavada 5 veces con tampón PBS 1X. Después, se añadió 200 μL de p-nitrofenil fosfato (pNPP) a una concentración inicial de 1 mg/mL incubando luego a 37 °C por 30 min. Para detener la reacción, se añadió 50 μL de tampón de bloqueo KOH 5N a cada pocillo. Las muestras fueron cuantificadas en un lector de placas de ELISA midiendo la absorbancia a 405 nm. Cada una de las determinaciones se realizó con 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas cada una considerando un n=30 plántulas por condición evaluada. Las diferencias significativas en los resultados obtenidos fueron establecidas a través de una prueba de *t* no paramétrica de una cola y con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

3.1. Determinación de la transgénesis de las líneas de *N. tabacum* transformadas con el gen *DcPsy2* .

Para confirmar la transgénesis de las plantas de tabaco transformadas en el seminario de título (Acevedo, 2011), se obtuvo el ADNg de 8 líneas T₀ transformadas con la construcción *pGWB2/DcPsy2* mantenidas en invernadero por 2 meses (Sección 2.2). Estas líneas se denominaron L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 y L8. Adicionalmente se extrajo el ADNg de 2 plantas T₀ transformadas con el vector *pGWB2* (denominadas como S/I) y una planta silvestre mantenida en condiciones de cultivo idénticas. A continuación, se procedió a amplificar un fragmento del gen de resistencia a higromicina (*HptII*) que se encuentra en la región de ADN transferida a la planta. La amplificación del marcador de selección fue positiva para todas las líneas transformadas con los vectores *pGWB2/DcPsy2* y *pGWB2* obteniéndose la banda esperada de 624 pb (Figura 2, panel A carriles L1-L8 y S/I). Además, no se obtuvo amplificación cuando se utilizó ADNg de una planta silvestre (carril WT). Este resultado muestra que estas 9 líneas son efectivamente transgénicas y sugiere que poseen el gen *DcPsy2* integrado en el genoma (a excepción del control negativo S/I). En esta reacción se incluyó un control positivo utilizando ADNp del vector *pGWB2* (carril C⁺).

Posteriormente se verificó la integración del gen *DcPsy2* en el genoma de las plantas transgénicas mediante su amplificación por PCR. Al igual que lo observado con el gen *HptII*, la amplificación del gen *DcPsy2* a partir del ADN genómico de las distintas

plantas fue exitosa para cada una de las líneas transformadas con el vector *pGWB2/DcPsy2* (Figura 2, panel B). Para cada una se obtuvo el tamaño esperado de 1,3 Kb correspondiente a la secuencia codificante del gen en cuestión. Además, la respectiva banda no se obtuvo al utilizar ADN genómico de plantas transformadas con el vector *pGWB2* indicando la especificidad de la reacción (control negativo, carril S/I). Como control positivo, se utilizó ADN de la construcción *pGWB2/DcPsy2* generada previamente (Acevedo, 2011).

La calidad del ADNg se determinó realizando la amplificación por PCR de un fragmento del gen ribosómico *18S* (sección 2.3.2). Para cada una de las líneas analizadas se obtuvo la banda esperada de 180 pb (Figura 2, panel C).

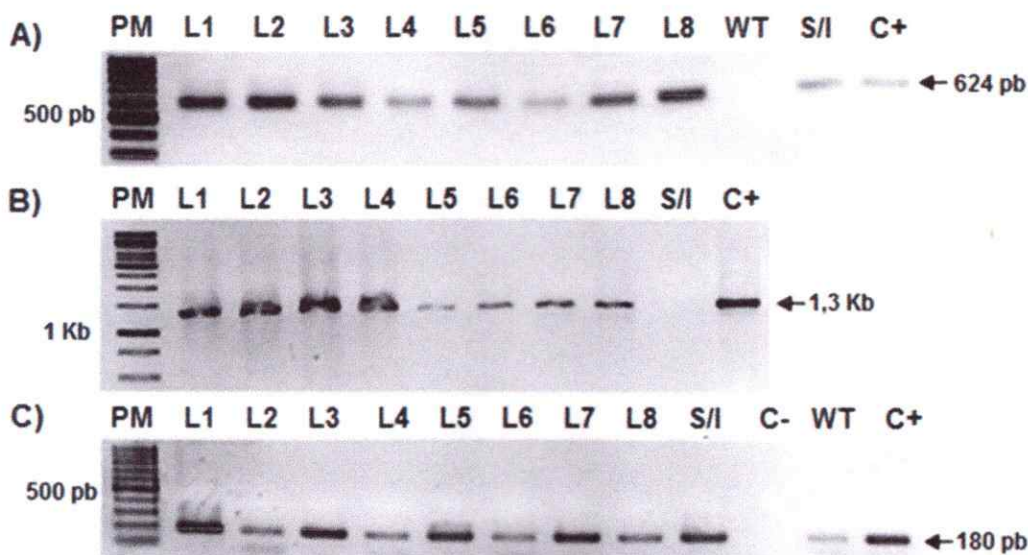


Figura 2. Amplificación de los genes, *HptII*, *DcPsy2*, y *18S* a partir del ADNg de las líneas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8 y S/I . A) Amplificación del gen *HptII* para determinar la transgénesis de las plantas obtenidas. B) Amplificación del gen *DcPsy2* para determinar su integración en el genoma de las plantas transgénicas C). Amplificación del gen *18S* para determinar la calidad de los ADNg extraídos PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb o 100 pb según corresponda. C⁻: control negativo, sin agregar ADN. WT: amplificación utilizando ADNg de tabaco silvestre. C⁺: control positivo . Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con BrEt.

3.2. Determinación de la expresión del gen *DcPsy2* en las plantas de *N. tabacum* transgénicas.

Posteriormente, con el fin de verificar la expresión del gen *DcPsy2* de *D. carota* en las plantas de *N. tabacum* transgénicas y la funcionalidad de la construcción *pGWB2/DcPsy2*, se realizó un RT-PCR convencional. Para comenzar con este análisis se extrajo ARN de las 8 líneas transformadas con la construcción *pGWB2/DcPsy2* (Sección 2.3.4) y de un *pool* de las 2 plantas control transformadas con el vector *pGWB2*. A continuación, se realizó la transcripción reversa del ARNm para sintetizar ADNc (Sección 2.3.6). Para verificar la calidad del ADNc sintetizado, se realizó un RT-PCR del gen *18S* para cada una de las líneas analizadas (Sección 2.3.2; Tabla II, anexo) y como control se realizó un PCR utilizando el respectivo ARNm (denominado control sin RT) con el fin de comprobar la ausencia de ADNg en las muestras de ADNc. En esta amplificación del gen *18S* fue incluido un control positivo utilizando ADNg de *N. tabacum* silvestre y un control negativo en el cual no se agregó ADN. El resultado del RT-PCR indica que la síntesis de ADNc fue efectiva para cada una de las líneas analizadas obteniéndose en cada caso la banda esperada de 180 pb correspondiente al fragmento del gen *18S* (Figura 3, carriles L1-L8 y S/I). Además se descartó la presencia de ADNg en las muestras al no obtener amplificación en los respectivos controles sin RT (carriles s/RT).

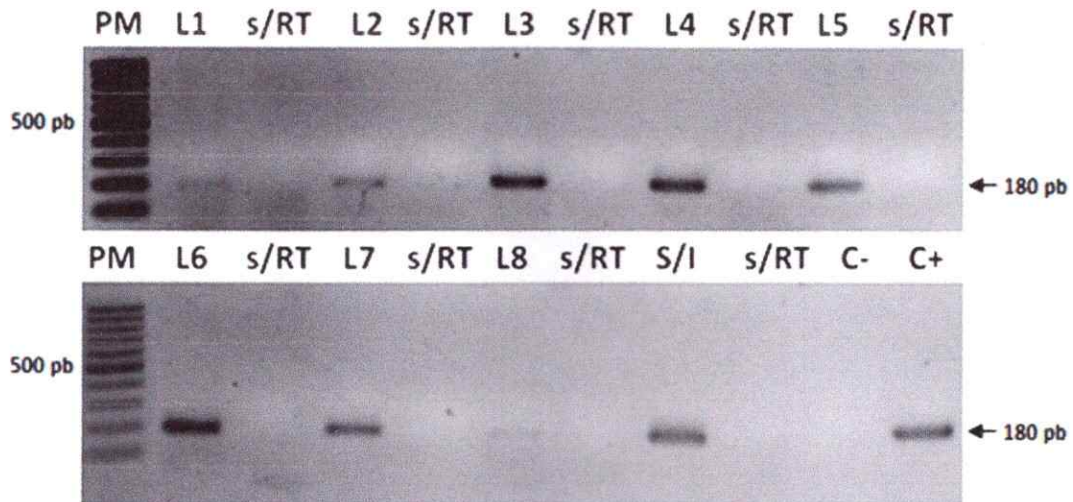


Figura 3. RT-PCR del gen 18S a partir del ADNc obtenido de las líneas transgénicas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8 y S/I. En los carriles s/RT se cargaron los respectivos controles sin RT en los cuales se utilizó ARNm de las líneas analizadas como molde en la reacción de PCR para determinar la presencia de ADNg en las muestras. C⁻: Control negativo, sin agregar ADN. C⁺: Control positivo utilizando ADNg de *N. tabacum* silvestre. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con BrEt.

Cabe mencionar que la amplificación de este fragmento mediante RT-PCR se realizó utilizando 28 ciclos, etapa en la cual su amplificación se encuentra en fase exponencial. Por esta razón, los resultados obtenidos indican que si bien se logró obtener satisfactoriamente el ADNc de todas las líneas analizadas, existen diferencias en su carga inicial lo cual se traduce en una desigualdad de la intensidad de las bandas obtenidas para cada uno.

Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación mediante RT-PCR del gen *DcPsy2* a partir de los ADNc sintetizados (Sección 2.3.6; Tabla IV, anexo). Como control negativo de la reacción se utilizó ADNg extraído de una planta transformada con el vector pGWB2 y como control positivo, se incluyó la amplificación del gen

DcPsy2 a partir de ADNp de la construcción *pGWB2/DcPsy2*. Para 6 de las 8 líneas transformadas con el gen *DcPsy2* se observa la banda esperada de 1,3 Kb (Figura 4, carriles L1, L2, L3, L4, L6, y L7) lo cual confirma su expresión. Por otra parte, no se obtuvo amplificación cuando se utilizó ADNc de plantas transformadas con el vector *pGWB2* (carril S/I) indicando la especificidad de la reacción.

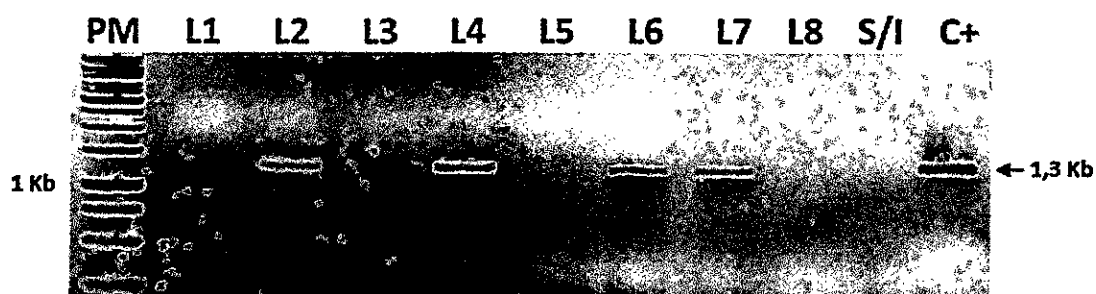


Figura 4. RT-PCR del gen *DcPsy2* de *D. carota* en las líneas transgénicas L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8. C⁺: control positivo, se utilizó ADNp de la construcción *pGWB2/DcPsy2*. S/I: amplificación utilizando ADNc de *N. tabacum* transformado con el vector *pGWB2* sin inserto (control negativo). PM: Estándar de peso molecular de 1 Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt.

3.3. Evaluación de la funcionalidad del gen *DcPsy2* mediante análisis bioquímico de las líneas transformadas.

Luego de determinar que el transgen se expresó en 6 de las 8 líneas obtenidas para el vector *pGWB2/DcPsy2* se procedió a investigar a nivel bioquímico el impacto ejercido por la expresión constitutiva de *DcPsy2* en la acumulación de carotenoides.

En todas las plantas analizadas se determinó que los principales carotenoides presentes en tejido fotosintético fueron luteína, β -caroteno y α -caroteno. Satisfactoriamente y en acuerdo con la hipótesis planteada, encontramos que 3 de las

líneas transgénicas para el vector pGWB2/DcPsy2 presentaron un mayor contenido de al menos uno de los carotenoides detectados (líneas L3, L6 y L7, Figura 5). En particular, la línea L3 presentó un aumento significativo del 44% en el contenido de β -caroteno, un 41% más de carotenoides totales y 63% de aumento en el contenido de α -caroteno. Por otra parte la línea L6 presentó un incremento del 57% tanto en carotenoides totales como en β -caroteno así como un 59% más de luteína que plantas control mientras que la línea L7 registró un aumento significativo del 49% en el contenido de luteína.

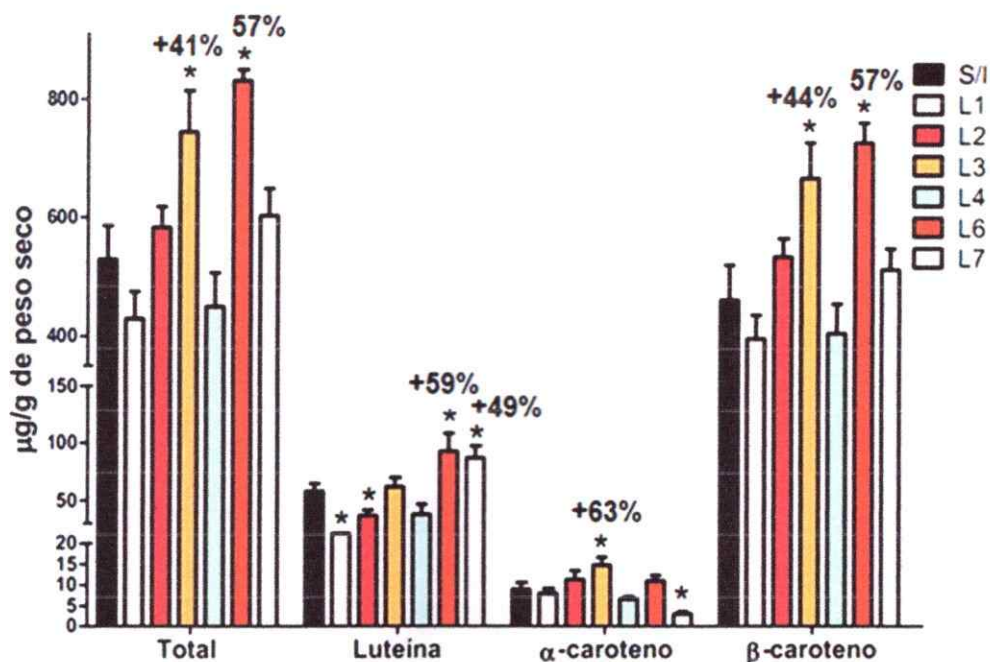


Figura 5. Determinación del contenido de carotenoides en plantas transgénicas transformadas con el gen *DcPsy2*. Los niveles de carotenoides totales fueron calculados mediante espectrofotometría y análisis por HPLC en las líneas transgénicas. Los pigmentos fueron identificados de acuerdo a su tiempo de retención y espectro de absorción. * indica diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, respecto a las plantas control (prueba de *t* de Mann-Whitney).

Sin embargo, a pesar de haber obtenido 3 líneas transgénicas con aumentos significativos en el contenido de algunos carotenoides, también encontramos 3 líneas que presentaron niveles disminuidos de algunos de ellos y paralelamente un contenido inalterado de otros tal como ha sido previamente descrito (Busch y cols., 2002; Maass y cols., 2009; Acevedo, 2011). Así por ejemplo, las líneas L1 y L2 presentaron disminuciones del 57% y 36% en el contenido de luteína respectivamente además de un contenido invariante de carotenoides totales y β-caroteno. Además, la línea L7, que previamente se caracterizó por mostrar un aumento significativo del contenido de

luteína, presentó una reducción del 67% en el contenido de α -caroteno además de niveles inalterados de β -caroteno y carotenoides totales.

3.4. Determinación de los niveles de expresión del gen *DcPsy2* y genes carotenogénicos endógenos en las líneas transgénicas

Luego de determinar que la expresión constitutiva de este gen conduce a un incremento en el contenido de carotenoides se decidió evaluar el nivel de transcrito del gen *DcPsy2* y los genes carotenogénicos endógenos de tabaco: *NtPsy1*, *NtPsy2* y *NtLcyb* en algunas líneas transgénicas seleccionadas. Este experimento fue realizado para determinar si el incremento en carotenoides totales observado en las líneas L3 y L6 era atribuible a un aumento en la transcripción de algunos de los genes carotenogénicos endógenos o si se trataba más bien de un efecto único y directo de la expresión del gen *DcPsy2* de *D. carota*. Paralelamente, extendimos este análisis para la línea L4 con el fin de tener alguna explicación acerca de los niveles inalterados (e incluso disminuidos) de carotenoides que se registraron en algunas plantas a pesar de mostrar expresión del transgen. A partir de los ADNc obtenidos de las líneas L3, L6, L4 y S/I se amplificó el gen *18S* mediante PCR en tiempo real (Sección 2.3.7). Finalmente, se procedió a determinar la expresión de los genes endógenos: *NtPsy1*, *NtPsy2* y *NtLcyb* en conjunto con el transgen *DcPsy2* en las distintas líneas.

Los resultados del experimento de PCR en tiempo real mostraron que el transgen *DcPsy2* se expresó de manera diferencial entre las líneas L3, L6 y L4 (todas transformadas con el gen *DcPsy2* a diferencia de las líneas control S/I) observándose 8,9 veces más expresión en la línea L6 respecto a la línea L3, lo cual correlaciona directamente con el contenido de carotenoides registrado en cada una (Figura 6).

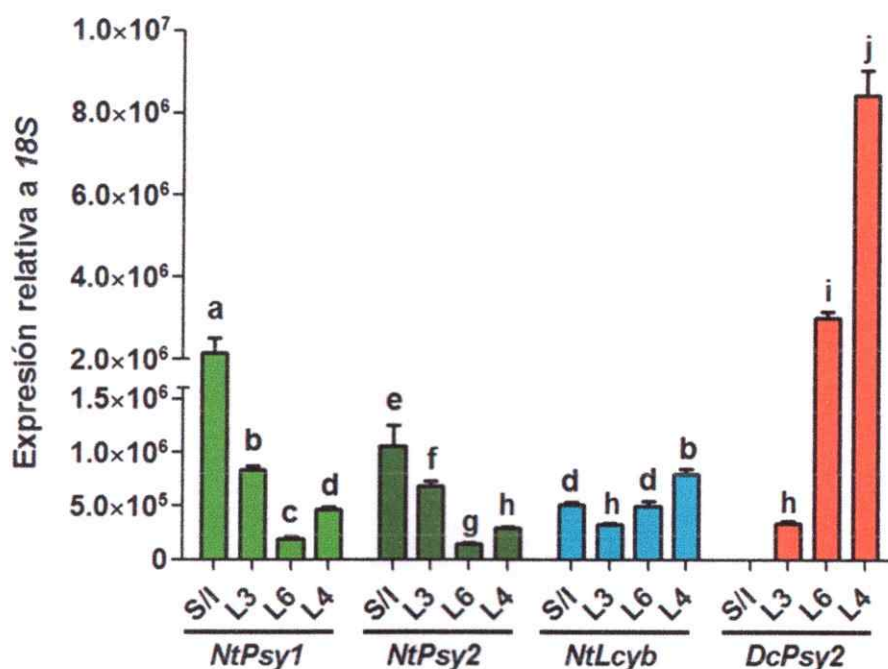


Figura 6. Amplificación mediante PCR en tiempo real de genes carotenogénicos endógenos y del transgen *DcPsy2* en líneas de tabaco transformadas con el vector pGWB2 (S/I) y el vector pGWB2/*DcPsy2* (L3, L6 y L4). La expresión fue calculada en relación al gen normalizador *18S*. El nivel de transcrito de los genes endógenos *NtPsy1* (verde claro), *NtPsy2* (verde oscuro) y *NtLcyb* (azul) se calculó usando como calibrador la expresión del gen *DcPsy2* (naranja) en un pool de 2 plantas transformadas en el vector pGWB2. La expresión del transgen fue calculada de la misma manera. Letras diferentes sobre cada una de las barras indican diferencias significativas calculadas con una prueba de *t* no paramétrica de una cola y un valor de $p < 0,05$.

No obstante, observamos que la línea L4 a pesar de mostrar 2,8 veces más expresión del gen *DcPsy2* que la línea L6 presentó un contenido inalterado, y con tendencia a la disminución, de los carotenoides luteína, α -caroteno y β -caroteno. Además, al cuantificar el nivel de transcrito del gen *DcPsy2* en todas nuestras líneas transgénicas, mediante RT-PCR semi-cuantitativo (Figura S1, anexo) observamos que

las líneas L1 y L2 con disminuciones del 57% y 37% en el contenido de luteína presentan un nivel de expresión del transgen mayor que el registrado en la línea L4

En relación a los genes *Psy* endógenos se observó una reducción de ambos transcritos respecto a plantas control. En la línea L3 se observó una reducción del 61% en la expresión del gen *NtPsy1* y un 35% de reducción en la expresión de *NtPsy2*. Por su parte, la línea L6 presentó una reducción del 91% en el nivel de transcrito del gen *NtPsy1* y un 86% de reducción en el nivel de *NtPsy2*. Además, la línea L4 presentó un 78% de reducción en los niveles de transcrito del gen *NtPsy1* y un 71% de reducción en los niveles de *NtPsy2*.

En relación al gen *NtLcyb*, involucrado directamente en la síntesis de β -caroteno, se observó que la línea L3, con un aumento del 44% en el contenido dicho pigmento, presentaba una disminución del 34% en el nivel de transcrito de este gen carotenogénico. Por otra parte, la línea L6, que también presentó un aumento significativo del contenido de β -caroteno, registró un nivel transcrito inalterado del gen *NtLcyb* respecto a plantas control. No obstante, en la línea L4, en donde no se observaron cambios significativos del contenido de β -caroteno, se registró un aumento del 56% en el nivel de transcrito de este gen en particular.

3.5. Determinación del contenido de fitoeno en plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2*.

Para cumplir con el objetivo de determinar si la expresión heteróloga de este gen contribuye a la síntesis de fitoeno (producto directo de la enzima PSY) en las

plantas de tabaco transgénicas se determinó el contenido de este pigmento en plántulas T₁ de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2* luego de un tratamiento agudo con el herbicida norflurazon (NFZ). Este compuesto bloquea la acción de la enzima fitoeno desaturasa, provocando un aumento del sustrato fitoeno (Breitenbach y cols., 2001). La aplicación de este compuesto se hizo necesaria para su cuantificación pues en condiciones normales de cultivo este carotenoide incoloro no se acumula (previamente solo se detectó α -caroteno, β -caroteno y luteína en las líneas transgénicas, sección 3.3).

La determinación de los niveles de fitoeno se realizó utilizando las plántulas T₁ de las líneas transgénicas T₀ L3, L6 y S/I que presentaron mayor tamaño en condiciones de crecimiento frente al agente de selección. Nuestro criterio para realizar la selección de estas plántulas en particular se basó en el hecho de que tanto la línea L3 como la línea L6 presentaron un mayor contenido de carotenoides coloreados en la generación T₀. De esta manera, ambas líneas fueron potenciales candidatas de poseer un contenido aumentado de fitoeno ante la aplicación de NFZ en la generación T₁. Luego de realizar el tratamiento con el herbicida (sección 2.5) se desarrollaron los análisis correspondientes.

Para comenzar con el análisis se determinó en primer lugar la expresión del gen *DcPsy2* tanto en presencia como ausencia del herbicida NFZ y de esta manera verificar que las plántulas utilizadas efectivamente expresaran el transgen (a excepción de las plántulas control). Paralelamente, se calcularon los niveles de expresión del gen *actina*, sugerido como normalizador para este ensayo en particular de acuerdo a reportes previos (Li y cols, 2006).

Una vez establecida la similitud en la cantidad de ADNc obtenido en las distintas condiciones y grupos de plantas transgénicas se procedió a amplificar el gen *DcPsy2* mediante PCR en tiempo real tanto en condiciones basales como luego de aplicar NFZ. De manera similar a lo que se obtuvo con la generación T₀ de las líneas L3 y L6, la generación T₁ presentó una diferencia significativa en la expresión del transgen entre ambas líneas en condición control, registrándose 113 veces más expresión en la generación T₁ de la línea L6 respecto a la línea L3 ($4,57 \times 10^3$ v/s $5,17 \times 10^5$, Tabla I).

Tabla I. Cuantificación de fitoeno en las líneas de *N. tabacum* que expresan el gen *DcPsy2*. Se indica la abundancia de transcrito de *DcPsy2*, el nivel de fitoeno y el nivel de transcrito de ambos genes *NtPsy* endógenos en las plántulas T₁ de tabaco de las líneas L3, L6 y sin inserto (S/I) luego del tratamiento con norflurazon (NFZ).

Línea	<i>DcPsy2</i> (n.t.r) ^a		Fitoeno (µg/g P.S.) ^b		<i>NtPsy1</i> (n.t.r)		<i>NtPsy2</i> (n.t.r)	
	Control	NFZ	Control	NFZ	Control	NFZ	Control	NFZ
S/I	n.d. ^c	n.d.	n.d.	39,9 ± 4,1	$6,92 \times 10^5 \pm 5,27 \times 10^5$ $5,48 \times 10^4$	$1,12 \times 10^4$ (*)	$8,81 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^4$ $7,03 \times 10^4$ (*)	$6,53 \times 10^5 \pm 7,03 \times 10^4$ (*)
L3	$4,57 \times 10^3 \pm 2,00 \times 10^2$	$1,60 \times 10^3 \pm 6,79 \times 10^2$ (*)	n.d.	25,9 ± 2,6	$1,66 \times 10^5 \pm 5,71 \times 10^3$	$4,14 \times 10^5 \pm 3,58 \times 10^4$ (*)	$1,69 \times 10^5 \pm 2,99 \times 10^4$	$4,14 \times 10^5 \pm 1,77 \times 10^4$ (*)
L6	$5,17 \times 10^5 \pm 3,34 \times 10^4$	$2,74 \times 10^6 \pm 3,49 \times 10^5$ (*)	n.d.	55,8 ± 2,0	$1,26 \times 10^5 \pm 1,18 \times 10^4$	$1,02 \times 10^6 \pm 1,28 \times 10^5$ (*)	$2,76 \times 10^5 \pm 1,02 \times 10^4$	$1,30 \times 10^6 \pm 4,89 \times 10^4$ (*)

^a n.t.r., nivel de transcrito relativo a actina; ^b µg/g P.S., µg/g de peso seco; ^c n.d., no detectado.

(*) denota una diferencia significativa ($p < 0,05$, prueba de *t* de una cola) en el nivel de transcrito de los genes *DcPsy2*, *NtPsy1* y *NtPsy2* cuantificado por PCR en tiempo real respecto a la condición control (sin tratamiento con NFZ).

En segundo lugar, se determinó que luego de aplicar el herbicida el nivel de transcrito del transgen disminuyó en un 66% en las plántulas T₁ de L3 y aumentó 5,3 veces en las plántulas T₁ de L6. Por otra parte, al comparar ambas líneas luego de ser tratadas con NFZ se observa una diferencia significativa de 1714 veces más de

expresión del transgen en plántulas T₁ de la línea L6 respecto a plántulas T₁ de la línea L3.

Luego de establecer que el gen *DcPsy2* se expresaba en las plántulas T₁ de interés se procedió a cuantificar el contenido y composición de carotenoides luego de aplicar NFZ 100 µM por 7 días (Figura S3, anexo) enfocándose en determinar los niveles de fitoeno en las líneas transgénicas de interés. En condiciones basales, no fue posible detectar fitoeno en ninguna de las líneas transgénicas. Sin embargo, luego de aplicar el herbicida se detectaron 39,9 µg/g de peso seco de fitoeno en plántulas control, 25,9 µg/g de peso seco en las plántulas T₁ de la línea L3 y 55,8 µg/g de peso seco en plántulas T₁ de la línea L6.

Este resultado es interesante si se analiza en conjunto con los datos de PCR en tiempo real obtenido previamente. Tomando como base las plántulas control, las plántulas T₁ de la línea L3 presentan una reducción del 35 % en los niveles de fitoeno y presentan una menor expresión del transgen si se comparan con plántulas T₁ de la línea L6. En el caso de las plántulas T₁ de la línea L6, éstas presentan la mayor expresión del transgen luego de la incubación con NFZ y son capaces de acumular un 40% mas de fitoeno que plantas control.

Con el fin de profundizar el análisis y determinar la participación de los genes *Psy* endógenos en estos comportamientos diferenciales entre líneas transgénicas independientes se procedió a amplificar mediante PCR en tiempo real los genes endógenos *NtPsy1* y *NtPsy2* tanto en condiciones normales como luego de aplicar el herbicida NFZ.

Luego de realizar este experimento se observó que la expresión de *NtPsy1* en condiciones normales se encuentra disminuida en las plántulas que expresan *DcPsy2* respecto a plántulas control. La disminución del nivel de transcrito de este gen fue de un 76% y 82% en las líneas L3 y L6 respectivamente. Interesantemente, después de aplicar el herbicida se observa una disminución significativa del 23% en los niveles de transcrito de este gen en plántulas control y una inducción de éste entre 2,5 a 8 veces en las plántulas T₁ de la línea L3 y L6 respectivamente. Adicionalmente, observamos que el nivel de expresión que alcanza este gen luego del tratamiento con NFZ en la línea L3 es significativamente menor (en un 22%) que el obtenido en plantas control lo cual se correlaciona de manera directa con el menor contenido de fitoeno de esta línea en particular.

Por último, notamos que el nivel relativo de transcrito del gen *NtPsy1* en la línea L6 tras el tratamiento con NFZ supera en 1,9 veces al observado en plantas control lo cual, de manera similar al caso anterior, se correlaciona de manera directa con el contenido aumentado de fitoeno en esta línea.

En relación al gen *NtPsy2* se observó que las plántulas T₁ de las líneas L3 y L6 presentaron una reducción significativa en los niveles de transcrito de este gen en condiciones normales respecto a plántulas control. Este resultado también concuerda con lo determinado en la generación T₀ de estas plantas (previamente se determinó que la expresión del transgen está asociada a una reducción en los niveles de transcrito de ambos genes *Psy* endógenos, (Sección 3.4). Luego de aplicar NFZ los niveles de transcrito de este gen disminuyeron en un 36% en plántulas control y aumentaron 2,4 veces en las plántulas T₁ de la línea L3. No obstante, a pesar de que en éstas hubo un incremento en la transcripción de *NtPsy2* (comparando la condición

basal respecto a la de tratamiento con NFZ), el nivel relativo de expresión de este gen fue un 37% menor al registrado en plantas control lo cual también se correlaciona con el menor contenido de fitoeno de estas plántulas. Un comportamiento similar se observó en la generación T₁ de la línea L6 en donde se registró un aumento de 4,7 veces en los niveles de transcrito del gen *NtPsy2* tras aplicar el herbicida. En este caso el nivel de transcrito del gen *NtPsy2* superó en 2,0 veces al observado en plantas control luego del tratamiento con NFZ.

3.6. Evaluación de la participación del gen *DcPsy2* en la tolerancia a estrés salino de plantas de *N. tabacum* transgénicas.

Para evaluar la participación del gen *DcPsy2* en la tolerancia al estrés salino se determinó el peso fresco y la sobrevivencia de las plántulas T₁ de las líneas L3, L6 y S/I luego de ser sometidas a un tratamiento con NaCl 250 mM en condiciones *in vitro*. En condiciones normales de cultivo se encontró que el peso fresco de plántulas control llegó a ser en promedio 48,8 mg luego de 29 días de crecimiento (Figura 7). En relación a la línea L3 este valor llegó a los 49,7 mg no variando de manera significativa con el caso anterior. Sin embargo, plántulas T₁ de la línea L6 presentaron un 31 % menos de peso fresco que plántulas control alcanzando un valor promedio de 33,5 mg cuya diferencia fue estadísticamente significativa.

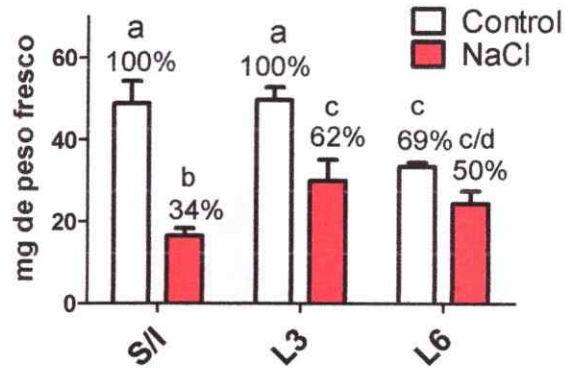


Figura 7. Determinación del peso fresco de plántulas transgénicas sujetas a tratamiento con NaCl *in vitro*. El peso fresco de las plántulas transgénicas T₁ de las líneas S/I, L3 y L6 fue determinado luego de 29 días de condiciones normales crecimiento (control) y al final de un tratamiento con NaCl 250 mM por 16 días (NaCl). Las diferencias significativas se indican con letras distintas sobre las barras correspondientes. El test estadístico consistió en una prueba de *t* no pareada, de una cola y con $p < 0,05$. Sobre cada barra se indica el porcentaje de peso fresco de cada línea respecto al promedio registrado en plántulas T₁ S/I crecidas bajo condición control.

Por otro lado, luego de 16 días de tratamiento con NaCl se observó que plantas control alcanzan un peso fresco promedio de 16,4 mg. Para el caso de la línea L3 este valor llega a 30 mg superando de manera significativa el valor observado en plantas control en un 82%. Por su parte las plántulas de la línea L6 alcanzaron un valor de 24,3 mg de peso fresco. Estos resultados son interesantes pues entregan información acerca del impacto que tiene el estrés por sal en el crecimiento de las distintas líneas transgénicas. En el caso de las plántulas control S/I, se tiene que después del tratamiento con NaCl el peso fresco de éstas solo llega al 34% del observado en condiciones basales. Este resultado indica que el estrés salino ejerce un significativo impacto en el crecimiento normal de las plántulas control. En contraste, plántulas T₁ de la línea L3 alcanzan un 60% del peso fresco observado en condiciones normales de

crecimiento mientras que en las plántulas T₁ de la línea L6 dicho valor llega a ser un 73% del observado en la condición normal. De esta manera, el efecto que ejerce el estrés salino en el crecimiento de las plántulas T₁ transformadas con *DcPsy2* es significativamente menor que el observado en plantas control, lo que sumado a los resultados de PCR en tiempo real (sección 3.5) sugiere una correlación directa entre el nivel de expresión del transgen y la tolerancia al estrés salino.

Con el fin de respaldar estos resultados y determinar la viabilidad de las plántulas transgénicas frente a la condición de estrés salino; se midió el porcentaje de sobrevivencia de las distintas líneas transgénicas luego de 21 días de recuperación post-tratamiento con NaCl, en condiciones normales de cultivo en invernadero. En la condición control, en ausencia de estrés salino, no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia de las plántulas T₁ L3 y L6 respecto a las plantas transgénicas sin inserto (S/I, Figura 8). Sin embargo, estas últimas solo alcanzaron un porcentaje de sobrevivencia del 19% luego de ser sometidas al estrés por sal. Interesantemente las plántulas T₁ de la línea L3 presentaron una sobrevivencia del 40% frente al mismo tratamiento, mientras que en la generación T₁ de la línea L6 esta cifra llegó al 68%.

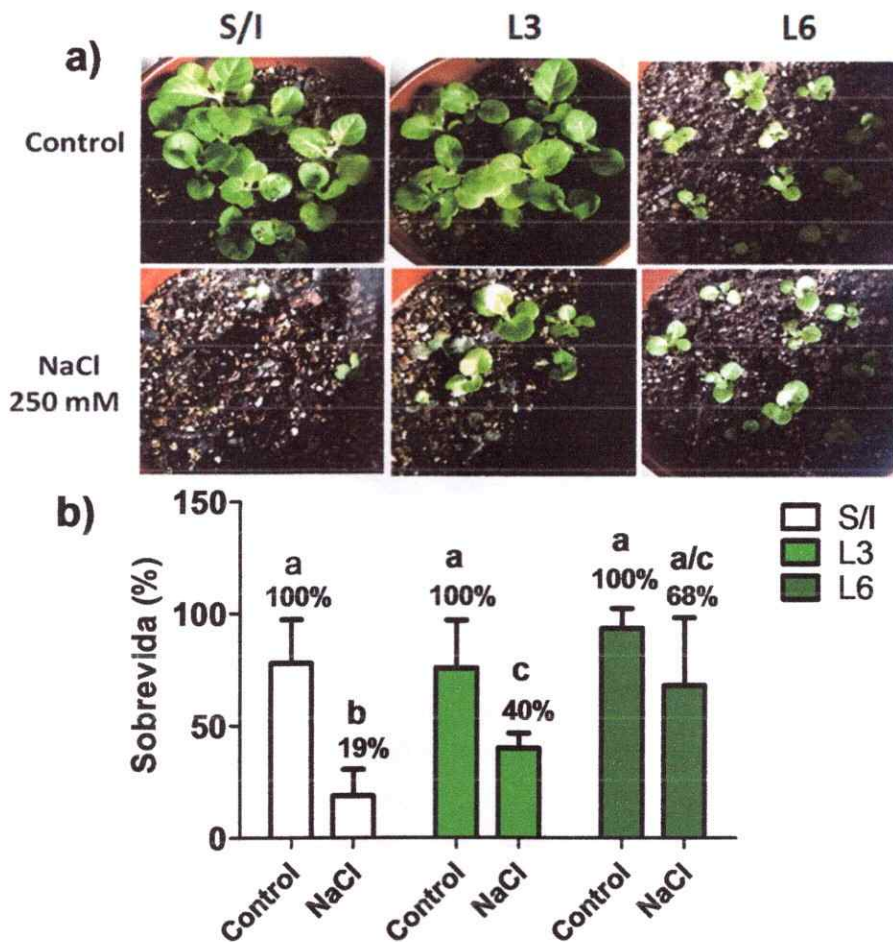


Figura 8. Determinación de la sobrevivencia de plántulas transgénicas después de ser sometidas a estrés por sal con NaCl 250 mM. a) Fenotipo de las líneas T₁ S/I, L3 y L6 luego de 16 días de tratamiento con NaCl y posterior recuperación por 21 días en condiciones de invernadero. b) Porcentaje de sobrevivencia luego de 21 días de recuperación en condiciones de invernadero de plántulas pre-tratadas o no con NaCl por 16 días. Las barras de error representan la desviación estándar del promedio de 3 réplicas biológicas (cada una de 10, 15 y 30 plántulas por condición evaluada respectivamente). La sobrevivencia fue calculada en las plántulas T₁ de las líneas de interés S/I (plantas control transformadas con el vector pGWB2), L3 y L6. Las diferencias significativas se expresan mediante letras distintas sobre cada una de las barras determinadas mediante una prueba de *t* no paramétrica de 1 cola con $p < 0,05$. Sobre cada barra se indica el porcentaje promedio de sobrevivencia en relación a plántulas crecidas en condiciones normales.

3.7. Determinación de los niveles de ABA en las plántulas de tabaco transgénicas en respuesta al tratamiento con NaCl.

Considerando que la cinética de acumulación de ABA frente al estrés por sal, en plántulas de *N. tabacum* y condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo, no ha sido descrita en la literatura; la evaluación del contenido de ABA en las plántulas transformadas con el gen *DcPsy2* de *D. carota* fue realizada luego de 0, 24 y 48 horas de tratamiento con NaCl 250 mM¹.

En condiciones normales de cultivo, se encontró que las plántulas T₁ control presentaron 266,3 ng/g de peso seco de ABA (Figura 9). Por otro lado, las plántulas T₁ de la línea L3 registraron un nivel de 55,7 ng/g de peso seco de ABA que resultó ser un 79% menor que el obtenido en plantas control. En relación a las plántulas T₁ de la línea L6, la cantidad de ABA determinada fue de 331,4 ng/g de peso seco no variando de manera significativa respecto a plántulas control.

En segundo lugar, observamos que luego de 24 y 48 horas de tratamiento con NaCl las plántulas control no presentaron cambios significativos en el contenido de ABA respecto a la condición basal lo cual contrasta con lo obtenido en la línea L3 en la cual se registró un aumento de 6,1 veces en el contenido de ABA luego de 24 horas de tratamiento con NaCl. De manera similar, en las plántulas T₁ de la línea L6 el nivel de ABA aumentó 2,2 veces luego de 24 horas de tratamiento con NaCl, alcanzando los 723 ng/g de peso seco y superando en 3,1 veces al valor determinado en plantas control en idénticas condiciones. Por último, luego de 48 horas de tratamiento, los niveles de ABA en ambas líneas transformadas con el gen *DcPsy2* disminuyeron

¹ Como punto de partida se decidió evaluar estos períodos de tiempo particulares para descartar posibles efectos del ciclo circadiano en los niveles de ABA (Novakova y cols., 2005)

respecto a las 24 horas no presentando cambios estadísticamente significativos en relación a lo observado en plántulas no tratadas con sal.

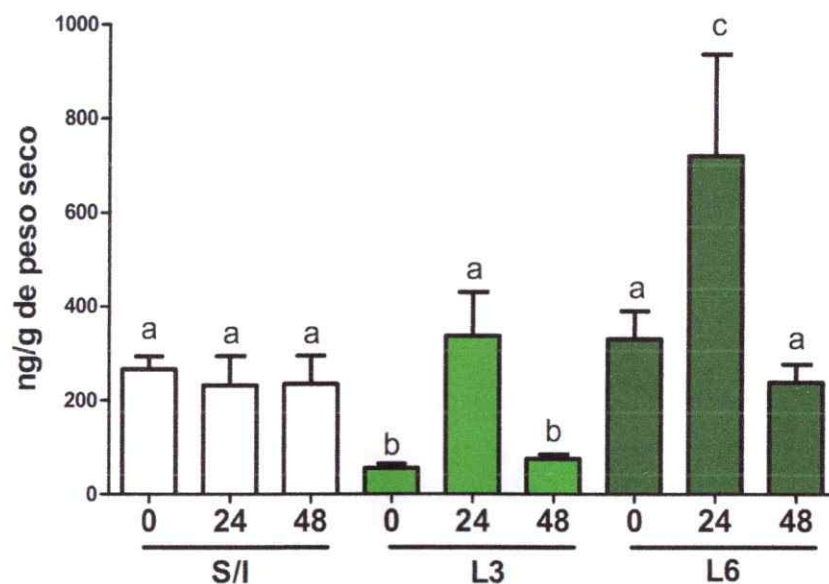


Figura 9. Determinación de los niveles de ABA en plantas de *N. tabacum* transformadas con el gen *DcPsy2*. Los niveles de ABA fueron calculados en la generación T₁ de las líneas de tabaco S/I, L3 y L6 luego de 0, 24 y 48 h de tratamiento con NaCl 250 mM. Cada determinación es representativa de 3 réplicas biológicas (n=30 plántulas por condición evaluada) cada una efectuada con 3 réplicas técnicas. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas calculadas con una prueba de *t* de 1 cola con un valor de $p < 0,05$.

DISCUSIÓN



4.1. Determinación de la transgénesis de las plantas de tabaco transformadas con el vector pGWB2/DcPsy2

Los resultados del presente trabajo destacan la eficiencia de la técnica de transformación de las plantas de *N. tabacum* pues las 8 líneas obtenidas presentaron la integración del T-DNA del vector pGWB2, lo que equivale al 100% de eficiencia (Figura 2).

4.2. Determinación de la expresión del gen *DcPsy2* en las plantas de tabaco transgénicas y su participación en la síntesis de carotenoides.

Mediante RT-PCR convencional se determinó la expresión de *DcPsy2* en 6 de las 8 plantas que registraron la integración del transgen (Figura 4). Al respecto, creemos que la no detección de transcrito en algunas líneas particulares, tiene directa relación con la metodología de transformación empleada; pues reportes previos han indicado que la expresión de genes de interés en organismos transformados depende del lugar de inserción en el genoma (Gelvin y cols., 2007). Particularmente, a través de la transformación con *A. tumefaciens*, que fue aplicada en el presente trabajo, la inserción del transgen en el genoma vegetal ocurre de manera azarosa lo que conduce, en algunos casos, a que esta última se produzca en regiones no activas o poco activas del genoma (como es el caso de regiones correspondientes a heterocromatina). Continuando con el análisis molecular y bioquímico, se procedió a determinar el contenido de carotenoides de cada línea que expresaba el transgen encontrándose 3 de éstas que satisfactoriamente mostraron incrementos significativos en el contenido

de al menos uno de los carotenoides detectados, en acuerdo con la hipótesis planteada (Figura 5). Estos resultados contrastan con estudios previos realizados en *N. tabacum* por otros autores (Busch y cols, 2002) y con lo obtenido en nuestros ensayos funcionales referentes al gen parálogo *DcPsy1* (Acevedo, 2011). En el primer caso, los actuales reportes indican que a través de la expresión aumentada del gen *NtPsy1* en *N. tabacum* se alcanza aumentar el contenido de carotenoides totales hasta un 16% mientras que mediante la expresión aumentada del gen parálogo *DcPsy1* este valor alcanza un 17%. No obstante, al expresar constitutivamente el gen *DcPsy2* de *D. carota*, se alcanzó un aumento del contenido de carotenoides totales de hasta un 57% lo cual destaca su potencial como candidato para aplicaciones biotecnológicas.

En segundo lugar, también cabe mencionar que se encontraron algunas líneas transformadas con el gen *DcPsy2* que registraron una disminución significativa de algunos carotenoides en particular y contenido inalterado de otros a pesar de expresar el transgen. Este resultado concuerda con lo obtenido por otros autores (Busch y cols, 2002) en algunas líneas transgénicas de *N. tabacum* que a pesar de tener una expresión aumentada del gen *NtPsy1* presentaban un contenido inalterado o bien disminuido de carotenoides totales; y también con lo reportado en plántulas de *A. thaliana* en donde la expresión constitutiva de *AtPsy* no condujo a un incremento del contenido de carotenoides en hojas (Maass y cols., 2009). Al respecto, se ha descrito que tanto el nivel de expresión de *Psy* como la coordinación entre la síntesis y acumulación de clorofilas y carotenoides tienen relación con estos comportamientos diferenciales (Härtel y cols., 1998; Busch y cols., 2002). De manera consecuente a lo reportado previamente, pudimos evidenciar que el nivel de expresión de *DcPsy2*, en las líneas con mayores niveles de carotenoides totales, se encuentra directamente

correlacionado con la cantidad de carotenoides registrados. Sin embargo, en aquellas plantas transgénicas, en que los carotenoides disminuyen o se mantienen, notamos un nivel de transcrito del gen *DcPsy2* significativamente mayor. Tal es el caso de la línea L4 que presenta niveles mayores de transcrito del transgen que las líneas L3 y L6 y un contenido inalterado con tendencia a la disminución de carotenoides totales. Esto último sugiere, en acuerdo con reportes previos, que la expresión de *DcPsy2* por sobre un determinado umbral conduce a una disminución significativa del contenido de carotenoides totales (Busch y cols, 2001; Acevedo 2011). En efecto, al cuantificar los niveles de transcrito del gen *DcPsy2* en todas nuestras líneas transgénicas mediante RT-PCR semicuantitativo (Figura S1, anexo) encontramos una expresión del transgen mayor que la registrada en la línea L4 en las líneas L1 y L2; cada una con disminuciones significativas del contenido de luteína lo cual confirma tal fenómeno. Además, como reportes previos han indicado que existe una estrecha coordinación entre los niveles de carotenoides y clorofila en el tejido fotosintético (Härtel y cols., 1998) y esta última tiene como precursor al GGPP (sustrato directo de la enzima PSY) decidimos evaluar si la expresión de *DcPsy2* podía estar afectando la acumulación de dicho pigmento (Figura S2, anexo). En relación con lo anterior, encontramos que las líneas L3 y L6, con mayores contenidos de β -caroteno que plantas silvestres, presentaron mayor contenido de clorofila a lo que se vincula directamente con el hecho de que ambos pigmentos se ubican en complejos junto a proteínas en los centros de reacción de los fotosistemas I y II (Bassi y cols., 1993) Además, las líneas L6 y L7, ambas con un contenido aumentado de luteína, presentaron incrementos significativos del contenido de clorofila *b* que de acuerdo a reportes anteriores se sitúa en conjunto con esta última en los complejos captadores de luz (Lee y cols., 1995). Por otro lado, las líneas L1 y L2 que presentaron una disminución significativa del contenido de

luteína presentaron también una disminución significativa de los niveles de clorofila *b*. No obstante, a pesar de que no se encontraron cambios significativos en el contenido de luteína en la línea L4 ésta si presentó una reducción significativa del contenido de clorofila *b* lo cual sugiere que los menores niveles de clorofila no son el único determinante en la disminución del contenido de carotenoides. Asimismo, las líneas L1, L2 y L4 a pesar de no presentar cambios significativos en los niveles de β -caroteno registraron una disminución significativa en los niveles de clorofila *a*.

En conjunto, estos resultados indican que la expresión del gen *DcPsy2* es capaz de afectar la síntesis de clorofila disminuyéndola significativamente cuando su nivel de expresión supera un determinado umbral y aumentándola cuando dicho nivel no logra ser alcanzado. Esto último, es interesante de analizar pues reportes previos han indicado que un aumento en los niveles de transcrito del gen *Psy* durante condiciones de estrés salino y el proceso de de-etiolación se correlacionan de manera directa con el aumento en los niveles de transcrito de genes involucrados en la síntesis de clorofila, generando que ambos pigmentos se acumulen de manera coordinada (Cheminant y cols., 2011; Meier y cols., 2011). Por esta razón, no descartamos la posibilidad de que la expresión constitutiva de *DcPsy2* pueda ocasionar un incremento en los niveles de transcrito de dichos genes lo que daría cuenta de los niveles aumentados de clorofila en las líneas L3, L6 y L7. Además, el hecho de que los niveles de clorofila se vean disminuidos significativamente en varias de nuestras líneas es un indicio de que el gen *DcPsy2* participa en la conversión de GGPP en fitoeno, que eventualmente ocurre a expensas de la síntesis de clorofilas y otros compuestos tales como giberelinas y quinonas (Fray y cols., 1995). En resumen, es destacable notar el hecho de que la expresión constitutiva del gen *DcPsy2* de *D. carota* en *N. tabacum*

podría ocasionar una significativa perturbación en los niveles normales de otros metabolitos que comparten precursores comunes con la ruta carotenogénica (Figura 10).

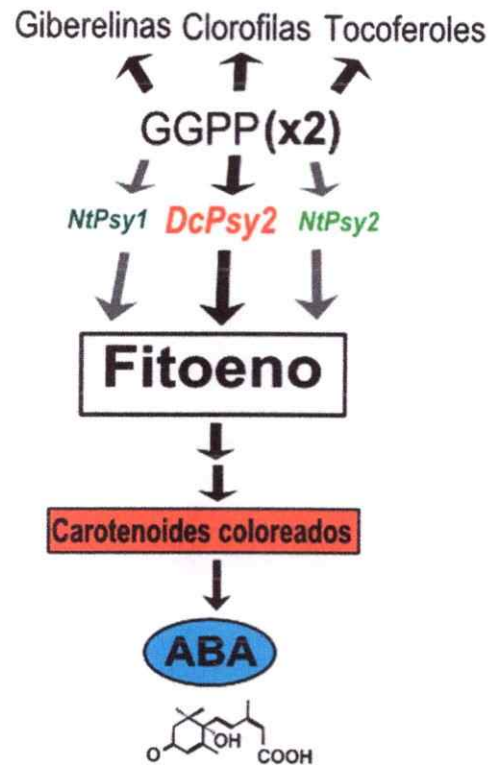


Figura 10. Representación de la conexión entre la ruta carotenogénica y otras rutas metabólicas que tienen como precursor al GGPP. Se ilustra la participación de los genes *Psy* endógenos de *N. tabacum* (verde) y del transgen (naranja) en la conversión de GGPP en fitoeno a expensas de otros metabolitos tales como giberelinas, clorofilas y tocoferoles.

4.3. Determinación de los niveles de expresión de genes carotenogénicos endógenos en las plantas de tabaco transgénicas.

Con el fin de continuar la caracterización funcional del gen *DcPsy2* y establecer si el aumento en el contenido de β -caroteno y carotenoides totales observado en las líneas L3 y L6 era un efecto más bien único y directo de la expresión de *DcPsy2* se determinó la expresión de los genes *NtPsy1* y *NtPsy2* en ambas líneas transgénicas. Esta caracterización fue realizada pues reportes previos indicaron que la expresión constitutiva de algunos genes de *D. carota* en *N. tabacum* era capaz de modular la expresión de algunos genes carotenogénicos endógenos (Moreno, 2011). La observación de que las 2 líneas que presentaron un contenido aumentado de carotenoides totales presentaron una disminución significativa en la expresión de los transcritos endógenos de *Psy* al igual que la línea L4; y que esta última no registró cambios significativos del contenido de carotenoides, demuestran la funcionalidad del transgen que ejercería un efecto directo en el aumento de carotenoides a través de su expresión. Además, notamos una correlación directa entre el porcentaje de reducción de ambos transcritos y el contenido de carotenoides totales registrados en cada una de estas líneas lo cual abre la posibilidad de que algún producto de la ruta este ejerciendo el efecto modulador en la transcripción de ambos genes endógenos tal como ha sido previamente descrito en otros modelos vegetales (Kachanovsky y cols., 2012) Esto último, también es un punto importante de destacar pues refleja que la expresión constitutiva del gen *DcPsy2* en el modelo vegetal *N. tabacum* genera una modificación significativa en la ruta carotenogénica endógena de este organismo vinculada probablemente con establecer un nuevo equilibrio en el sistema.

Por otro lado, y en acuerdo con la funcionalidad del transgen, observamos que las líneas con mayores aumentos del contenido de β -caroteno, presentaron niveles menores o inalterados del gen *NtLcyb* (involucrado directamente en la síntesis de β -caroteno) respecto a plantas control sugiriendo que la expresión constitutiva de *DcPsy2* es suficiente para aumentar el contenido de este pigmento tal como se reportó en algunas líneas de tabaco que tenían una expresión aumentada de los genes *Psy* endógenos (Busch y cols., 2002). En la línea L4, sin embargo observamos un aumento significativo en la transcripción del gen *NtLcyb* lo cual sugiere que la expresión de *DcPsy2* por sobre un determinado umbral conduce al aumento de los niveles de transcrito de este gen en particular.

4.4. Determinación de la participación del gen *DcPsy2* en la síntesis de fitoeno

Ya que el fitoeno no es detectado bajo condiciones normales de crecimiento en hojas, el tratamiento agudo con el herbicida NFZ, ha sido una estrategia usada por varios autores para cuantificar la acumulación del precursor incoloro fitoeno (Simkin y cols., 2003; Li y cols., 2006). Las plántulas utilizadas en este experimento fueron obtenidas a partir de la generación T_1 de las líneas L3, L6 y S/I caracterizadas por su contenido de carotenoides aumentado en la generación T_0 siendo paralelamente sujetas a un análisis molecular destinado a verificar la expresión del transgen.

Al respecto, notamos que en todas las condiciones evaluadas el transgen se expresó activamente en las líneas transformadas con el gen *DcPsy2* (Tabla I). Sin embargo se observan diferencias significativas en su expresión luego de tratar las plántulas con el herbicida NFZ lo cual, teniendo en cuenta que la expresión de este gen

está dirigida por el promotor constitutivo 35S, sugiere la existencia de un mecanismo que afecta de manera de manera diferencial la acumulación de este ARNm en específico para cada una de las líneas comparadas luego del tratamiento con NFZ.

En relación al contenido de fitoeno, se determinó que efectivamente la expresión del transgen conduce a un aumento significativo de este carotenoide incoloro. Un aspecto importante de considerar, es que luego de aplicar NFZ se observa una reducción en los niveles de transcrito de ambos genes *Psy* endógenos en plantas control y un aumento de éstos en las plántulas T₁ de las líneas L3 y L6 en directa correlación con la expresión del transgen (Tabla I). Esto último, contrasta con reportes previos en los que se ha descrito que la aplicación de NFZ puede aumentar o no afectar de manera significativa la expresión de los genes *Psy* (Bartley y cols., 1993; Simkin y cols., 2003; Li y cols., 2006). Sin embargo estos estudios en particular fueron realizados en otras especies vegetales y en temporalidades diferentes a las empleadas en el presente trabajo. Como caso representativo de lo anterior están descritos algunos estudios en plántulas de tomate en los cuales se determinó que tras la incubación con NFZ se observaba un aumento significativo de los niveles de transcrito del gen *SIPsy1* no así del parólogo *SIPsy2* (Bartley y cols., 1993) y adicionalmente un aumento significativo del contenido de carotenoides totales como consecuencia de una elevada producción de fitoeno por sobre otros carotenoides coloreados (Simkin y cols., 2003) mediante un mecanismo de retroalimentación positiva dirigido por algún producto final de la ruta como por ejemplo ABA (Giuliano y cols., 1993) En nuestro caso también observamos un aumento del contenido de carotenoides totales tras aplicar este compuesto, tanto en las líneas T₁ S/I y L6 (Figura S3, panel C, anexo) lo cual sugiere que efectivamente el herbicida tiene el efecto de aumentar la síntesis de carotenoides;

específicamente a nivel del fitoeno (pues los niveles de carotenoides coloreados luteína y β -caroteno disminuyeron significativamente tras aplicar NFZ en todas las plántulas analizadas, Figura S3, anexo paneles A y B). Por lo tanto, una posible explicación de los resultados obtenidos en nuestras plantas transformadas con *DcPsy2* es que la expresión constitutiva del transgen constituye una fuente continua de síntesis de ABA capaz de generar un aumento sostenido de los niveles de transcrito de ambos genes *Psy* endógenos tras aplicar NFZ, que posteriormente conduce a mayores niveles de fitoeno respecto a plantas control. No obstante, hipotetizamos que en la generación T₁ de la línea L3 en particular no observamos tal incremento, pues esta última presenta menores niveles de transcrito de ambos genes *Psy* endógenos tras el tratamiento con NFZ respecto a plántulas control en idénticas condiciones (Tabla I) y adicionalmente un menor nivel de transcrito del transgen en comparación a la línea L6.

Por último, cabe mencionar que probablemente los niveles de transcrito de ambos genes *Psy* endógenos si aumenten en las plántulas T₁ S/I luego de ser tratadas con NFZ, lo cual explicaría el mayor contenido de carotenoides totales que registran tras ser tratadas con NFZ (Figura S3, panel C, anexo), solo que en un tiempo inferior al estudiado y luego estos caen hasta niveles menores que los registrados en condición normal como consecuencia de la disminución de los niveles de ABA ocasionada por el bloqueo de la ruta carotenógena tras la aplicación de NFZ tal como ha sido previamente descrito (Suttle y cols., 1993).

4.5. Determinación de la participación del gen *DcPsy2* en la tolerancia al estrés por sal y la síntesis de ABA

Considerando reportes previos en los que la expresión heteróloga de genes *Psy* ha contribuido a aumentar la tolerancia al estrés por sal de organismos vegetales modelo (Han y cols, 2008; Cidade y cols 2012) se decidió investigar si la expresión constitutiva del gen *DcPsy2* era capaz de aumentar la tolerancia al estrés por sal en plantas de *N. tabacum*.

Satisfactoriamente encontramos que en dos líneas independientes que expresaban constitutivamente el gen *DcPsy2* aumentó significativamente la tolerancia al estrés por sal en una correlación directa a la expresión del transgen (Figuras 7 y 8).

En primer lugar, observamos una menor reducción del peso fresco tras aplicar el estrés por sal en las plántulas transformadas con *DcPsy2* (Figura 7). Sin embargo también notamos una reducción significativa del peso fresco en las plántulas que presentaron una mayor expresión del transgen en condiciones normales de crecimiento. Este último hecho es atribuible a que un aumento en los niveles de transcrito del gen *Psy* por sobre un determinado umbral podría interferir con el curso normal de la síntesis de giberelinas las cuales promueven el crecimiento celular (Fray y cols., 1995).

Por otro lado, y en relación con la menor disminución del crecimiento de las plántulas que expresaban *DcPsy2* tras ser tratadas con NaCl, postulamos que este patrón de comportamiento podría tener su origen en una homeostasis mejorada en cuanto a los niveles de pérdida de agua que ocurren frente a esta condición de estrés abiótico (Fricke y cols., 2002; Munns, 2002) hipótesis que además es pausable con el

hecho de que el agua contribuye de manera importante con el crecimiento de las células vegetales (Cosgrove, 1993).

Además, observamos que la sobrevivencia de las plántulas transformadas con *DcPsy2* fue significativamente mayor que la registrada en plantas control luego de aplicar el estrés salino, lo cual nuevamente se correlaciona con el nivel de expresión del transgen (Figura 8). En relación a lo anterior, cabe mencionar que una mayor sobrevivencia de las plántulas luego de ser tratadas con NaCl podría ser consecuencia de un algún mecanismo de prevención del daño oxidativo que genera la condición de salinidad, pues reportes previos indican que la exposición de plántulas al estrés salino genera un aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno que dañan diversos componentes celulares conduciendo eventualmente a la muerte del organismo en cuestión (Jacoby, 1994; Dat y cols., 2000).

Por otra parte, los niveles basales de ABA significativamente disminuidos en la línea L3 e inalterados en la línea L6 (Figura 9) contrastan con reportes previos en los que se ha indicado que la tolerancia aumentada de algunos organismos transgénicos está vinculada con mayores niveles de ABA en condiciones normales de crecimiento (Cidade y cols 2012; Qin y cols, 2002). Al respecto, proponemos que este perfil de los niveles de ABA en condiciones basales de las líneas transformadas con *DcPsy2* sería consecuencia de un efecto regulador del transgen en alguno de los puntos que conduce a la acumulación de ABA bajo condiciones normales, aspecto importante de discutir, pues los niveles de β -caroteno, el cual pertenece a la rama en la ruta carotenogénica que da origen al ABA, están inalterados respecto a plantas control en la línea L3 y aumentados en la línea L6 (Figura S3, panel B, anexo), con lo cual es factible esperar un contenido inalterado o mayor de ABA en estas plántulas

respectivamente. Por ello, es posible sugerir que algunos de los genes relacionados con la síntesis o degradación de ABA estén disminuidos o aumentados respectivamente en estas líneas particulares bajo condiciones normales de crecimiento.

En contraste con lo anterior, observamos que tanto en la línea L3 como en la línea L6 existe un aumento significativo del contenido de ABA luego de aplicar el estrés salino por 24 horas el cual no es observado en ninguno de los tiempos analizados en plantas S/I. Cabe mencionar, que tal comportamiento podría ser consecuencia de un efecto de retroalimentación positiva ejercido por el transgen en los niveles de transcrito de ambos genes *Psy* endógenos tras el tratamiento con NaCl de manera similar a lo observado luego del tratamiento con NFZ, en donde se observó que los niveles de ambos transcritos endógenos aumentan tras aplicar el herbicida en las líneas que expresan el gen *DcPsy2*. Esto último, sugiere que la mayor tolerancia de las plantas que expresan el transgen podría deberse, entre otros factores, a que la expresión constitutiva de *DcPsy2* permite un incremento de ABA que ocurre de manera más temprana o bien es sostenido en mayor medida que en plantas control. De esta manera, la expresión conjunta del transgen y ambos genes *Psy* endógenos conducen a un aumento en el nivel de ABA en las plántulas T₁ de las líneas L3 y L6 luego del 24 horas de tratamiento con NaCl

Por último, no descartamos la posibilidad de que el aumento en la tolerancia de las líneas transformadas con *DcPsy2* sea consecuencia también de un mayor contenido de carotenoides bajo condiciones de estrés salino considerando la función antioxidante de estos pigmentos y el daño oxidativo que genera la salinidad (Chen y cols., 2011). Sin embargo, en este experimento en particular sólo decidimos

enfocarnos en determinar los niveles de ABA acumulado tras la exposición de las plántulas al estrés por sal (y paralelamente en condiciones normales) pues previamente ya habíamos caracterizado la participación del gen *DcPsy2* en la síntesis de carotenoides. Por lo tanto, aun cuando nuestros resultados no otorgan completa claridad acerca del mecanismo que daría cuenta de la mayor tolerancia a la salinidad de las líneas transformadas con *DcPsy2* si dejan en evidencia la participación de este gen en la síntesis y acumulación de ABA lo cual es una prueba adicional de su funcionalidad y paralelamente resuelve nuestro objetivo previamente planteado.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo son las siguientes:

1. El gen *DcPsy2* es funcional en el modelo vegetal *N. tabacum* pues su expresión constitutiva aumentó de manera significativa el contenido de carotenoides totales a pesar de generar una disminución significativa de los niveles de transcrito de los genes endógenos *NtPsy1* y *NtPsy2*, cuya expresión es determinante en el contenido de carotenoides de esta especie en particular.
2. Sin embargo, también notamos que existe variabilidad entre las diferentes líneas transgénicas obtenidas lo cual se refleja en niveles de carotenoides y expresión desigual del transgen.
3. La expresión constitutiva del gen *DcPsy2* contribuye de manera significativa en la síntesis de fitoeno mediante un mecanismo que involucra la acción cooperativa de los genes *NtPsy1* y *NtPsy2* presentes en este sistema heterólogo.
4. La expresión de *DcPsy2* en *N. tabacum* aumentó significativamente el peso fresco y la sobrevivencia de plántulas transgénicas bajo condiciones de estrés salino hecho que lo cataloga como un interesante candidato a nivel biotecnológico para aumentar la tolerancia al estrés por sal de organismos vegetales.

5. La expresión constitutiva de este gen carotenógeno aumentó el nivel de ABA bajo condiciones de salinidad; comportamiento que probablemente se vincula con la mayor tolerancia de las plántulas transgénicas a dicha condición, y que a la vez otorga una prueba adicional acerca de su funcionalidad.

6. Por último, cabe mencionar que en conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la hipótesis planteada, que indica que la expresión constitutiva del gen *DcPsy2* conduce a un incremento de: el contenido de carotenoides coloreados, fitoeno, la tolerancia al estrés salino y la síntesis de ABA bajo tales condiciones.

BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, O. 2011. Estudio de la funcionalidad de los genes fitoeno sintasa (*DcPsy1* y *DcPsy2*) de *Daucus carota* en el modelo vegetal *Nicotiana tabacum*. Seminario de título para optar al título de Ing. en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C. y Shahidi, F. 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J Agric Food Chem* 49 (3): 1410-1416.
- Aluru, M., Xu, Y., Guo, R., Wang, Z., Li, S., White, W., Wang, K. y Rodermel, S. 2008. Generation of transgenic maize with enhanced provitamin A content. *J Exp Bot* 59 (13): 3551-3562.
- 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. *J Exp Bot* 60 (13): 3765-3779.
- Apel, W. y Bock, R. 2009. Enhancement of carotenoid biosynthesis in transplastomic tomatoes by induced lycopene-to-provitamin A conversion. *Plant Physiol* 151 (1): 59-66.
- Arango, J., Wust, F., Beyer, P. y Welsch, R. 2010. Characterization of phytoene synthases from cassava and their involvement in abiotic stress-mediated responses. *Planta* 232 (5): 1251-1262.
- Bae, G. y Choi, G. 2008. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu Rev Plant Biol* 59: 281-311.
- Barrero, J. M., Rodriguez, P. L., Quesada, V., Alabadi, D., Blazquez, M. A., Boutin, J. P., Marion-Poll, A., Ponce, M. R. y Micol, J. L. 2008. The ABA1 gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 31 (2): 227-234.
- Bartley, G. E. y Scolnik, P. A. 1993. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J Biol Chem* 268 (34): 25718-25721.
- Bartley, G. E., Viitanen, P. V., Bacot, K. O. y Scolnik, P. A. 1992. A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *J Biol Chem* 267 (8): 5036-5039.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. y Marquardt, J. 1993. Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *Eur J Biochem* 212 (2): 297-303.
- Bode, S., Quentmeier, C. C., Liao, P. N., Hafi, N., Barros, T., Wilk, L., Bittner, F. y Walla, P. J. 2009. On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (30): 12311-12316.
- Borghesi, E., Gonzalez-Miret, M. L., Escudero-Gilete, M. L., Malorgio, F., Heredia, F. J. y Melendez-Martinez, A. J. 2011. Effects of salinity stress on carotenoids, anthocyanins, and color of diverse tomato genotypes. *J Agric Food Chem* 59 (21): 11676-11682.

- Bouvier, F., Isner, J. C., Dogbo, O. y Camara, B. 2005. Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci* 10 (4): 187-194.
- Bramley, P. M. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J Exp Bot* 53 (377): 2107-2113.
- Breitenbach, J., Zhu, C. y Sandmann, G. 2001. Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J Agric Food Chem* 49 (11): 5270-5272.
- Buckner, B., Miguel, P. S., Janick-Buckner, D. y Bennetzen, J. L. 1996. The y1 gene of maize codes for phytoene synthase. *Genetics* 143 (1): 479-488.
- 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 (5): 1071-1078.
- Busch, M., Seuter, A. y Hain, R. 2002. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* 128 (2): 439-453.
- Carvajal, R. 2010. Complementación funcional en un sistema heterólogo del gen fitoeno sintasa 1 (psy1), involucrado en la biosíntesis de carotenoides en *Daucus carota* (zanahoria). Seminario de título para optar al título de Bioquímico. Universidad Católica de Valparaíso.
- Castillon, A., Shen, H. y Huq, E. 2007. Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12 (11): 514-521.
- Cazzonelli, C. I., Cuttriss, A. J., Cossetto, S. B., Pye, W., Crisp, P., Whelan, J., Finnegan, E. J., Turnbull, C. y Pogson, B. J. 2009. Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell* 21 (1): 39-53.
- Cazzonelli, C. I. y Pogson, B. J. 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 15 (5): 266-274.
- Cidade, L. C., de Oliveira, T. M., Mendes, A. F., Macedo, A. F., Floh, E. I., Gesteira, A. S., Soares-Filho, W. S. y Costa, M. G. 2012. Ectopic expression of a fruit phytoene synthase from *Citrus paradisi* Macf. promotes abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Mol Biol Rep* 39 (12): 10201-10209.
- Clotault, J., Peltier, D., Berruyer, R., Thomas, M., Briard, M. y Geoffriau, E. 2008. Expression of carotenoid biosynthesis genes during carrot root development. *J Exp Bot* 59 (13): 3563-3573.
- Cosgrove, D. J. 1993. Water uptake by growing cells: an assessment of the controlling roles of wall relaxation, solute uptake, and hydraulic conductance. *Int J Plant Sci* 154 (1): 10-21.
- Cunningham, F. X. y Gantt, E. 1998. Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 557-583.
- Cheminant, S., Wild, M., Bouvier, F., Pelletier, S., Renou, J. P., Erhardt, M., Hayes, S., Terry, M. J., Genschik, P. y Achard, P. 2011. DELLAs regulate chlorophyll and carotenoid biosynthesis to prevent photooxidative damage during seedling deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23 (5): 1849-1860.
- Chen, X., Han, H., Jiang, P., Nie, L., Bao, H., Fan, P., Lv, S., Feng, J. y Li, Y. 2011. Transformation of beta-lycopene cyclase genes from *Salicornia europaea* and

- Arabidopsis conferred salt tolerance in Arabidopsis and tobacco. *Plant Cell Physiol* 52 (5): 909-921.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I. y Florou-Paneri, P. 2012. Functional properties of carotenoids originating from algae. *J Sci Food Agric*.
- Christensen, R. L., Barney, E. A., Broene, R. D., Galinato, M. G. y Frank, H. A. 2004. Linear polyenes: models for the spectroscopy and photophysics of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 430 (1): 30-36.
- Dall'Osto, L., Fiore, A., Cazzaniga, S., Giuliano, G. y Bassi, R. 2007. Different roles of alpha- and beta-branch xanthophylls in photosystem assembly and photoprotection. *J Biol Chem* 282 (48): 35056-35068.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. y Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 57 (5): 779-795.
- Davies, W J y Zhang, J. 1991. Root Signals and the Regulation of Growth and Development of Plants in Drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42 (1): 55-76.
- Diretto, G., Al-Babili, S., Tavazza, R., Papacchioli, V., Beyer, P. y Giuliano, G. 2007. Metabolic engineering of potato carotenoid content through tuber-specific overexpression of a bacterial mini-pathway. *PLoS One* 2 (4): e350.
- Dogbo, O., Laferriere, A., D'Harlingue, A. y Camara, B. 1988. Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (19): 7054-7058.
- Fierce, Y., de Moraes Vieira, M., Piantedosi, R., Wyss, A., Blaner, W. S. y Paik, J. 2008. In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch Biochem Biophys* 472 (2): 126-138.
- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. y Rock, C. D. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 Suppl: S15-45.
- Fraser, P. D., Enfissi, E. M., Halket, J. M., Truesdale, M. R., Yu, D., Gerrish, C. y Bramley, P. M. 2007. Manipulation of phytoene levels in tomato fruit: effects on isoprenoids, plastids, and intermediary metabolism. *Plant Cell* 19 (10): 3194-3211.
- Fraser, P. D., Kiano, J. W., Truesdale, M. R., Schuch, W. y Bramley, P. M. 1999. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol* 40 (4): 687-698.
- Fraser, P. D., Truesdale, M. R., Bird, C. R., Schuch, W. y Bramley, P. M. 1994. Carotenoid Biosynthesis during Tomato Fruit Development (Evidence for Tissue-Specific Gene Expression). *Plant Physiol* 105 (1): 405-413.
- Fray, Rupert G., Wallace, Andrew, Fraser, Paul D., Valero, Daniel, Hedden, Peter, Bramley, Peter M. y Grierson, Donald. 1995. Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway. *The Plant Journal* 8 (5): 693-701.
- Fricke, W. y Peters, W. S. 2002. The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiol* 129 (1): 374-388.
- Fuentes, P. 2011. Identificación y análisis estructural y funcional de los promotores de los genes carotenogénicos DcPsy2 y DcLcyb1 de *Daucus carota*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias.
- Fuentes, P., Pizarro, L., Moreno, J. C., Handford, M., Rodríguez-Concepcion, M. y Stange, C. 2012. Light-dependent changes in plastid differentiation influence

- carotenoid gene expression and accumulation in carrot roots. *Plant Mol Biol* 79 (1-2): 47-59.
- Galpaz, N., Wang, Q., Menda, N., Zamir, D. y Hirschberg, J. 2008. Abscisic acid deficiency in the tomato mutant high-pigment 3 leading to increased plastid number and higher fruit lycopene content. *Plant J* 53 (5): 717-730.
- Gelvin, Stanton B. y Kim, Sang-Ic. 2007. Effect of chromatin upon Agrobacterium T-DNA integration and transgene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1769 (5-6): 410-421.
- Giorio, G., Stigliani, A. L. y D'Ambrosio, C. 2008. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* 275 (3): 527-535.
- Giuliano, G., Bartley, G. E. y Scolnik, P. A. 1993. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato development. *Plant Cell* 5 (4): 379-387.
- Giuliano, G., Tavazza, R., Diretto, G., Beyer, P. y Taylor, M. A. 2008. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Biotechnol* 26 (3): 139-145.
- Golovko, T., Dymova, O., Zakhochiy, I., Dalke, I. y Tabalenkova, G. 2012. Photoprotection by carotenoids of *Plantago media* photosynthetic apparatus in natural conditions. *Acta Biochim Pol* 59 (1): 145-147.
- Gotz, T., Sandmann, G. y Romer, S. 2002. Expression of a bacterial carotene hydroxylase gene (*crtZ*) enhances UV tolerance in tobacco. *Plant Mol Biol* 50 (1): 129-142.
- Grabarek, Zenon y Gergely, John. 1990. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical Biochemistry* 185 (1): 131-135.
- Guo, X., Yang, L. y Hu, H. 2009. Cloning and expression analysis of carotenogenic genes during ripening of autumn olive fruit (*Elaeagnus umbellata*). *J Agric Food Chem* 57 (12): 5334-5339.
- Han, H., Li, Y. y Zhou, S. 2008. Overexpression of phytoene synthase gene from *Salicornia europaea* alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett* 30 (8): 1501-1507.
- Hartel, H., Kruse, E. y Grimm, B. 1997. Restriction of Chlorophyll Synthesis Due to Expression of Glutamate 1-Semialdehyde Aminotransferase Antisense RNA Does Not Reduce the Light-Harvesting Antenna Size in Tobacco. *Plant Physiol* 113 (4): 1113-1124.
- Härtel, Heiko y Grimm, Bernhard. 1998. Consequences of chlorophyll deficiency for leaf carotenoid composition in tobacco synthesizing glutamate 1-semialdehyde aminotransferase antisense RNA: dependency on developmental age and growth light. *Journal of Experimental Botany* 49 (320): 535-546.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. y Bohnert, H. J. 2000. Plant Cellular and Molecular Responses to High Salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 463-499.
- Havaux, M. y Tardy, F. 1997. Photoacoustically monitored thermal energy dissipation and xanthophyll cycle carotenoids in higher plant leaves. *J Photochem Photobiol B* 40 (1): 68-75.
- Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr Opin Plant Biol* 4 (3): 210-218.
- Howitt, C. A. y Pogson, B. J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ* 29 (3): 435-445.

- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D. y Hirschberg, J. 2002. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* 14 (2): 333-342.
- Ito, M., Yamano, Y., Tode, C. y Wada, A. 2009. Carotenoid synthesis: retrospect and recent progress. *Arch Biochem Biophys* 483 (2): 224-228.
- Jacoby, B 1994. Mechanisms involved in salt tolerance in plants. En: Handbook of Plant and Crop Stress (M. Pessarakli, ed) Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 97-123.
- Jakab, G., Ton, J., Flors, V., Zimmerli, L., Mettraux, J. P. y Mauch-Mani, B. 2005. Enhancing Arabidopsis salt and drought stress tolerance by chemical priming for its abscisic acid responses. *Plant Physiol* 139 (1): 267-274.
- Kachanovsky, D. E., Filler, S., Isaacson, T. y Hirschberg, J. 2012. Epistasis in tomato color mutations involves regulation of phytoene synthase 1 expression by cis-carotenoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (46): 19021-19026.
- Karvouni, Z., John, I., Taylor, J. E., Watson, C. F., Turner, A. J. y Grierson, D. 1995. Isolation and characterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase. *Plant Mol Biol* 27 (6): 1153-1162.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H., Sugiura, M., Hyodo, H. y Yano, M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiol* 134 (2): 824-837.
- Khandelwal, A., Cho, S. H., Marella, H., Sakata, Y., Perroud, P. F., Pan, A. y Quatrano, R. S. 2010. Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. *Science* 327 (5965): 546.
- Kita, M., Kato, M., Ban, Y., Honda, C., Yaegaki, H., Ikoma, Y. y Moriguchi, T. 2007. Carotenoid accumulation in Japanese apricot (*Prunus mume* Siebold & Zucc.): molecular analysis of carotenogenic gene expression and ethylene regulation. *J Agric Food Chem* 55 (9): 3414-3420.
- Kopsell, D. A., Armel, G. R., Mueller, T. C., Sams, C. E., Deyton, D. E., McElroy, J. S. y Kopsell, D. E. 2009. Increase in nutritionally important sweet corn kernel carotenoids following Mesotrione and atrazine applications. *J Agric Food Chem* 57 (14): 6362-6368.
- Krinsky, N. I. y Johnson, E. J. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 26 (6): 459-516.
- Lee, A. I. y Thornber, J. P. 1995. Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant Physiol* 107 (2): 565-574.
- Leivar, P., Monte, E., Oka, Y., Liu, T., Carle, C., Castillon, A., Huq, E. y Quail, P. H. 2008. Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr Biol* 18 (23): 1815-1823.
- Li, F., Vallabhaneni, R. y Wurtzel, E. T. 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant Physiol* 146 (3): 1333-1345.
- Li, F., Vallabhaneni, R., Yu, J., Rocheford, T. y Wurtzel, E. T. 2008. The maize phytoene synthase gene family: overlapping roles for carotenogenesis in endosperm, photomorphogenesis, and thermal stress tolerance. *Plant Physiol* 147 (3): 1334-1346.
- Li, Li, Lu, Shan, Cosman, Kelly M., Earle, Elizabeth D., Garvin, David F. y O'Neill, Jennifer. 2006. β -Carotene accumulation induced by the cauliflower Or gene is

- not due to an increased capacity of biosynthesis. *Phytochemistry* 67 (12): 1177-1184.
- Lindgren, L. O., Stalberg, K. G. y Hoglund, A. S. 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 Physiol* 132 (2): 779-785.
- Lois, L. M., Rodriguez-Concepcion, M., Gallego, F., Campos, N. y Boronat, A. 2000. Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J* 22 (6): 503-513.
- Luchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 2001. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 27 (4): 325-333.
- Maas, E. V. y Poss, J. A. 1989. Salt sensitivity of wheat at various growth stages. *Irrigation Science* 10 (1): 29-40.
- Maass, D., Arango, J., Wust, 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.
- McGraw, K. J. y Nogare, M. C. 2004. Carotenoid pigments and the selectivity of psittacofulvin-based coloration systems in parrots. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138 (3): 229-233.
- Meier, S., Tzfadia, O., Vallabhaneni, R., Gehring, C. y Wurtzel, E. T. 2011. A transcriptional analysis of carotenoid, chlorophyll and plastidial isoprenoid biosynthesis genes during development and osmotic stress responses in Arabidopsis thaliana. *BMC Syst Biol* 5: 77.
- Mittler, R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11 (1): 15-19.
- Moon, J., Zhu, L., Shen, H. y Huq, E. 2008. PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (27): 9433-9438.
- Moran, N. A. y Jarvik, T. 2010. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* 328 (5978): 624-627.
- Moreno, J. C., Pizarro, L., Fuentes, P., Handford, M., Cifuentes, V. y Stange, C. 2013. Levels of lycopene beta-cyclase 1 modulate carotenoid gene expression and accumulation in Daucus carota. *PLoS One* 8 (3): e58144.
- Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25 (2): 239-250.
- Nagao, A. 2009. Absorption and function of dietary carotenoids. *Forum Nutr* 61: 55-63.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* 56: 165-185.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45.
- Polli, D., Cerullo, G., Lanzani, G., De Silvestri, S., Yanagi, K., Hashimoto, H. y Cogdell, R. J. 2004. Conjugation length dependence of internal conversion in carotenoids: role of the intermediate state. *Phys Rev Lett* 93 (16): 163002.
- Qin, X. y Zeevaart, J. A. 2002. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in Nicotiana plumbaginifolia increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol* 128 (2): 544-551.

- Rehak, M., Fric, E. y Wiedemann, P. 2008. Lutein and antioxidants in the prevention of age-related macular degeneration. *Ophthalmologie* 105 (1): 37-38, 40-35.
- Rock, C. D. y Zeevaart, J. A. 1991. The aba mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (17): 7496-7499.
- Rodriguez-Villalon, A., Gas, E. y Rodriguez-Concepcion, 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 (3): 424-435.
- Romer, S., Huguene, P., Bouvier, F., Camara, B. y Kuntz, M. 1993. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annum*. *Biochem Biophys Res Commun* 196 (3): 1414-1421.
- Romero-Aranda, R., Soria, T. y Cuartero, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci* 160 (2): 265-272.
- Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D. y Hirschberg, J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J* 17 (4): 341-351.
- Ruban, A. V., Pascal, A., Lee, P. J., Robert, B. y Horton, P. 2002. Molecular configuration of xanthophyll cycle carotenoids in photosystem II antenna complexes. *J Biol Chem* 277 (45): 42937-42942.
- Ruban, A. V., Young, A. J., Pascal, A. A. y Horton, P. 1994. The Effects of Illumination on the Xanthophyll Composition of the Photosystem II Light-Harvesting Complexes of Spinach Thylakoid Membranes. *Plant Physiol* 104 (1): 227-234.
- Ruiz-Sola, M. A. y Rodriguez-Concepcion, M. 2012. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: a colorful pathway. *Arabidopsis Book* 10: e0158.
- Rutledge, R. G. y Cote, C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31 (16): e93.
- Scolnik, P. A. y Bartley, G. E. 1994. Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase. *Plant Physiol* 104 (4): 1471-1472.
- Schledz, M., al-Babili, S., von Lintig, J., Haubruck, H., Rabbani, S., Kleinig, H. y Beyer, P. 1996. Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering. *Plant J* 10 (5): 781-792.
- Seo, M. y Koshiba, T. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7 (1): 41-48.
- Shewmaker, C. K., Sheehy, J. A., Daley, M., Colburn, S. y Ke, D. Y. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J* 20 (4): 401-412X.
- Siefermann-Harms, D. 1990. Chlorophyll, carotenoids and the activity of the xanthophyll cycle. *Environ Pollut* 68 (3-4): 293-303.
- Simkin, A. J., Laboure, A. M., Kuntz, M. y Sandmann, G. 2003. Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves. *Z Naturforsch C* 58 (5-6): 371-380.
- Soll, J. y Schleiff, E. 2004. Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (3): 198-208.
- Stephenson, Patrick G., Fankhauser, Christian y Terry, Matthew J. 2009. PIF3 is a repressor of chloroplast development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (18): 7654-7659.

- Suttle, J. C. y Hultstrand, J. F. 1993. Involvement of Abscisic Acid in Ethylene-Induced Cotyledon Abscission in Cotton Seedlings. *Plant Physiol* 101 (2): 641-646.
- Tanaka, Y., Sasaki, N. y Ohmiya, A. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 54 (4): 733-749.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. y Rodriguez-Concepcion, M. 2010. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (25): 11626-11631.
- Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol* 428: 419-438.
- Verslues, P. E. y Bray, E. A. 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot* 57 (1): 201-212.
- 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 *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* 12 (3): 625-634.
- Wade, N. M., Tollenaere, A., Hall, M. R. y Degnan, B. M. 2009. Evolution of a novel carotenoid-binding protein responsible for crustacean shell color. *Mol Biol Evol* 26 (8): 1851-1864.
- Welsch, R., Wust, F., Bar, 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 Physiol* 147 (1): 367-380.
- Young, A. J. y Lowe, G. M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 385 (1): 20-27.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X. y Tan, M. 2007. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytol* 175 (1): 36-50.
- Zhang, Y., Tan, J., Guo, Z., Lu, S., He, S., Shu, W. y Zhou, B. 2009. Increased abscisic acid levels in transgenic tobacco over-expressing 9 cis-epoxycarotenoid dioxygenase influence H₂O₂ and NO production and antioxidant defenses. *Plant Cell Environ* 32 (5): 509-519.
- Zhang, Yiming, Yang, Jinfen, Lu, Shaoyun, Cai, Jiongliang y Guo, Zhenfei. 2008. Overexpressing SgNCED1 in Tobacco Increases ABA Level, Antioxidant Enzyme Activities, and Stress Tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 27 (2): 151-158.
- Zhu, C., Bai, C., Sanahuja, G., Yuan, D., Farre, G., Naqvi, S., Shi, L., Capell, T. y Christou, P. 2010. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Arch Biochem Biophys* 504 (1): 132-141.
- Zhu, C. F., Chen, X. y Wang, Y. D. 2004. Carotenoid biosynthesis in plants and application of its relative genes in gene engineering. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 30 (6): 609-618.

ANEXO

7.1. Programas de PCR y RT-PCR convencional empleados en este trabajo.

Tabla II. Programa de PCR convencional para amplificar el gen *18S*

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	95°C/ 4 min.	95°C/ 45 seg.	72°C/10 min.
Paso 2	--	55°C/45 seg.	--
Paso 3	--	72°C/45 seg.	--
N° de ciclos	1	28	1

Tabla III. Programa de PCR convencional para amplificar el gen *HptII*

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	95°C/ 4 min.	95°C/ 30 seg.	72°C/10 min.
Paso 2	--	60°C/45 seg.	--
Paso 3	--	72°C/45 seg.	--
N° de ciclos	1	35	1

Tabla IV. Programa de PCR convencional para amplificar el gen *DcPsy2*

	Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Paso 1	95°C/ 4 min.	95°C/ 30 seg.	72°C/10 min.
Paso 2	--	58°C/40 seg.	--
Paso 3	--	72°C/95 seg.	--
N° de ciclos	1	35	1

Tabla V. Programa de RT-PCR convencional para la síntesis de ADNc

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

Tabla VI. Programa de RT-PCR en tiempo real.

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

7.2. Partidores utilizados en el presente trabajo

Tabla VII . Partidores empleados para la amplificación de los genes de interés mediante PCR y RT-PCR convencional.

Nombre	Secuencia (5'-->3')	Descripción
18S F	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Amplifican el gen constitutivo 18S. Se emplearon para verificar la calidad del ADNc y ADNg. Amplifican un fragmento de 180 pb.
18S R	ACAATGATCCTTCCGCAGGT	
5' <i>HptII</i>	TTTGTGTACGCCCGACAGT	Amplifican el gen de resistencia a higromicina (<i>HptII</i>). Se utilizaron para verificar la transgénesis de las líneas transformadas. Amplifican un fragmento de 600 pb.
3' <i>HptII</i>	AAGACCTGCCTGAAACCGA	
<i>DcPsy2CDS</i> F	CGCACGTGTCATGTTTCAG AAACG	Amplifican la secuencia codificante del gen <i>DcPsy2</i> de <i>D. carota</i> de un tamaño esperado de 1,3 Kb. Se utilizaron para verificar la integración del transgen en las líneas transformadas.
<i>DcPsy2CDS</i> R	GGACTAGTAATGTCAGTTGC TATGTC	

Tabla VIII. Partidores usados para la amplificación de fragmentos por RT-PCR cuantitativo en esta Tesis.

Nombre	Secuencia (5'-->3')	Descripción
18S F'	TTGATTACGTCCCTGC CCTTT	Gen constitutivo, usado como normalizador en la generación T ₀ . T.D*: 88 °C
18S R'	ACAATGATCCTTCCGC AGGT	
q <i>NtPsy1</i> F'	GGAACCAAGCTAATGA CCCCAGAGAGA	Gen carotenogénico <i>NtPsy1</i> de <i>N. tabacum</i> . TD: 84 °C
q <i>NtPsy1</i> R'	GGCCGCCCACTGAAA ATATCTTCC	
q <i>NtPsy2</i> F'	TCAGAGATGTTGGAGA AGATGC	Gen carotenogénico <i>NtPsy2</i> de <i>N. tabacum</i> . TD: 83.2 °C

qNtPsy2 R'	GCTTCAATCTCGTCC AATATCTTG	
qDcPsy2 F'	TGGCTCAAGCAGGGC TTTCT	Gen carotenogénico <i>DcPsy2</i> de <i>D. carota</i> . T.D: 82 °C
qDcPsy2 R'	ATGCCCATACCGGCC ATCTA	
qActina F'	GTATGTTGCTATCCAGGC TGTGCT	Gen constitutivo, usado como normalizador en los tratamientos con NFZ. T.D: 83° C
qActina R'	CCGAAGAATTGCATGTGGA AGTGCAT	
qNtLcyb F'	CCGTGTTAAATTCCACCA CGCCAA	Gen carotenogénico <i>NtLcyb</i> de <i>N. tabacum</i> . T.D : 75° C
qNtLcyb R'	GAAGCCAGTTGCATCA AGCACCAC	

* T.D indica la temperatura de disociación del partidor

7.3. Determinación de los niveles de expresión del gen *DcPsy2* mediante RT-PCR semi-cuantitativo

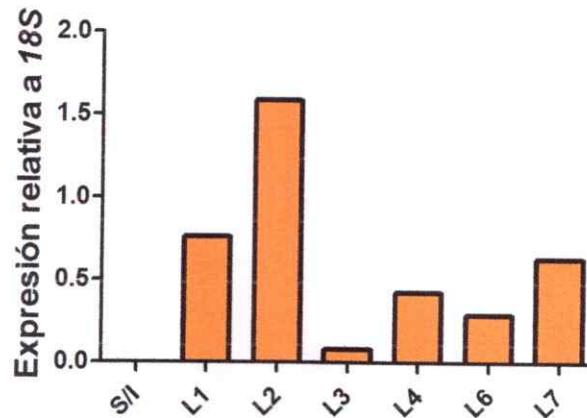


Figura S1. Determinación de los niveles de transcrito del gen *DcPsy2* en las plantas transformadas el vector *pGWB2/DcPsy2* mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Los niveles de transcrito del gen *DcPsy2* en las líneas seleccionadas fue calculada como la razón de fluorescencia entre los productos de PCR, visualizados en geles de agarosa, de los genes *DcPsy2* y *18S* tras ser amplificados mediante RT-PCR convencional. La cuantificación de los niveles de fluorescencia se realizó con el programa ImageJ de acuerdo a las indicaciones del desarrollador.

7.4. Determinación de los niveles de clorofila en la generación T₀ de plantas transformadas con el gen *DcPsy2*

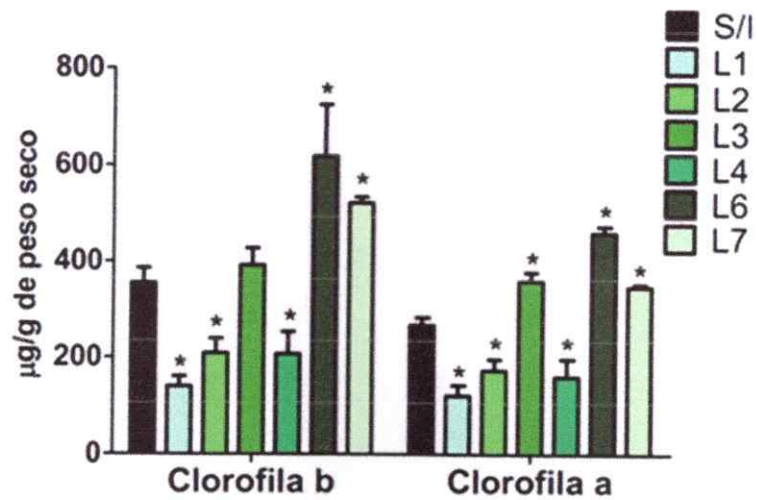


Figura S2. Cuantificación de los niveles de clorofila en las plantas de tabaco transformadas con el gen *DcPsy2*. Los asteriscos denotan diferencias significativas calculadas con una prueba de *t* no paramétrica de una cola y con un valor de $p < 0,05$.

7.5. Determinación del contenido de carotenoides en la generación T₁ de plántulas transgénicas seleccionadas.

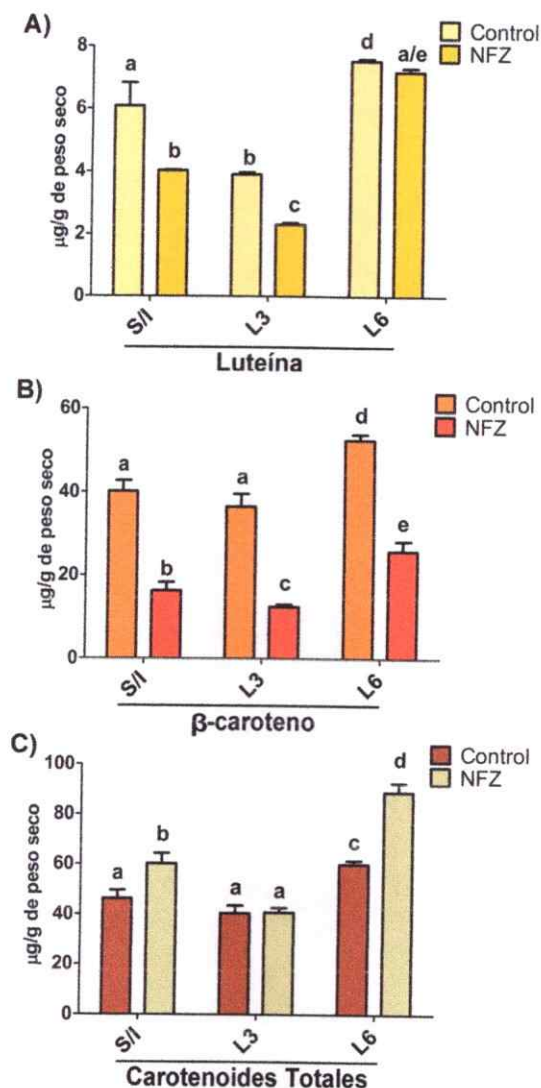


Figura S3. Determinación del contenido de carotenoides en la generación T₁ de las plántulas transformadas con el gen *DcPsy2*. A) Cuantificación de los niveles de luteína. B) Cuantificación de los niveles de β -caroteno. C) cuantificación de los carotenoides totales (carotenoides coloreados mas fitoeno) en las plántulas transformadas con el vector pGWB2/*DcPsy2*. Letras distintas sobre cada barra denotan diferencias significativas calculadas con una prueba de *t* no paramétrica de una cola y con un valor de $p < 0,05$.